



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIRURGIA

FILIFE TENÓRIO LIRA NETO

**REPERCUSSÃO DA VARICOCELECTOMIA MICROCIRÚRGICA EM HOMENS
INFÉRTEIS ATRAVÉS DE ANÁLISE METABONÔMICA BASEADA NA
ESPECTROSCOPIA DE RMN DE HIDROGÊNIO DE SORO DE SÊMEN**

RECIFE

2023

FILIPÉ TENÓRIO LIRA NETO

REPERCUSSÃO DA VARICOCELECTOMIA MICROCIRÚRGICA EM HOMENS INFÉRTEIS ATRAVÉS DE ANÁLISE METABONÔMICA BASEADA NA ESPECTROSCOPIA DE RMN DE HIDROGÊNIO DE SORO DE SÊMEN

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Cirurgia. Área de concentração: Cirurgia Clínica e Experimental.

Orientador-Interno: Dr. Salvador Vilar Correia Lima
Professor Titular do Departamento de Cirurgia, CCM-UFPE

Coorientador: Dr. Ricardo Oliveira da Silva
Professor Adjunto do Departamento Química Fundamental, CCEN-UFPE

RECIFE

2023

Catálogo na fonte:
Elaine Freitas, CRB4:1790

L768r

Lira Neto, Filipe Tenório

Repercussão da varicocelectomia microcirúrgica em homens inférteis através de análise metabonômica baseada na espectroscopia de RMN de hidrogênio de soro de sêmen / Filipe Tenório Lira Neto. – 2023.
104 p. : il.

Orientador: Salvador Vilar Correia Lima.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Médicas. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia, Recife, 2023.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Metaboloma. 2. Metabolômica. 3. Fertilidade. 4. Varicocele. 5. Espectroscopia de RMN. 6. Gravidez. I. Lima, Salvador Vilar Correia (orientador). II. Título.

616.73 CDD (22.ed.)

UFPE (CCS 2024 - 047)

FILIFE TENÓRIO LIRA NETO

**REPERCUSSÃO DA VARICOCELECTOMIA MICROCIRÚRGICA EM HOMENS
INFÉRTEIS ATRAVÉS DE ANÁLISE METABONÔMICA BASEADA NA
ESPECTROSCOPIA DE RMN DE HIDROGÊNIO DE SORO DE SÊMEN**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Cirurgia. Área de concentração: Cirurgia Clínica e Experimental.

Aprovada em: 06 de novembro de 2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. SALVADOR VILAR CORREIA LIMA (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. ESDRAS MARQUES LINS (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. GERALDO DE AGUIAR CAVALCANTI (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. EDUARDO DE PAULA MIRANDA (Examinador Externo)
Centro Universitário Unichristus

Prof. Dr. RICARDO PIMENTA BERTOLLA (Examinador Externo)
Universidade Federal de São Paulo

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais Luís Jorge e Raquel, pelo amor, pelos valores ensinados, e pelo apoio prestado em todas as fases da minha formação profissional;

À minha esposa e companheira Camilla, pelo amor, apoio, dedicação e compreensão incondicionais;

A meus filhos Filipe e Eduardo que me enchem de alegria, amor e esperança;

Aos demais familiares e amigos;

Ao Professor Dr. Salvador Vilar Correia Lima, referência em ensino e pesquisa, pela orientação dessa dissertação;

Ao Professor Dr. Ricardo Oliveira da Silva, por todo o apoio durante o planejamento e execução do projeto;

Ao Doutor Ronmilson Alves Marques, pela colaboração e dedicação ao projeto;

Ao corpo clínico, professores e residentes do Serviço de Urologia do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira pela compreensão e apoio profissional;

A todos os participantes do projeto, pela confiança depositada em mim ao embarcarem voluntariamente nesta pesquisa.

RESUMO

A varicocele é a causa corrigível mais comum de infertilidade masculina, no entanto, a predição dos resultados da varicocelectomia é difícil. As técnicas "ômicas" têm sido cada vez mais usadas para desenvolver novas ferramentas de diagnóstico e prognóstico para várias causas de infertilidade masculina, e podem ser aplicadas para estudar a varicocele. Os objetivos deste trabalho foi criar modelos metabonômicos capazes de segregar homens que melhoraram os parâmetros da análise seminal (AS) ou alcançaram gravidez natural após varicocelectomia microcirúrgica (VM) daqueles que não o fizeram, utilizando espectros de ressonância magnética nuclear de Hidrogênio 1 (RMN de H1) do plasma seminal de amostras pré-operatórias, bem como identificar os principais metabólitos e vias metabólicas responsáveis pela segregação dos grupos. Foram recrutados 29 homens inférteis com varicocele palpável. Espectros de RMN de H1 do plasma seminal foram obtidos de amostras pré-operatórias e utilizados para criar modelos metabonômicos. A melhora foi definida como um aumento na contagem total de espermatozoides móveis progressivos (TMC) da AS pós-operatória quando comparada à linha de base, e a gravidez foi avaliada durante 24 meses após a VM. Utilizando a Análise Discriminante Linear (LDA), criou-se um modelo que discriminou os homens que melhoraram a AS daqueles que não o fizeram, com uma acurácia de 93,1%. Outro modelo separou os homens que alcançaram a gravidez natural dos homens que não o fizeram. Foram identificados sete metabólitos importantes para a segregação de grupos: caprilato, isoleucina, N-acetiltirosina, carnitina, N-acetilcarnitina, creatina e treonina. Descrevemos o uso de modelos metabonômicos para prever com alta acurácia os desfechos da VM em homens inférteis com varicocele. Os metabólitos mais importantes para a segregação de grupos estão envolvidos no metabolismo energético e na resposta ao estresse oxidativo, destacando o papel fundamental desses mecanismos na fisiopatologia da varicocele. A espectroscopia de RMN de H1 do plasma seminal pode ser usada em conjunto com ferramentas estatísticas multivariadas para criar modelos metabonômicos úteis para segregar homens com varicocele com base nos resultados reprodutivos da VM. Esses modelos podem ajudar a aconselhar homens inférteis com varicocele em relação ao seu prognóstico após a cirurgia.

Palavras-chave: metaboloma; metabolômica; fertilidade; varicocele; espectroscopia de RMN; gravidez.

ABSTRACT

Varicocele is the most common correctable cause of male infertility, however, predicting varicocelelectomy outcomes is difficult. “Omics” techniques have been increasingly used to develop new diagnostic and prognostic tools for several male infertility causes and could be applied to study varicocele. This study aims to create metabonomics models capable of segregating men who improved semen analysis (SA) parameters or achieved natural pregnancy after microsurgical varicocelelectomy (MV) from those who did not, using Hydrogen-1 nuclear magnetic resonance (H1 NMR) spectra of seminal plasma of pre-operative samples, as well as to identify the main metabolites and metabolic pathways responsible for segregation of groups. We recruited 29 infertile men with palpable varicocele. H1 NMR spectra of seminal plasma were obtained from pre-operative samples and used to create metabonomics models. Improvement was defined as an increase in the total motile progressive sperm count (TMC) of the post-operative SA when compared to the baseline, and pregnancy was assessed during 24 months after MV. Using Linear Discriminant Analysis (LDA), we created a model that discriminated the men who improved SA from those who did not with an accuracy of 93.1%. Another model segregated men who achieved natural pregnancy from men who did not. We identified 7 metabolites that were important for group segregation: caprylate, isoleucine, N-acetyltyrosine, carnitine, N-acetylcarnitine, creatine and threonine. We described the use of metabonomics model to predict with high accuracy the outcomes of MV in infertile men with varicocele. The most important metabolites for group segregation are involved in energy metabolism and oxidative stress response, highlighting the pivotal role of these mechanisms in the pathophysiology of varicocele. H1 NMR spectroscopy of seminal plasma can be used in conjunction with multivariate statistical tools to create metabonomics models useful to segregate men with varicocele based on the reproductive outcomes of MV. These models may help counsel infertile men with varicocele regarding their prognosis after surgery.

Keywords: metabolome; metabolomics; fertility; varicocele; NMR spectroscopy; pregnancy.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-------------|---|----|
| FIGURA 1 - | Distribuição das causas de infertilidade..... | 15 |
| FIGURA 2 - | Anatomia da varicocele..... | 16 |
| FIGURA 3 - | Fisiopatologia da varicocele..... | 19 |
| FIGURA 4 - | Varicocelectomia Microcirúrgica..... | 21 |
| FIGURA 5 - | Modelo de fluxo da informação em organismos vivos..... | 23 |
| FIGURA 6 - | Representação esquemática da espectroscopia por RMN de ^1H | 25 |
| FIGURA 7 - | Exemplo de espectro de RMN de ^1H de soro de sêmen humano..... | 25 |
| FIGURA 8 - | Fluxograma dos participantes do estudo..... | 43 |
| FIGURA 9 - | Exemplos de espectros de RMN de ^1H de plasma seminal..... | 51 |
| FIGURA 10 - | Análise de Componentes Principais..... | 52 |
| FIGURA 11 - | Gráfico de scores do modelo metabonômico LDA MxNM..... | 53 |
| FIGURA 12 - | Gráfico de scores do modelo metabonômico LDA GxNG..... | 54 |
| FIGURA 13 - | Projeção das amostras no sistema de coordenadas definido pelas funções discriminantes para predição de melhoria dos parâmetros da análise seminal e gravidez..... | 56 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|-------------|---|----|
| TABELA 1 - | Características clínicas e demográficas dos grupos..... | 45 |
| TABELA 2 - | Distribuição dos participantes entre os grupos..... | 46 |
| TABELA 3 - | Achados intraoperatórios..... | 46 |
| TABELA 4 - | Dados das análises seminais pós-operatórias. Comparação entre os grupos..... | 48 |
| TABELA 5 - | Comparação entre os parâmetros da análise seminal pré e pós-operatória do Grupo melhora..... | 49 |
| TABELA 6 - | Comparação entre os parâmetros da análise seminal pré e pós-operatória do Grupo não melhora..... | 49 |
| TABELA 7 - | Comparação entre os parâmetros da análise seminal pré e pós-operatória do Grupo gravidez..... | 50 |
| TABELA 8 - | Comparação entre os parâmetros da análise seminal pré e pós-operatória do Grupo não gravidez..... | 50 |
| TABELA 9 - | Matriz de confusão – Modelo metabonômico LDA NxNM..... | 54 |
| TABELA 10 - | Matriz de confusão – Modelo metabonômico LDA GxNG..... | 55 |
| TABELA 11 - | Estudo univariado a partir de variáveis utilizadas nas funções discriminantes..... | 57 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-----------------------|--|
| AS | Análise de Seminal |
| CE | Cordão espermático |
| DA | Análise Discriminante |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico |
| DQF | Departamento de Química Fundamental |
| EF | Exame Físico |
| ERO | Espécies reativas de oxigênio |
| FSH | Hormônio Folículo Estimulante |
| GRUPO M | Grupo Melhora |
| GRUPO NM | Grupo Não Melhora |
| GRUPO G | Grupo Gravidez |
| GRUPO NG | Grupo Não Gravidez |
| IMIP | Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira |
| IMC | Índice de Massa Corpórea |
| IIQ | Intervalo interquartil |
| LDA | Análise Discriminante Linear (do inglês, <i>Linear Discriminant Analysis</i>) |
| LH | Hormônio Luteinizante |
| LOOCV | <i>Leave-one-out-cross Validation</i> |
| NAC | N-acetilcarnitina |
| NAT | N-acetiltirosina |
| OMS | Organização Mundial de Saúde |
| PCA | <i>Principal Component Analysis</i> |
| RMN de ¹ H | Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de H-1 |
| RNA | Ácido ribonucleico |

| | |
|------|--|
| UFPE | Universidade Federal de Pernambuco |
| USGD | Ultrassonografia de Bolsa Escrotal com Doppler |
| VM | Varicocelectomia Microcirúrgica |

SUMÁRIO

| | | |
|--------------|--|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO | 13 |
| 1.1 | INFERTILIDADE MASCULINA..... | 13 |
| 1.2 | VARICOCELE..... | 19 |
| 1.3 | VARICOCELECTOMIA..... | 20 |
| 1.4 | METABONÔMICA..... | 22 |
| 1.5 | OUTRAS ESTRATÉGIAS “ÔMICAS..... | 27 |
| 1.6 | ANÁLISE MULTIVARIADA..... | 32 |
| 2 | JUSTIFICATIVA DO ESTUDO..... | 34 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 35 |
| 3.1 | OBJETIVO GERAL..... | 35 |
| 3.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 35 |
| 4 | MATERIAIS E MÉTODOS..... | 36 |
| 4.1 | LOCAL DO ESTUDO..... | 36 |
| 4.2 | TIPO DO ESTUDO..... | 36 |
| 4.3 | SELEÇÃO..... | 36 |
| 4.3.1 | Critérios de inclusão..... | 36 |
| 4.3.2 | Critérios de exclusão..... | 36 |
| 4.4 | PROCEDIMENTOS..... | 37 |
| 4.4.1 | Procedimentos Técnicos..... | 37 |
| 4.4.2 | Procedimentos analítico..... | 40 |
| 4.4.3 | Procedimentos éticos..... | 41 |
| 4.4.3.1 | Aprovação pelo comitê de ética do CCS..... | 41 |
| 4.4.3.2 | Proteção dos indivíduos envolvidos no estudo..... | 42 |
| 4.4.3.3 | Benefícios para indivíduos e sociedade..... | 42 |
| 4.4.3.4 | Benefícios para ciência..... | 42 |
| 5 | RESULTADOS..... | 43 |
| 5.1 | DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS..... | 43 |
| 5.2 | DADOS DAS ANÁLISES SEMINAIS PRÉ-OPERATÓRIAS..... | 44 |
| 5.3 | DADOS DAS ANÁLISES SEMINAIS PÓS-OPERATÓRIAS..... | 47 |
| 5.4 | COMPARAÇÕES ENTRE DADOS DAS ANÁLISES SEMINAIS PRÉ E PÓS-OPERATÓRIAS..... | 49 |
| 5.5 | DADOS ESPECTRAIS E ANÁLISES MULTIVARIADAS..... | 50 |

| | | |
|----------|---|------------|
| 6 | DISCUSSÃO..... | 58 |
| 7 | CONCLUSÕES E PERSPECTIVA..... | 63 |
| | REFERÊNCIAS..... | 64 |
| | APÊNDICE A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO..... | 78 |
| | APÊNDICE B – FICHA DE COLETA DE DADOS..... | 81 |
| | APÊNDICE C – ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO NO PERIÓDICO ANDROLOGY..... | 82 |
| | ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DO CCS..... | 92 |
| | ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DO IMIP..... | 99 |
| | ANEXO C - ATIVIDADES COMPLEMENTARES..... | 102 |

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFERTILIDADE MASCULINA

A espermatogênese é uma intrincada rede de processos sequenciais responsáveis pela produção do gameta masculino, o espermatozoide. Todos esses processos ocorrem nos túbulos seminíferos, pequenas estruturas tubulares consideradas as unidades funcionais dos testículos. Cada testículo humano contém aproximadamente 600 – 1200 destes túbulos e é capaz de produzir até 275 milhões de espermatozoides por dia (1). Os processos envolvidos na espermatogênese são comuns a outros mamíferos e incluem proliferação e diferenciação espermatogônica em espermatócitos, meiose de espermatócitos, espermiogênese e espermição (2). Os tipos de células que participam da espermatogênese humana (ou seja, células de Sertoli, células de Leydig, células germinativas e células peritubulares) também são encontrados e compartilham semelhanças com outros mamíferos. Devido à sua complexidade, este processo é suscetível à interferência de vários fatores fisiológicos e patológicos, sendo os últimos responsáveis por várias causas de infertilidade masculina (1).

A infertilidade conjugal é definida como a falha de se ter uma gravidez bem-sucedida após 12 meses de relações sexuais não protegidas e regulares (3, 4). Estudos populacionais mostram que cerca de 10 a 15% dos casais são inférteis, sendo metade destes casos devido a fatores encontrados no homem, sendo 20% desses exclusivamente masculinos e os demais 30% combinados com fatores femininos (5, 6). Sendo assim, estima-se que pelo menos 30 milhões de homens sejam inférteis ao redor do mundo (7).

Uma recente metanálise da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelou que, no mundo, 17.5% das mulheres em idade fértil nunca tiveram filhos apesar de relações sexuais frequentes (8). No entanto, estudos realizados no Brasil não foram incluídos nesta análise. Uma pesquisa anterior, também realizada pela OMS, revelou que 18.3% das mulheres em idade fértil nunca tiveram filhos apesar de relações sexuais frequentes, estatística similar à de outros países em desenvolvimento (9). Infelizmente a epidemiologia da infertilidade masculina no Brasil é desconhecida, não havendo estudos populacionais sobre este tema.

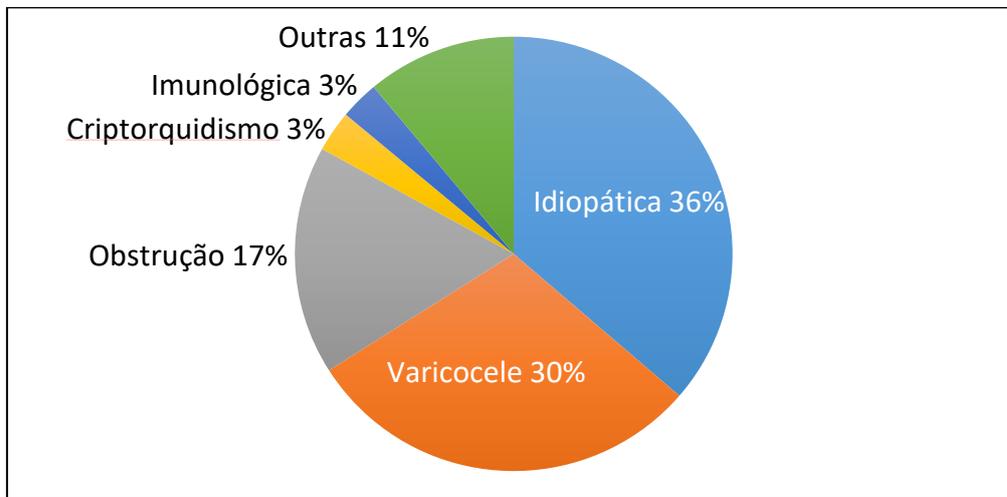
A propedêutica básica do homem infértil inclui anamnese e exame físico completos, bem como avaliação hormonal e exame de espermograma, sendo este último o exame complementar de maior importância nestes casos. Ademais, podem ser utilizados testes de

função do espermatozoide, teste de qualidade do material genético do gameta masculino, e testes genéticos (10). Apesar de grandes avanços no diagnóstico e tratamento da infertilidade masculina, ainda 30% dos homens inférteis são categorizados como casos de “infertilidade idiopática”, além disso, o entendimento sobre os mecanismos pelos quais diversas condições causam infertilidade masculina ainda está longe de ser completo (2).

É importante destacar que os valores de referência dos parâmetros do espermograma foram estabelecidos pela OMS, sendo baseados exclusivamente nos percentis 5 de uma amostra de 1953 homens férteis provenientes de apenas 8 países, dentre os quais o Brasil não está incluído (11). A metodologia escolhida para o estabelecimento dos valores de referência tem sido criticada devido à limitada capacidade de utilização desses valores para populações específicas, como no caso da população brasileira (12). Além do mais, até o presente momento, não há nenhum estudo para estabelecer os valores de referência dos parâmetros do espermograma para a população masculina brasileira. Recentemente alguns autores têm demonstrado que o total de espermatozoides móveis progressivo no ejaculado, calculado multiplicando-se o número total de espermatozoides no ejaculado pela porcentagem de espermatozoides com motilidade progressiva, é um parâmetro que têm uma melhor correlação com as taxas de gravidez quando comparado com os parâmetros tradicionais do espermograma (13, 14). Para estes autores, o valor de referência seria de no mínimo 20 milhões de espermatozoides com motilidade progressiva no ejaculado (13, 14).

Embora exames complementares sejam utilizados rotineiramente na avaliação da fertilidade masculina, excetuando-se os casos de ausência de espermatozoides no sêmen (azoospermia), atualmente não é possível afirmar definitivamente que um homem é infértil baseado apenas nos resultados do espermograma ou de outros exames complementares (10, 15-17).

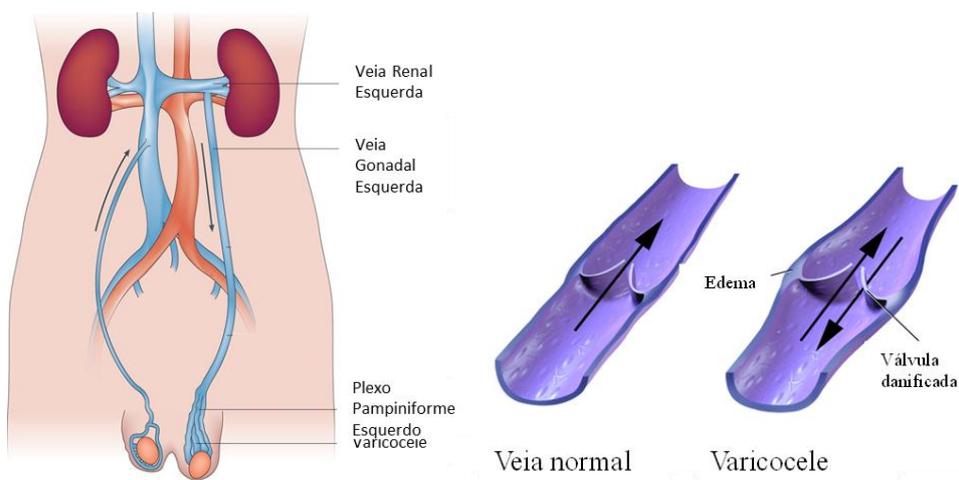
A **Figura 1** representa as causas mais comuns de infertilidade masculina. É interessante notar que, apesar de grandes avanços no diagnóstico e tratamento da infertilidade masculina, ainda cerca de 30% dos homens inférteis são categorizados como casos de “infertilidade idiopática”(18). Além disso, o entendimento sobre os mecanismos pelos quais diversas condições causam infertilidade masculina ainda está longe de ser completo.

FIGURA 1 - Distribuição das causas de infertilidade

Fonte: Adaptado de Sigman (2009) (18)

1.2 VARICOCELE

A varicocele é a causa corrigível mais comum de infertilidade masculina, responsável por 35% dos casos de infertilidade masculina primária, e 80% dos casos de infertilidade secundária, (19). Porém estima-se que 80% dos homens com varicocele sejam férteis (20). Esta condição é definida como uma dilatação anormal das veias espermáticas internas devido ao refluxo sanguíneo venoso causado por válvulas venosas incompetentes (**Figura 2**). Cerca de 90% dos homens com varicocele apresentam dilatação do plexo pampiniforme apenas do lado esquerdo (21). A maior prevalência da varicocele no lado esquerdo é explicada pela anatomia das veias gonadais. As veias do plexo pampiniforme se confluem ao nível do anel inguinal interno, formando as veias gonadais. Do lado esquerdo, a veia gonadal desemboca na veia renal esquerda em um ângulo de 90 graus, o que causa um aumento da pressão nesse sistema venoso, aumentando o refluxo de sangue para o plexo pampiniforme esquerdo. Por outro lado, a veia gonadal direita termina na veia cava formando um ângulo oblíquo, o que reduz a pressão no plexo pampiniforme direito, diminuindo o refluxo venoso deste lado. Nos casos de varicoceles bilaterais é comum a presença de uma variação anatômica onde a veia gonadal direita drena na veia renal direita, também em ângulo reto (22).

FIGURA 2 - Anatomia da varicocele

Fonte: Adaptado de Jensen (2017)(23)

Pesquisas contemporâneas mostraram que vários fatores não mutuamente exclusivos ligam a varicocele à infertilidade masculina (**Figura 3**) (23). A hipertermia testicular é a hipótese mais aceita para explicar o dano causado pela varicocele (24). A perda do mecanismo de contracorrente causada pelo refluxo do sangue abdominal através de válvulas incompetentes das veias espermáticas internas para o plexo pampiniforme leva à hipertermia escrotal (25, 26). A temperatura ideal para a espermatogênese é de 2 a 4 ° C menor do que a temperatura do corpo, e o estresse térmico está associado ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) pelas mitocôndrias celulares, membrana plasmática, citoplasma e peroxissomas. O dano celular por hipertermia ocorre em diferentes graus nos vários compartimentos celulares (27). Nos testículos, a espermatogônia B e os espermatozoides em desenvolvimento são altamente vulneráveis ao estresse térmico(1). Pelo contrário, as espermatogônias A, assim como as células de Leydig e Sertoli, são termorresistentes (24).

A estase do sangue nos microvasos testiculares causada pelo refluxo venoso pode levar à isquemia em homens com varicocele (28). Um estudo utilizando ultrassonografia ultrasensível com Doppler (USGD) demonstrou que o fluxo testicular avaliado com base na razão superficial dos vasos sanguíneos diminuiu em 60% e 80% ($P < 0,05$) durante a manobra de Valsalva em pacientes com varicoceles graus 2 e 3, respectivamente, sugerindo que a isquemia ocorre quando a pressão hidrostática venosa da veia testicular interna excede a pressão arteriolar testicular. De Win e colaboradores demonstraram que, em homens com varicocele, um pico de fluxo retrógrado superior a 38 cm / s foi associado ao aumento do dano ao DNA do

esperma (29). Oclusão arteriolar por microtrombos, degeneração de células germinativas, atrofia de células de Leydig e espessamento fibrótico das membranas basais de túbulos seminíferos foram observados em espécimes de biópsia testicular (30). As ERO são produzidas por várias fontes durante esse estado hipóxico, incluindo ativação do fator 1 induzível por hipóxia, disfunção mitocondrial, xantina desidrogenase/oxidase, NADPH oxidase 5 associada à membrana e fosfolipase A2 (24). Além disso, a hipóxia pode levar a aumentos na expressão de leptina e citocinas no tecido testicular, incluindo interleucinas 1 e 6, o que pode induzir a geração de ERO (31-33).

Além disso, estudos que avaliaram o estresse oxidativo em humanos com insuficiência venosa crônica demonstraram aumento da produção de ERO e diminuição do potencial antioxidante nas varizes (34, 35). Postula-se que a tensão de cisalhamento causada pela hipertensão hidrostática local pode ativar vários tipos de moléculas de adesão, como selectinas, integrinas, e outras moléculas de adesão celular. Esse fenômeno também pode levar a um aumento da migração de leucócitos para a parede da veia. Após a migração, esses leucócitos são ativados e começam a produzir quantidades aumentadas de ERO. Além disso, a tensão de cisalhamento e o ambiente hipóxico nos vasos sanguíneos podem induzir a produção excessiva de óxido nítrico, uma ERO, via óxido nítrico sintase endotelial, agravando ainda mais o estresse oxidativo na microcirculação testicular (36). De fato, um estudo utilizando modelo animal demonstrou aumento dos níveis testiculares de óxido nítrico em ratos com varicocele induzida experimentalmente, mesmo na ausência de alterações histopatológicas (37). Esses achados sugerem que a geração excessiva de ERO é uma consequência precoce da varicocele e precede a falha da espermatogênese.

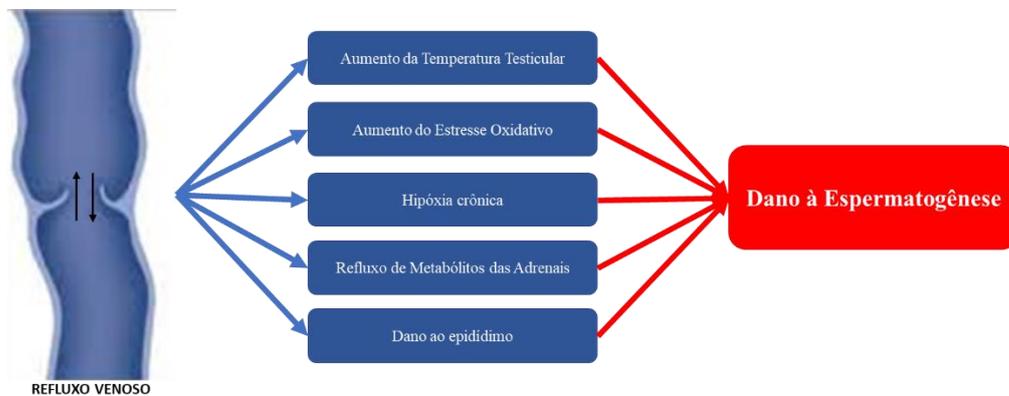
Outro mecanismo que pode participar da fisiopatologia da varicocele é o refluxo de metabólitos. Estudos flebográficos demonstraram fluxo sanguíneo retrógrado das veias renais e adrenais para a veia testicular esquerda em homens com varicocele (38). Alguns autores descreveram refluxo de metabólitos renais e adrenais, como prostaglandinas, ureia e adrenomedulina, de volta às veias espermáticas internas, o que poderia induzir estresse oxidativo celular (39-43). O cádmio é um metal natural que foi identificado em níveis elevados na parede das veias espermáticas internas, espécimes de biópsia do tecido testicular e no líquido seminal de pacientes com varicocele (44, 45). Hipotetiza-se que o aumento da pressão hidrostática e da hipóxia pode resultar em uma barreira porosa do testículo sanguíneo que permite o acúmulo de cádmio (46). No entanto, ainda não está claro se esses dois mecanismos afetam a fertilidade.

A varicocele também pode impactar os epidídimos, causando alterações estruturais e funcionais (24). No epidídimo, existem três fontes importantes de ERO: o líquido luminal proveniente do testículo, as células endoteliais em camadas da rede capilar ao redor da cabeça, e as células principais que revestem o lúmen do epidídimo (24). O segmento inicial do epidídimo parece ser o principal local de acúmulo de ERO. No entanto, células capazes de gerar antioxidantes enzimáticos e não enzimáticos parecem existir em todas as seções do epidídimo. Hipóxia e estresse térmico são os prováveis gatilhos subjacentes ao desequilíbrio entre ERO e defesas antioxidantes no epidídimo. Sob essas condições estressantes, as células principais podem gerar ERO excessivas que, combinadas com a produção prejudicada de antioxidantes, resultam em danos oxidativos aos espermatozoides em maturação e às células epididimais (27).

Desde os relatos iniciais sobre a associação entre varicocele e estresse oxidativo, as evidências sobre a importância do estresse oxidativo e da fragmentação do DNA na infertilidade relacionada à varicocele aumentaram de forma constante (47). Sabe-se que pequenas quantidades de ERO são necessárias para a capacitação normal dos espermatozoides, reação ao acrossomo, hiperativação e fusão espermatozoide-ovócitos (48). Por outro lado, o estresse oxidativo ocorre quando quantidades excessivas de ERO superam a proteção antioxidante, levando a várias alterações no DNA do esperma nuclear e mitocondrial, como modificação da base, quebras de fitas e ligações cruzadas da cromatina (24). Devido à capacidade limitada dos espermatozoides de reparar seu material genético, o dano ao DNA do esperma pode, em última análise, levar à apoptose e / ou função defeituosa do esperma (27, 49-51). Além disso, o excesso de ERO oxida lipídios insaturados na membrana espermática, resultando em alterações da estrutura da membrana, afetando sua fluidez e prejudicando sua integridade (50, 52). Da mesma forma, existe uma associação entre estresse oxidativo e diminuição do telômeros dos espermatozoides em homens inférteis com varicocele (53), sendo esse um dos fatores que pode impactar negativamente na espermatogênese, tendo em vista que os telômeros protegem contra degradação do DNA (54).

Apesar da grande quantidade de estudos sobre o tema, a relação de causa-efeito entre varicocele e infertilidade masculina ainda é motivo de controvérsia. Embora estudos em homens inférteis apontem para um impacto negativo da varicocele na capacidade reprodutiva masculina, estudos com homens não selecionados apresentam resultados conflitantes (55-58).

FIGURA 3 - Fisiopatologia da varicocele



Fonte: Adaptado de Neto (2020) (59).

A venografia, exame que utiliza a injeção de contraste radiológico diretamente nas veias, possui sensibilidade de aproximadamente 100% para o diagnóstico de varicocele, sendo considerada o padrão ouro, porém é pouco utilizada na prática clínica devido ao seu alto grau de invasividade (60, 61). Na prática clínica, o diagnóstico de varicocele é comumente realizado através do exame físico (EF) e da USGD. O exame físico para a avaliação da varicocele deve ser realizado com o paciente em pé e deitado e com a sala a temperatura ambiente. Nele, o examinador identifica a presença de varicocele através da palpação das veias dilatadas do plexo pampiniforme, tanto no repouso quanto durante a manobra de Valsalva. Os critérios de Dubin são utilizados para a classificação da varicocele durante o EF nos seguintes graus: 1 – palpável apenas com manobra de Valsalva, 2 – palpável em repouso, e 3 – visível (62). A USGD é comumente utilizada para confirmar os achados do EF e para avaliar outros aspectos dos órgãos da bolsa escrotal, devendo também ser realizada com o paciente em pé e deitado, e durante repouso e manobra de Valsalva. Este exame é capaz de avaliar diretamente a presença de refluxo venoso, bem como de medir com precisão o diâmetro das veias do plexo pampiniforme, avaliar o volume testicular e o aspecto dos epidídimos e ductos deferentes (63). A acurácia da USGD é superior à do EF (60, 64), porém ambos os métodos possuem uma alta variação intra- e interobservador (60, 65, 66). É importante ressaltar o conceito de varicoceles subclínicas, aquelas que são diagnosticadas apenas pela USGD e não pelo EF. Vários estudos demonstraram que o tratamento das varicoceles subclínicas não melhora os parâmetros seminais nem aumenta a taxa de gravidez de homens inférteis (67). Desta forma, segundo recomendação da Associação Americana de Urologia e da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva, o EF é o principal método diagnóstico da varicocele, não sendo recomendado o uso de exames de imagem

complementares na ausência de varicoceles palpáveis, exceto em situações onde o EF é prejudicado, tais como obesidade e testículos retráteis ou ectópicos (68).

1.3 VARICOCELECTOMIA

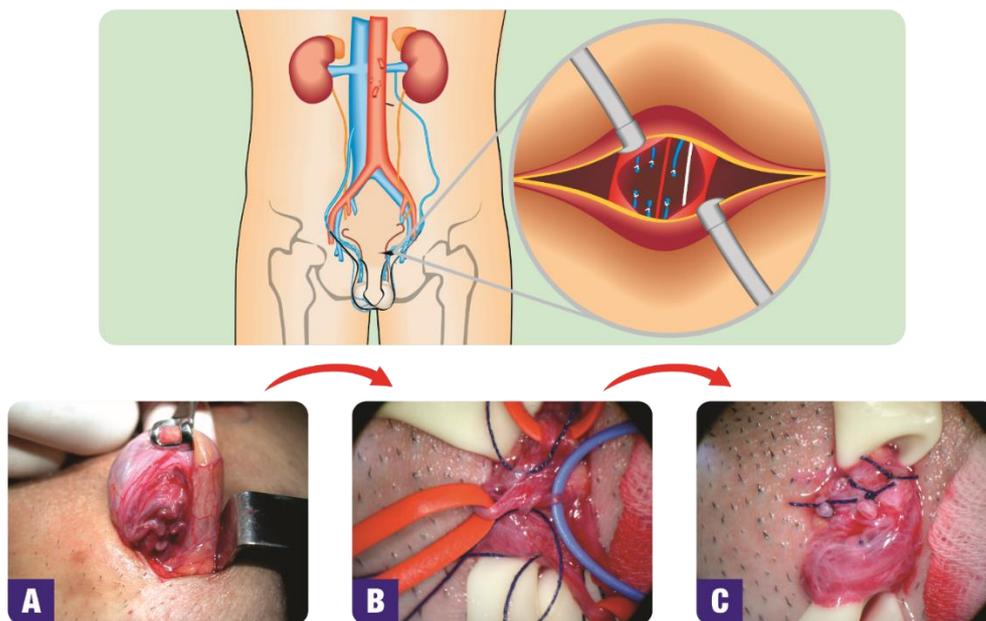
O tratamento das varicoceles é recomendado para homens inférteis que apresentam varicoceles palpáveis e parâmetros anormais de SA (69). Nesse cenário, a correção da varicocele demonstrou melhorar os parâmetros de SA, a taxa de gravidez e os resultados das técnicas de reprodução assistida (70-73). Por outro lado, a varicocelectomia não é rotineiramente recomendada para homens com varicocele subclínica devido ao seu benefício equívoco nesta população (74-76). A relevante associação entre varicocele e fragmentação do DNA espermático, bem como o seu efeito negativo nos resultados reprodutivos tem sido cada vez mais reconhecidos. Desta forma, diretrizes recentes sugerem que níveis elevados de fragmentação do DNA espermático podem ser considerados um critério para recomendar o reparo da varicocele em homens inférteis com varicocele palpável (77, 78).

O reparo cirúrgico é o tratamento padrão para homens com varicoceles. Seu principal objetivo é a oclusão das veias dilatadas do plexo pampiniforme por ligadura das veias testiculares, espermáticas externas e cremastéricas (79). Várias técnicas têm sido utilizadas para esse fim, incluindo métodos cirúrgicos abertos (com ou sem magnificação óptica), laparoscopia e embolização. Na técnica aberta, a ligadura das veias é realizada por meio de incisões retroperitoneais, inguinais ou subinguinais (80). A abordagem laparoscópica permite a oclusão das veias espermáticas a poucos centímetros do orifício inguinal interno (81). A embolização radiológica é realizada via veia femoral ou jugular, e a oclusão das veias internas espermáticas e colaterais é realizada por meio de agentes embólicos sólidos ou líquidos (82).

A varicocelectomia microcirúrgica é considerada o tratamento padrão-ouro, estando associada à melhoria da fertilidade masculina (83, 84). Suas principais etapas cirúrgicas estão ilustradas na **Figura 4**. Os parâmetros básicos do sêmen melhoram de 64 a 81% após a varicocelectomia microcirúrgica, e a probabilidade de melhora é mais notável em homens com varicocele de grau 2 ou 3 do que em varicoceles de grau 1 (62, 85-87). A contagem total de espermatozoides móveis aumenta após o reparo da varicocele, o que pode permitir que os casais que precisariam de fertilização *in vitro* usem métodos de concepção assistida menos invasivos, como a inseminação intrauterina, ou tentem uma gravidez natural (88). Além disso, a última

revisão sistemática e metanálise Cochrane relatou que o reparo da varicocele aumentou as taxas naturais de gravidez em comparação com apenas observação em homens inférteis com varicocele clínica e parâmetros básicos anormais da AS (89). De acordo com este estudo, seis pacientes teriam que ser submetidos à varicocelectomia para que um casal adicional conseguisse uma gravidez. Da mesma forma, a VM reduz os níveis de marcadores de estresse oxidativo enquanto aumenta os níveis antioxidantes no sêmen em homens inférteis com varicocele palpável (90, 91), bem como reduz os níveis de fragmentação do DNA espermático (92). A melhoria da integridade do DNA do gameta masculino após a intervenção parece aumentar a chance de concepção natural (93).

FIGURA 4 - Varicocelectomia Microcirúrgica



Fonte: Adaptado de Lira Neto (2022) (93)

Legenda: A- Exposição do cordão espermático. B- Isolamento das artérias espermáticas. C- Ligadura das veias do plexo pampiniforme.

As taxas de gravidez natural após a varicocelectomia microcirúrgica variam de 29% a 60% durante um período pós-operatório de 12 meses (85, 94). Essa grande variação provavelmente se deve a fatores de confusão, como infertilidade feminina, parâmetros basais do sêmen, gravidade da varicocele e outras comorbidades masculinas associadas. Várias características como idade, índice de massa corporal (IMC), tamanho testicular, parâmetros de

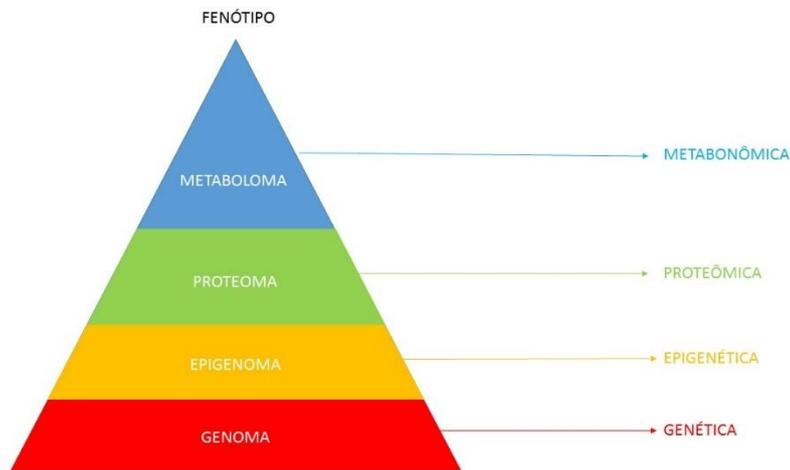
sêmen, níveis de hormônio folículo-estimulante (FSH) e marcadores de inflamação foram identificados como fatores prognósticos para o sucesso da varicocelectomia microcirúrgica (62, 95-97). O primeiro nomograma criado para prever a melhora nos parâmetros SA após o reparo da varicocele incluiu parâmetros como idade, grau de varicocele e parâmetros basais de SA (98). No entanto, um estudo subsequente de validação externa deste nomograma demonstrou uma baixa acurácia do mesmo, sendo encontrados valores da contagem total de espermatozoides móveis progressivos (TMC) no pós-operatório maiores do que o predito pelo nomograma (99). Recentemente, um novo nomograma para prever a melhora da AS após a VM em homens inférteis, com alteração na AS e sem alterações hormonais foi descrito por Liu e colaboradores. Utilizando o diâmetro da maior varicocele do lado esquerdo e a TMC pré-operatória, os autores desenvolveram um nomograma com acurácia de 94% (100). Usando a mesma coorte de participantes, o mesmo grupo criou um nomograma para avaliar a chance de gravidez natural (101). Neste segundo estudo foram utilizadas como variáveis a idade da parceira, o diâmetro da maior varicocele do lado esquerdo, a TMC pré-operatória, e o aumento da TMC no pós-operatório. A acurácia na predição de gravidez natural foi de 97%. Entretanto, estes dois últimos estudos possuem como limitações o caráter retrospectivo, o tempo curto de seguimento, bem como a falta de estudos de validação externa. Sendo assim, prever os resultados da varicocelectomia microcirúrgica em nível individual permanece desafiador devido aos diversos fatores que podem influenciar o resultado da cirurgia. Desta forma, fica evidente a necessidade de estudos que venham a desenvolver ferramentas alternativas, rápidas, e minimamente invasivas que ajudem no prognóstico da melhora da fertilidade masculina após o tratamento da varicocele.

1.4 METABONÔMICA

Com o objetivo de desenvolver novas ferramentas diagnósticas, terapêuticas e prognósticas para diversas causas de infertilidade masculina, as técnicas "ômicas" têm sido cada vez mais utilizadas (102). Os métodos "ômicos" usam técnicas de alto rendimento para estudar vários sistemas biológicos de forma passo a passo, progredindo a partir da informação mais básica, o genoma, passando por mecanismos que modificam e processam essas informações, o epigenoma e o transcriptoma, atingindo os elementos funcionais, o proteoma, e terminando nos efeitos líquidos de sua ação, o metaboloma e o fenômeno (**Figura 5**). Essa abordagem integrada depende fortemente de métodos analíticos químicos, produzindo uma enorme quantidade de

dados que devem ser interpretados usando ferramentas de bioinformática e análise computacional, a fim de fornecer informações clinicamente úteis (103, 104).

FIGURA 5 - Modelo de fluxo da informação em organismos vivos



Fonte: Adaptado de Neto (2020) (59)

O termo metabólitos refere-se às moléculas de baixo peso molecular, tais como aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, vitaminas, e alguns compostos inorgânicos, cujas concentrações são estimadas numa ordem de magnitude que se estende de milimolar (mM) a picomolar (pM) (105). Já o metaboloma, conjunto completo de metabólitos em uma amostra, é o produto final de todos os processos biológicos e tem relação direta com fenótipos, sendo influenciado por diversos fatores fisiológicos e patológicos (106). Desta forma, a identificação de alterações no metaboloma causadas por determinadas patologias permite tanto o estudo de mecanismos fisiopatológicos como a identificação de biomarcadores associados a determinados fenótipos (107). Atualmente, cerca de 220.000 metabólitos estão catalogados na Base de Dados do Metaboloma Humano (Human Metabolome Database www.hmdb.ca), dado este que exemplifica a complexidade envolvida no estudo do metaboloma (108). Estima-se que existam pelo menos 2000 metabólitos no sêmen humano, porém, atualmente, menos de 50 destes metabólitos foram estudados (109). Por isso, há uma urgente necessidade de mais estudos nestas áreas, para que o conhecimento sobre a fisiopatologia da infertilidade masculina seja ampliado, possibilitando o desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas e terapêuticas.

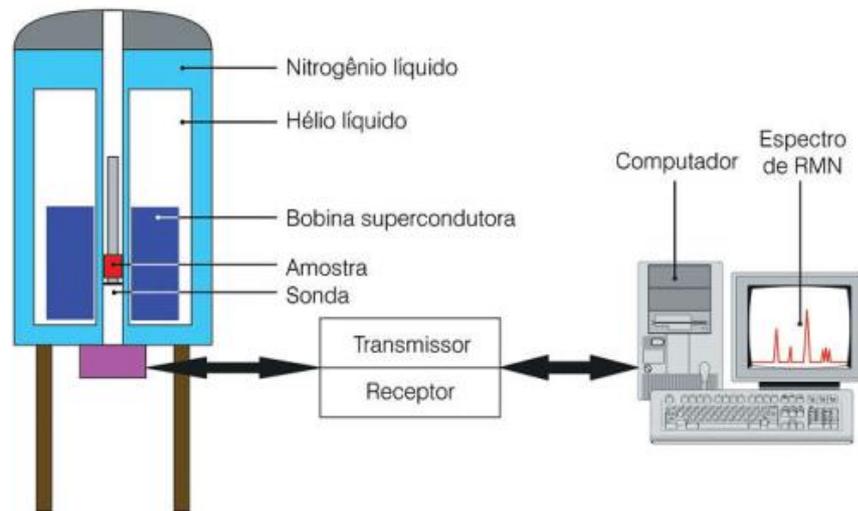
Diferentes estratégias podem ser utilizadas para o estudo do metaboloma. A metabolômica envolve a identificação e quantificação de todos os metabólitos de um determinado sistema biológico. Já a “impressão digital” metabólica (do inglês *fingerprinting*)

é uma análise global de alto rendimento empregada para classificação de diferentes amostras onde a identificação e quantificação de todos os metabólitos não é necessária. Enquanto a análise de metabólito alvo foca no estudo qualitativo e quantitativo de um ou alguns metabólitos relacionados a uma reação metabólica específica (105).

Metabonômica é o estudo de como o metaboloma dos sistemas vivos muda em resposta a estímulos endógenos ou exógenos (105, 110). Desde o início dos 2000, diversos trabalhos que buscam criar modelos capazes de auxiliar o diagnóstico das mais diferentes doenças têm utilizado a metabonômica (110-112). Alterações na concentração dos metabólitos endógenos envolvidos nas principais vias celulares provocadas por doenças, administração de drogas, ou em função da ação de algum agente externo, desencadeiam mecanismos de ajustes no ambiente intra e extracelular, devido à homeostase, e são expressas como uma impressão digital do status bioquímico da amostra (112). Biofluidos, como soro e urina, são os mais comumente utilizados nessa estratégia. Recentemente, em nosso centro foram desenvolvidos modelos metabonômicos usando amostras de urina e sangue para auxiliar o diagnóstico de hepatite viral do tipo C, e de câncer de próstata, bexiga e rim (113, 114). Alternativamente, outros biofluidos, como o fluido cerebrospinal ou sêmen, e fragmentos de tecidos também podem ser utilizados (110).

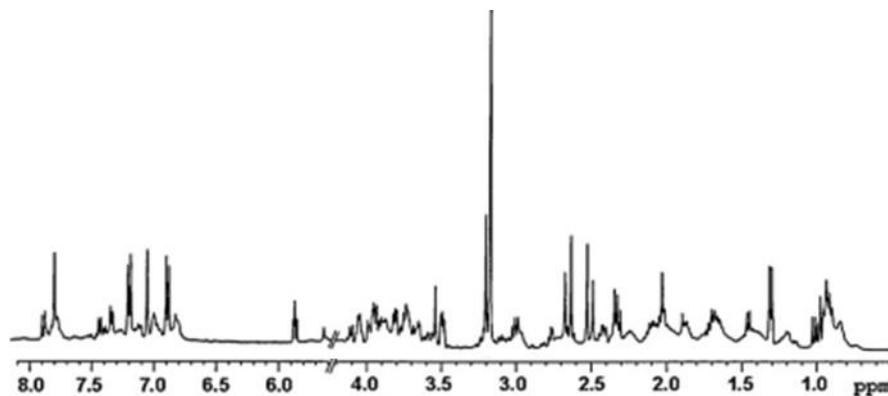
Estudos de metabonômica aplicam várias técnicas diferentes para analisar as alterações do metaboloma causadas por um determinado estímulo. A RMN de ^1H é a técnica mais utilizada atualmente, pois necessita de pequenas quantidades de biofluidos e requer apenas uma simples diluição da amostra antes da análise. Esta técnica possui também uma alta resolução, sendo capaz de avaliar diferentes tipos de metabólitos bem como realizar análises quantitativas e qualitativas (106, 112). O funcionamento da RMN de ^1H baseia-se na detecção de pequenas mudanças da frequência de ressonância dos núcleos de Hidrogênio-1 causadas pela aplicação de fortes campos magnéticos e pulsos de radiofrequência. Como a frequência de ressonância depende do ambiente químico no qual o núcleo está inserido, é possível distinguir, identificar, e quantificar os diferentes componentes moleculares do meio que contém os núcleos estudados. Utilizando-se os dados obtidos, um espectro de frequências é criado, e cada pico é analisado de acordo com sua faixa de frequência, intensidade e acoplamentos (106). A **Figura 6** representa esquematicamente os equipamentos utilizados para obtenção dos espectros de RMN de ^1H , e a **Figura 7** é um exemplo de espectro de soro de sêmen humano. O processamento posterior desses dados é realizado com ferramentas estatísticas multivariadas (110, 112, 115).

FIGURA 6 - Representação esquemática da espectroscopia por RMN de ^1H



Fonte: Adaptado de Araujo (2016) (113).

FIGURA 7 - Exemplo de espectro de RMN de ^1H de soro de sêmen humano



Fonte: Adaptado de Gupta (2010) (116).

Existem vários relatos utilizando metabonômica baseada em RMN de ^1H para identificar biomarcadores úteis no diagnóstico de algumas condições de infertilidade masculina (102). Um dos primeiros estudos utilizou soro de sêmen de 4 grupos de homens com diferentes concentrações de espermatozoides (azoospermicos, oligospermicos, vasectomizados e normospermicos) (117). Neste trabalho, os autores demonstraram que lactato, citrato e glicerilfosforilcolina formam os três principais biomarcadores para o diagnóstico de infertilidade masculina (117). Em um estudo subsequente, também utilizando RMN de ^1H do soro de sêmen, Jayaraman e colaboradores compararam os metabólitos seminais de homens

diagnosticados com infertilidade idiopática, homens oligospermicos, e controles férteis, demonstrando um aumento na concentração de malonato, bem como uma diminuição da concentração de valina, de 2-hidroxisovalerato, e de alanina em homens com infertilidade idiopática (107). Nesta mesma linha, utilizando modelos metabonômicos criados a partir de dados espectrais de RMN de ^1H de soro de sêmen, Gupta e colaboradores geraram modelos com acurácia de 92.4% para discriminar homens férteis de inférteis, e de 92.2% para diferenciar homens inférteis com espermograma normal de homens inférteis com oligospermia (116). Também utilizando a RMN de ^1H para estudar os metabólitos seminais de homens inférteis devido a lesões medulares, Maher e colaboradores revelaram níveis extremamente baixos de uridina, um metabólito importante para o metabolismo energético dos espermatozoides, nestes participantes (118).

Recentemente, a RMN de ^1H também foi aplicada para comparar metabólitos seminais de homens férteis normospermicos com homens inférteis portadores de astenozoospermia (119). Nesta pesquisa, Zhang e colaboradores identificaram 19 metabólitos cujas concentrações eram diferentes entre os dois grupos, e criaram um modelo metabonômico com acurácia de 87,5% na segregação dos grupos. Dentre os principais metabólitos alterados destacaram-se aminoácidos, produtos do metabolismo lipídico, e produtos intermediários do ciclo de Krebs (119). Além disso, usando espectros de RMN de ^1H de plasma seminal, Mumcu e colaboradores construíram modelos metabonômicos capazes de segregar homens AS normal daqueles com alterações em pelo menos um dos parâmetros (120).

Embora o sêmen seja o biofluido mais utilizado nos estudos sobre infertilidade masculina, outros biofluidos e tecidos também podem ser investigados através da metabonômica. Utilizando cromatografia líquida com espectroscopia de massa para avaliar o metaboloma urinário de homens inférteis, Zhang e colaboradores identificaram 37 metabólitos que poderiam ser usados no diagnóstico de homens com infertilidade idiopática (121). Além disso, aplicando RMN de ^1H para avaliar os metabólitos presentes em fragmentos de biópsia testicular, Aaronson e colaboradores determinaram os perfis metabonômicos de cada tipo de padrão histológico, diferenciando amostras que continham espermatozoides viáveis de amostras com padrão de Síndrome Sertoli-Only, onde não há espermatozoides maduros (122). Participantes com espermatogênese normal apresentaram níveis elevados de fosfatidilcolina, substância relacionada a estados de alta proliferação celular, quando comparados a homens com Síndrome Sertoli-Only.

1.5 OUTRAS ESTRATÉGIAS “ÔMICAS”

A base para a hipótese de que a varicocele é capaz de induzir mudanças no metaboloma seminal vem dos estudos avaliando processos fisiológicos anteriores a produção dos metabólitos. Lima e colaboradores demonstraram que adolescentes oligospermicos com varicocele exibem expressão diminuída da proteína de choque térmico A2 nos espermatozoides (123). Esta proteína possui uma função protetora contra o dano causado pelo excesso de calor, desta forma, níveis diminuídos de proteínas de choque térmico colocam os espermatozoides em maior risco de dano devido à elevação da temperatura causada pela varicocele, levando a um aumento da apoptose, e consequente oligospermia (124). Esta hipótese é corroborada pelo fato de que genes responsáveis pela indução da apoptose, tais como genes do sistema Fas-FasL e o gene BAX, também têm sua expressão aumentada em pacientes com varicocele (125, 126).

Segundo Zalata e colaboradores, o gene do receptor de andrógenos é subexpresso em pacientes inférteis com varicocele (127), o que produz um efeito negativo direto na espermatogênese, já que a ação da testosterona intratesticular nas células de Sertoli é condição *sine qua non* para a diferenciação das células germinativas (1). O gene da roporina, uma proteína da capa fibrosa do flagelo espermático associada à motilidade dos espermatozoides, possui expressão diminuída em homens portadores de varicocele (128). De forma interessante, após a varicocelectomia, os níveis de RNA mensageiro da roporina aumentam paralelamente à melhora da motilidade dos espermatozoides (128).

Polimorfismos genéticos também participam da fisiopatologia da varicocele e impactam na resposta dos pacientes à varicocelectomia. Glutathione S Transferases são proteínas que atuam na depuração de espécies reativas de oxigênio, diminuindo o estresse oxidativo (129). Polimorfismos dos genes dessa família de proteínas estão relacionados à melhora dos parâmetros seminais após a varicocelectomia (130). Homens homozigóticos para os alelos normais destes genes possuem uma maior chance de melhora do espermograma com a correção cirúrgica quando comparados com homens portadores de alelos mutantes (130). Polimorfismos deste gene também estão relacionados a uma menor capacidade antioxidativa em homens com varicoceles, o que explicaria um maior dano à espermatogênese, e, consequentemente, uma menor resposta à varicocelectomia (131).

Por último, Yang e colaboradores utilizaram sequenciamento completo do exoma de 11 homens com varicocele e reportaram que mutações nos genes AAMP, SPINT1, e MKI67

estavam fortemente associadas à presença desta condição (132). Porém quando uma análise de caso-controle foi realizada, não houve associação entre essas mutações com a presença de infertilidade por varicocele. Estes achados são mais um exemplo da complexidade da fisiopatologia da varicocele, onde a simples presença desta condição não implica no desenvolvimento de infertilidade, sendo provavelmente necessárias alterações adicionais em outros mecanismos da espermatogênese para tal.

Alguns estudos têm sugerido que o número de cópias do DNA mitocondrial dos espermatozoides pode ter impacto na fertilidade masculina (133). Nesta linha, Gabriel e colaboradores demonstraram que homens inférteis com varicocele apresentavam um número maior de cópias do DNA mitocondrial do que controles férteis, e que a cirurgia de varicocelectomia causava uma diminuição deste número (134). Uma maior quantidade de mitocôndrias por espermatozoide seria sugestiva de apoptose incompleta durante a espermatogênese, ou de um mecanismo de compensação para uma baixa atividade da cadeia respiratória (133). Por demais, mutações, polimorfismos e deleções de genes da cadeia respiratória também foram relacionadas à infertilidade causada por varicoceles, provavelmente devido à produção exagerada de radicais oxidantes (135, 136). É fundamental destacar que lesões no genoma mitocondrial podem ser provocadas pelo estresse oxidativo induzido pela varicocele. Isso ocorre porque o DNA mitocondrial é muito sensível aos danos causados pelos radicais livres e tem uma capacidade limitada de reparo em comparação com o DNA somático. Isso resulta em um ciclo prejudicial no qual o estresse oxidativo inicial desencadeia mais estresse oxidativo, prejudicando a produção de espermatozoides (133, 136).

A epigenética, área que estuda alterações da expressão gênica por mecanismos que não envolvam alteração no DNA, também tem sido largamente utilizada para o estudo da fisiopatologia da varicocele. Metilação do DNA espermático, microRNAs, e modificações da cromatina são os mecanismos epigenéticos mais conhecidos.

O DNA encontrado nos espermatozoides maduros naturalmente apresenta um nível elevado de metilação, e vários estudos têm correlacionado a diminuição da metilação no DNA dos espermatozoides com problemas de fertilidade em homens (137, 138). Da mesma forma, foi observada uma hipometilação global do DNA dos espermatozoides em pacientes com varicocele, o que foi associado ao aumento da fragmentação do DNA espermático (139). Além disso, o gene que codifica a enzima metilenotetrahidrofolato redutase possui polimorfismos que estão relacionados à ocorrência de varicocele (140). A variante 1298AA desse gene é mais comum em portadores de varicocele e está associada a alterações nos parâmetros seminais

(140). Esta enzima desempenha um papel crucial na regulação da metilação do DNA, o que pode ser um dos mecanismos que explicam a hipometilação do DNA dos espermatozoides em homens com varicocele (141). Importante notar que essa hipometilação global do DNA espermático não parece ser revertida pela varicocelectomia, o que pode explicar a falta de melhora em alguns pacientes submetidos a esse procedimento (142). No entanto, esse mesmo estudo indicou que a varicocelectomia pode melhorar aspectos relacionados a outros fatores epigenéticos, como a fragmentação e a composição de protamina no DNA dos espermatozoides.

A presença de varicocele também causa alterações no conteúdo de RNAs não codificantes nos espermatozoides. Pesquisas que investigaram os microRNAs revelaram uma redução nos níveis do miR-15a, que desempenha um papel de proteção contra o estresse oxidativo (143, 144). Em contrapartida, a expressão de RNAs longos não codificantes relacionados à hipóxia está diminuída nos espermatozoides de homens inférteis com varicocele (145). Além do mais, os autores também descreveram uma correlação positiva entre esses RNAs e marcadores de estresse oxidativo, reforçando o papel da hipóxia na fisiopatologia da varicocele.

No que diz respeito às alterações na estrutura da cromatina espermática, um fator relacionado à infertilidade, observou-se que homens inférteis com varicocele têm uma maior proporção de espermatozoides com desorganização da cromatina em comparação com homens férteis, e varicocelectomia parece ser capaz de reverter essa desorganização (146). No entanto, os mecanismos subjacentes a essas mudanças ainda não são completamente compreendidos.

Além das alterações genéticas e epigenéticas associadas à varicocele, estudos utilizando várias técnicas para análise do proteoma seminal também mostraram que o conjunto de proteínas expressas por pacientes com varicocele sofre modificações (147). Em estudos envolvendo adolescentes, pesquisadores compararam as composições do proteoma do sêmen de três grupos de adolescentes: controle normospérmicos, varicocele normospérmicos e varicocele oligospérmicos, revelando diferenças significativas entre eles (148, 149). Utilizando eletroforese bidimensional de proteínas em gel, Zylbersztein e colaboradores encontraram expressão elevada de proteínas relacionadas à apoptose no grupo de adolescentes com varicocele e oligospermia (149). Em uma outra análise proteômica através de espectroscopia de massa em tandem, o mesmo grupo demonstrou um aumento da expressão da proteína secretória rica em cistina 3, um componente das respostas imune e inflamatória (148). Em um estudo semelhante, que comparou o proteoma de homens inférteis com varicocele e homens férteis, foram identificadas diminuições em proteínas relacionadas ao metabolismo de ácidos nucleicos,

transporte molecular e metabolismo lipídico (150). Outra pesquisa, que utilizou eletroforese bidimensional de proteínas e espectrometria de massa, identificou 15 proteínas seminais expressas de forma diferente entre homens com varicocele oligospermicos e homens normospermicos sem varicocele. Destacam-se entre os achados a diminuição das proteínas de choque térmico, que desempenham um papel protetor contra os efeitos das altas temperaturas, e a escassez relativa de proteínas relacionadas ao metabolismo energético e aos mecanismos antioxidantes (151).

O impacto da varicocelectomia no proteoma humano também tem sido objeto de pesquisa. O proteoma seminal de homens inférteis submetidos à varicocelectomia mudou em direção à normalidade, comparado com o perfil proteômico antes da cirurgia, o qual indicava uma resposta ao estresse (152). Além disso, as proteínas que oferecem proteção contra os danos do estresse oxidativo e do calor excessivo retornaram aos seus níveis normais após a varicocelectomia, reforçando os benefícios desse procedimento (153). Em um estudo subsequente do mesmo grupo, o proteoma seminal após 12 meses da varicocelectomia apresentou uma diminuição da expressão de proteínas relacionadas a um estado inflamatório quando comparado com o pré-operatório (154).

O impacto da lateralidade no proteoma dos espermatozoides através do uso de cromatografia líquida / espectroscopia de massa foi avaliado por Agarwal e colaboradores. Os autores identificaram perfis proteômicos seminais diferentes de acordo com a lateralidade da varicocele, unilateral versus bilateral (21). Posteriormente, o mesmo grupo comparou o proteoma espermático de homem com varicocele unilateral e bilateral em relação a acetilação proteica, encontrando 135 proteínas com padrões de acetilação diferentes entre os grupos (155). Em ambos os estudos, a proteínas identificadas eram relacionadas ao metabolismo mitocondrial e estresse oxidativo, ressaltando a importância dessas vias moleculares para a fisiopatologia da varicocele.

Todas estas alterações genéticas, epigenéticas e proteômicas sugerem que o metaboloma de homens inférteis com varicocele também se encontra alterado com relação ao metaboloma de homens férteis. Porém, a literatura carece de estudos do metaboloma em homens com varicocele. Nosso grupo publicou o primeiro trabalho sobre o tema (56), utilizando dados espectrais de RMN de ^1H obtidos de soro de sêmen em conjunto com ferramentas de estatística multivariada, conseguimos criar modelos capazes de diferenciar com alta acurácia homens saudáveis de homens com varicocele independentemente do status de fertilidade. A capacidade destes modelos em discriminar esses dois grupos com valores de sensibilidade, especificidade,

VPP e VPN significativos corroboram os achados clínicos, que evidenciaram que os homens portadores de varicocele possuem alterações clínicas decorrentes desta condição, tais como diminuição do volume testicular e alterações dos parâmetros seminais, quando comparados com controles saudáveis. Além disso, também criamos um modelo capaz de diferenciar homens férteis com varicocele de homens inférteis com varicocele com uma acurácia de 96,7% após validação cruzada. Este achado ressalta o caráter heterogêneo da doença e tem uma importância clínica ainda maior, pois, embora os homens inférteis portadores de varicocele usualmente apresentem espermograma alterado e hipotrofia testicular, atualmente nenhum exame complementar é capaz de discriminar com acurácia estes dois grupos (59). Este modelo pode ser de grande utilidade na prática clínica, ajudando na condução de homens que tenham varicocele e desejam saber sobre o seu potencial fértil mesmo antes de terem iniciado as tentativas de concepção. Este estudo também identificou 19 metabólitos importantes para a segregação dos grupos: valina, 3-hidroxi-butanato, lactato, GABA, citrato, glicosídeos, n-acetil-tirosina, caprato, isoleucina, uridina, glutamina, tirosina, arginina, 2-hidroxi-3-metilvalerato, leucina, alanina, metanol, glicose e glicerol-3-fosfolina.

Utilizando cromatografia líquida com espectrometria de massa, Zhang e colaboradores fizeram análises metabômica direcionada e não direcionada para investigar os diferentes metabólitos no plasma seminal de homens férteis saudáveis, e homens inférteis com varicocele antes e depois da varicocelectomia (156). Os autores demonstraram que a varicocele afeta significativamente o metaboloma do sêmen, e que a VM pode reverter essas alterações. Além disso, foram caracterizados oito metabólitos que podem ser úteis para distinguir pacientes com varicocele de indivíduos normais: ácido pirrolidono-carboxílico, cabergolina, ácido 4-hidroxi-2-butenóico-gama-lactona, cloreto de dimetil dialquilamônio, L-acetilcarnitina, Na-hexanoil-Nb-inositoltriptofano, glicocolato de sódio e 5-L-glutamyl-aurina (156).

Recentemente, tanto a metabômica quanto a metabonômica têm sido utilizadas com o propósito de não só diagnosticar, mas também de prognosticar a evolução de diferentes patologias (104). Empregando a estratégia de perfil metabólico, Zhang e colaboradores demonstraram que a concentração plasmática de kynurenina, um metabólito do triptofano, em pacientes com infarto agudo do miocárdio pode atuar como um marcador metabólico para a análise prognóstica desta condição (157). De forma similar, aplicando cromatografia líquida com espectrometria de massa, Ding e colaboradores criaram três modelos de prognóstico de mortalidade hospitalar baseados em biomarcadores para pacientes sépticos que podem ser empregados para orientar o tratamento da sepse (158). Além disso, uma extensa revisão

sistemática sobre o uso de metabolômica pra o estudo de diabetes gestacional evidenciou que níveis alterados de metabólitos de nucleotídeos no início da gestação podem estar associados a um risco aumentado de diabetes gestacional (159). Sendo assim, se estratégias de estudo do metaboloma podem ser utilizadas para criar ferramentas de prognóstico para diversas patologias, e levando em consideração que a varicocele induz alterações no metaboloma seminal, pode-se advogar que o uso metabonômica também seja capaz de fornecer informações úteis para o prognóstico dessa condição.

1.6 ANÁLISE MULTIVARIADA

A quimiometria consiste no emprego de métodos matemáticos e estatísticos para estudos químicos, possuindo três grandes áreas de atuação: planejamento de experimentos, reconhecimento de padrões, e calibração multivariada. Devido à complexidade dos dados obtidos a partir dos experimentos utilizando RMN de ^1H , ferramentas de estatística multivariada são necessárias para que informações úteis sejam extraídas a partir dos espectros. Como o presente estudo é baseado no reconhecimento de padrões químicos, métodos quimiométricos que permitam análises exploratórios e discriminante permitem aumentar o poder e a velocidade de análise dos perfis espectroscópicos, facilitando a detecção de padrões(160).

A análise de componentes principais (PCA, do inglês *Principal Component Analysis*) é um dos métodos estatísticos mais utilizados na quimiometria devido à sua capacidade de reduzir uma grande quantidade de variáveis correlacionadas em um número menor de variáveis não correlacionadas. A PCA é um método não-supervisionado, no qual a informação sobre os grupos aos quais as amostras pertencem não é fornecida como variável para a construção do modelo. Deste modo a PCA é capaz de extrair e exibir variações sistemáticas dos dados, fornecendo uma visão geral de todos os dados das amostras, com o objetivo de facilitar o reconhecimento de agrupamentos, tendências e dispersões naturais e sem viés entre as amostras (160, 161). Nos estudos utilizando a metabonômica, a PCA é comumente a primeira ferramenta de estatística multivariada empregada, realizando uma análise exploratória inicial cujos resultados podem ser utilizados para direcionar análises subsequentes (162).

A análise discriminante (DA, do inglês *Discriminants Analysis*) é uma ferramenta de reconhecimento de padrões que se fundamenta na construção de modelos de classificação baseados em uma variável categórica (163). Para o seu uso, os grupos devem ser conhecidos

previamente, portanto, as ferramentas de DA são consideradas métodos supervisionados (162). A grande vantagem da DA é permitir a identificação das variáveis que mais se sobressaem na discriminação das classes (161). A seleção dessas variáveis é coordenada por testes estatísticos, como o lambda de Wilks, qui-quadrado e correlação canônica. Dentre estes, o lambda de Wilks determina se há diferença entre as médias de um conjunto de variáveis dependentes, definindo assim quais as variáveis dependentes mais importantes na segregação dos grupos (164). Portanto, os formalismos DA são mais adequados para a criação de modelos capazes de discriminar os diferentes grupos de participantes.

Para o processamento de problemas que envolvem a identificação de grupos, a Análise Discriminante Linear, ou LDA (do inglês *Linear Discriminants Analysis*) é uma das mais utilizadas. A LDA permite a determinação de uma superfície ou limiar de decisão no espaço, para que as amostras de uma classe sejam segregadas de um lado do eixo de decisão, assim como as amostras da outra classe sejam agrupadas no outro (163). A racionalização do formalismo LDA se baseia na imposição para um grupo de amostras o valor 1 para a variável de resposta, enquanto para o outro é atribuído o valor de 0 (85).

Tendo em vista as possíveis variações dos metabólitos seminais inerentes a cada indivíduo, há uma preocupação de que a alta sensibilidade da metabonômica faça com que essas variações não relacionadas aos fatores estudados sejam capturadas como variações de significância estatística. O uso de ferramentas de estatística multivariada supracitadas permite obter modelos adequados eliminando variações inerentes aos indivíduos e sem significância clínica (44, 87).

Uma etapa fundamental para a construção dos diversos modelos de DA citados anteriormente é a utilização de ferramentas de validação que são capazes de estimar o grau de confiança dos modelos. Um dos testes de validação mais comumente usados é o LOOCV (do inglês *leave-one-out cross validation*). Neste método, uma modelagem inicial é feita, de forma que as variáveis mais importantes para a discriminação são selecionadas. Após esta etapa, um número n modelos são criados, removendo uma amostra por vez, porém usando as variáveis previamente selecionadas. Então, o modelo criado a partir de cada novo grupo é utilizado para testar a classificação da amostra excluída. A eficiência desses modelos na classificação das amostras é usada para estimar a confiabilidade do modelo original (165).

2 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

O tratamento das varicoceles é recomendado para homens inférteis que apresentam varicoceles palpáveis e parâmetros anormais de SA (69). A varicocelectomia microcirúrgica é o tratamento padrão-ouro para varicoceles, devido à sua alta eficácia e baixa morbidade quando comparada com outras opções de tratamento (80, 94). No entanto, nem todo homem infértil que se submete à varicocelectomia melhorará os parâmetros da AS ou alcançará a gravidez natural após o procedimento.

Como já demonstrado anteriormente pelo nosso grupo, modelos metabonômicos criados a partir de dados espectrais de RMN de ^1H de soro de sêmen podem ser utilizados para discriminar homens saudáveis férteis de homens férteis com varicocele e de homens inférteis com varicocele (93). Deste modo, é possível utilizar-se desta mesma abordagem para a criação de modelos que sejam capazes de segregar homens inférteis com varicocele que melhorem seu potencial fértil após VM daqueles que não o façam.

Tendo em vista que o método metabonômico possui caráter não-invasivo, de simples coleta, além de utilizar biofluidos que já são colhidos durante a avaliação rotineira do paciente com varicocele, facilitando sua implementação na prática clínica, o estudo do perfil metabonômico de pacientes com varicocele pode se tornar no futuro um exame útil no prognóstico, e na modificação de protocolos de tratamento e acompanhamento destes pacientes.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Criar modelos metabonômicos para o predizer o desfecho clínico de homens inférteis submetidos à varicocelectomia microcirúrgica para fins de melhora dos parâmetros do espermograma e de gravidez natural.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

A partir de dados espectrais de RMN de ^1H obtidos de soro de sêmen, construir modelos metabonômicos, para a segregação de homens inférteis com varicocele de acordo com a melhora do espermograma após varicocelectomia microcirúrgica

A partir de dados espectrais de RMN de ^1H obtidos de soro de sêmen, construir modelos metabonômicos, para a segregação de homens inférteis com varicocele de acordo com o sucesso em ter uma gravidez natural após varicocelectomia microcirúrgica

Identificar os metabólitos ou classes de metabólitos com a maior importância para a discriminação dos grupos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 LOCAL DO ESTUDO

Pacientes atendidos no Ambulatório de Urologia do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (IMIP). Para o estudo, foram considerados pacientes com diagnóstico de infertilidade e que tinham varicocele palpável, independente do grau da varicocele e que seriam submetidos a varicocelectomia microcirúrgica

4.2 TIPO DE ESTUDO

Clínico

Prospectivo

Analítico

4.3 SELEÇÃO

4.3.1 Critérios de inclusão

Adultos, com até 50 anos de idade, com diagnóstico de infertilidade definido pela ausência de concepção ao final de 12 meses com atividade sexual regular e sem nenhum emprego de métodos contraceptivos, com varicocele clínica, independente do grau da varicocele, com programação de tratamento por varicocelectomia microcirúrgica

Foi optado por selecionar participantes com até 50 anos de idade devido à crescente prevalência de patologias prostáticas, tais como hiperplasia prostática benigna e câncer de próstata, a partir desta idade. Estas patologias podem alterar o metaboloma do sêmen, gerando um fator de confundimento.

4.3.2 Critérios de exclusão

- Adultos que estejam inseridos em alguma modalidade de tratamento de infertilidade,

mesmo que em estágio inicial.

- Adultos que apresentem outra condição que cause diretamente infertilidade masculina, ou cuja parceira apresente alguma causa conhecida de infertilidade feminina.

- Adultos que já tenham feito tratamentos de infertilidade ou que apresentem alguma condição que cause infertilidade diretamente.

- Para os grupos gravidez e não gravidez: Participantes com azoospermia.

4.4 PROCEDIMENTOS

4.4.1 Procedimentos Técnicos

Anamnese e Exame Físico:

Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Apêndice 1**), todos os participantes foram submetidos a uma anamnese completa e exame físico geral com foco no sistema geniturinário pelo mesmo examinador, um urologista especialista em fertilidade masculina. Resumidamente, com os participantes em pé, calçados e com temperatura ambiente de 25° C, o volume testicular foi medido através do uso de um orquidômetro de Prader, e o grau de varicocele foi definido de acordo com a escala de Dubin & Amelar (62). O peso e altura foram medidos utilizando a mesma balança mecânica com estadiômetro.

Coleta:

A coleta dos biofluidos foi realizada no laboratório de análises clínicas do IMIP, através de venopunção periférica para as amostras de sangue e de masturbação para as amostras de sêmen. Neste mesmo laboratório foram realizados os exames de espermograma, seguindo as diretrizes do Manual de Referência em Análise Seminal da Organização Mundial de Saúde de 2010, e o processamento do sêmen. O sêmen foi centrifugado a 3000 rpm durante 15 minutos para precipitação dos componentes celulares, e o soro do sêmen foi coletado e armazenado a - 20 °C até análise. Importante ressaltar que a coleta de tais biofluidos já faz parte da investigação de rotina dos pacientes com varicocele e infertilidade, bem como dos pacientes que são submetidos à vasectomia.

Exames complementares:**Sêmen:**

Todas as análises seminais foram realizadas no laboratório de análises clínicas do IMIP, seguindo as diretrizes do Manual de Referência em Análise Seminal da Organização Mundial de Saúde de 2010 (166), sendo avaliados os seguintes parâmetros: volume, cor, pH, viscosidade, tempo de liquefação, concentração de leucócitos, concentração de espermatozoides, motilidade dos espermatozoides, e morfologia dos espermatozoides. A AS foi realizada antes da VM e três meses após o procedimento. O tempo de três meses para reavaliação da análise seminal foi determinado baseado no tempo de duração de um ciclo de espermatogênese, que é de aproximadamente 74 dias (1).

Perfil hormonal:

Todas as análises dos níveis dos hormônios sexuais foram realizadas no laboratório de análises clínicas do IMIP. Amostras de sangue venoso foram coletadas de cada participante entre as 7 e 11 horas, após jejum noturno. Os níveis de testosterona total (intervalo de referência: 206 a 1200 ng/dL), estradiol (intervalo de referência: 11,6 a 41,2 pg/mL), hormônio folículo estimulante (FSH) (intervalo de referência: 1,4 a 18,1 mUI/mL), hormônio luteinizante (LH) (intervalo de referência: 1,5 a 9,3 mUI/mL) e proteína de ligação ao hormônio sexual (faixa de referência: 10 a 57 nmol/L) foram medidos em tempo real por um imunoquimioluminescência de fase sólida com o uso de um analisador automatizado (ADVIA Centauro XP, Siemens Healthcare Diagnostics, www.siemens-healthineers.com). Os níveis de albumina (faixa de referência: 3,4 a 4,8 g/dL) foram medidos usando um ensaio colorimétrico (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, EUA) com um autoanalisador (Architect® c16000, Abbott Diagnostics, www.corelaboratory.abbott). Os níveis de testosterona livre (intervalo de referência: 49,9 a 199,9 pg/mL) foram calculados usando a fórmula validada de Vermeulen e cols(167).

Ultrassonografia escrotal com Doppler colorido:

Todos os exames ultrassonográficos foram realizados por um único radiologista experiente (5 anos de formação), utilizando-se de um mesmo aparelho de Ultrassom GE Logiq S8 (GE Healthcare, Wauwaosa, WI, EUA) para todos os participantes, sendo o transdutor linear de alta frequência (SL 15-8-MHz GE Healthcare, Wauwaosa, WI, EUA), utilizado para as imagens convencionais modo B e color Doppler. Todos os exames tiveram como propedêutica a avaliação dos testículos direito e esquerdo separadamente. O laudo padrão tradicional incluiu

informações como volume testicular, ecotextura, presença ou não de microlitíase, descrição dos epidídimos, e o padrão de vascularização do parênquima testicular, itens avaliados em posição supina para avaliar o tamanho dos testículos, diâmetro e refluxo da varicocele.

Ressonância Magnética Nuclear de ^1H :

Espectros de RMN de ^1H foram adquiridos na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco utilizando as amostras de sêmen coletadas antes da cirurgia. Os pesquisadores que realizaram a análise de RMN de ^1H foram cegos para a classificação de cada paciente. Após a liquefação do sêmen, as amostras foram centrifugadas a 2218 g por 15 minutos para separar os espermatozoides do plasma seminal sobrenadante. As amostras de plasma seminal foram mantidas congeladas a -20°C até a análise de RMN de ^1H . Após o descongelamento, 400 μL de plasma seminal foram adicionados a 200 μL de D₂O (água deuterada), e cada amostra foi submetida à análise de RMN de ^1H separadamente e aleatoriamente. Espectros de RMN de ^1H foram adquiridos usando o espectrômetro VNMRS400 operando a 400 MHz. A sequência de pulsos Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) com pré-saturação do sinal de água foi utilizada da seguinte forma: janela espectral de 4,8 kHz, tempo de saturação de 2,0 segundos, tempo de aquisição de 1,704 segundos, temperatura de 27°C , 88 ciclos, tau igual a 0,0004 segundos, bigtau igual a 0,07 segundos e 128 varreduras. Cada espectro foi adquirido utilizando-se tempo total igual a 10,0 minutos e 4 segundos. O alargamento de linha utilizado foi de 0,3 Hz, as distorções basais e de fase foram corrigidas manualmente e o sinal atribuído ao grupo metileno do citrato (δ 2,65 ppm) foi utilizado como referência de deslocamento químico interno. Utilizando o software MestreNova 9.0, a região dos espectros entre δ 8,01 e 0,69 ppm foi dividida em regiões iguais a 0,04 ppm. A região entre δ 5,50 e 4,50 ppm foi excluída por conter sinal residual de água. Uma matriz com 29 linhas (casos) e 160 variáveis (bins de espectros de RMN de ^1H mais duas variáveis de classe) foi construída e submetida à análise multivariada.

Varicocelectomia microcirúrgica:

Após preparo do campo cirúrgico, é realizada uma incisão transversa na logo abaixo do anel inguinal externo (subinguinal). Após dissecação do tecido subcutâneo e da fáscia de Scarpa, o cordão espermático (CE) é isolado com a ajuda de um dreno de Penrose. Após abertura do mesmo, com o uso de um microscópio cirúrgico com aumento de 8-15x, as artérias espermáticas são identificadas e isoladas com o auxílio de uma solução da papaverina e do uso de um sonar microdoppler. A seguir, todas as veias do plexo pampiniforme serão ligadas com fio algodão 3-0 ou cauterizadas. Os vasos linfáticos e nervos do CE também são isolados e preservados.

Após o fechamento do CE, veias cremastéricas dilatadas são ligadas, o testículo é exposto através da incisão, e as veias gubernaculares ligadas ou cauterizadas. A síntese é realizada em 3 planos, fáscia de Scarpa, tecido subcutâneo e pele, utilizando fios absorvíveis. Um curativo estéril será aplicado sobre a incisão fechada. Em caso de varicoceles bilaterais, o mesmo procedimento é realizado do lado oposto.

4.4.2 Procedimentos analíticos

O tamanho da amostra foi definido de acordo com nosso estudo anterior que criou modelos metabonômicos capazes de segregar, com alta acurácia, homens férteis com varicocele de homens inférteis com varicocele utilizando uma amostra de 31 participantes (59). Levando em consideração uma perda de seguimento de 45%, foi determinado um tamanho de amostra de 45 pacientes.

Após a investigação diagnóstica, todos os participantes com um ou mais parâmetros da AS alterados foram submetidos à varicocelectomia subinguinal poupadora de artérias e linfáticas (79) por um único cirurgião. Durante o seguimento, os participantes foram orientados a coletar uma nova amostra de sêmen para AS três meses após o procedimento. Os participantes foram acompanhados até os 24 meses ou até a gravidez natural, caso tenha ocorrido antes desse período.

Os participantes foram divididos em grupos com base na melhora dos parâmetros da AS (grupos melhora *versus* não melhora) e se alcançaram ou não a gravidez natural (grupos gravidez *versus* não gravidez) após a VM durante o seguimento. Definimos melhora como um aumento de pelo menos 20% na TMC da AS pós-operatória quando comparada à linha de base. Essa definição foi baseada em várias publicações relatando que a TMC é um melhor preditor de gravidez do que outros parâmetros convencionais da AS (13, 14, 168, 169). A gravidez foi definida como a presença de um saco gestacional com batimentos cardíacos (170). Participantes com azoospermia e investigação genética normal foram incluídas na análise com base na melhora dos parâmetros de SA, mas excluídas da análise com base na gravidez devido à baixa probabilidade de gravidez natural evidenciada pela literatura (171).

Os dados foram descritos em números absolutos ou frequências, a medida de tendência central utilizada foi a mediana e o intervalo interquartil devido ao pequeno tamanho da amostra. Para investigar a distribuição dos dados demográficos e clínicos entre os grupos, foram

realizados testes univariados utilizando o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). O teste U de Mann-Whitney foi utilizado para comparar variáveis contínuas entre 2 grupos. Além disso, para comparar as variáveis contínuas do preoperatório versus pós-operatório do mesmo grupo, utilizou-se o teste de Wilcoxon. As variáveis categóricas foram comparadas pelo teste exato de Fischer. Um valor de P de $< 0,05$ foi definido como nível de significância estatística.

Modelos metabonômicos foram construídos com dois objetivos diferentes: 1- diferenciar o grupo melhora (M) do grupo não melhora (NM) (modelo MxNM); 2- segregar o grupo gravidez (G) do grupo não gravidez (NG) (modelo GxNG). Os modelos metabonômicos da Análise Discriminante Linear (LDA) foram realizados utilizando o software TIBCO Data Science/Statistica 12 (StatSoft Europe, Hamburgo, Alemanha). Os modelos desenvolvidos pela LDA foram construídos utilizando 5 variáveis selecionadas por meio do lambda de Wilks, e validadas por LOOCV. O teste exato de Fischer foi utilizado para avaliar as funções discriminantes. Foi realizado utilizando-se 23 e 5 graus de liberdade para o modelo MxNM, e 17 e 5 graus de liberdade para o modelo (GxNG). Os resultados foram apresentados utilizando-se matrizes de confusão com valores de sensibilidade, especificidade e acurácia. Além disso, criamos um modelo que combinava uma função discriminante do modelo MxNM com uma função discriminante do modelo GxNG. As amostras foram projetadas no espaço definido por essas duas funções discriminantes. Arbitrariamente, definimos dois pontos de corte para classificação: amostras que apresentaram valores de escore inferiores a 145 na função discriminante do MxNM e menores que 156 na função discriminante GxNG, foram classificadas como amostras com alta probabilidade de sucesso após VM.

Os deslocamentos químicos identificados pelos modelos como as variáveis mais importantes para a discriminação grupal foram atribuídos aos metabólitos utilizando o Human Metabolome Database (HMDB) (172) e o trabalho de Paiva e cols. (173).

4.4.3 Procedimentos éticos

4.4.3.1 Aprovação pelo comitê de ética do CCS

O projeto foi aprovado pelo comitê de ética do CCS em 23/03/2017 sob o parecer número 1.978.735 (**Anexo A**), e pelo comitê de ética do IMIP em 22/05/2017 sob o parecer número 2.075.028 (**Anexo B**).

4.4.3.2 Proteção dos indivíduos envolvidos no estudo

Os riscos estimados foram relativos à queixa de dor ou desconforto durante a coleta de sangue e ao constrangimento ou mal-estar social dos sujeitos para coleta do sêmen e entrega do material. Mais uma vez destacando que a coleta de sêmen para espermograma já é rotina na avaliação de paciente com varicocele e de pacientes que serão submetidos a vasectomia.

Para minimizar os constrangimentos causados pela coleta das amostras, foi designado um profissional habilitado no laboratório de análises clínicas do IMIP-PE, para facilitar a coleta das amostras, separar e encaminhá-las diretamente ao Laboratório da Central Analítica do DQF. Os dados dos participantes foram mantidos sob controle, não permitindo a divulgação com a identificação dos pacientes, garantindo a privacidade quanto aos dados confidenciais envolvidos.

4.4.3.3 Benefícios para indivíduos e sociedade

Os benefícios esperados para os indivíduos e sociedade estão relacionados com o possível desenvolvimento de um método prognóstico dos resultados da VM não invasivo, seguro, e que poderá evitar o procedimento cirúrgicos em casos de baixa chance de sucesso, bem como possibilitará uma melhor orientação destes indivíduos sobre o seu potencial fértil após o procedimento.

4.4.3.4 Benefícios para ciência

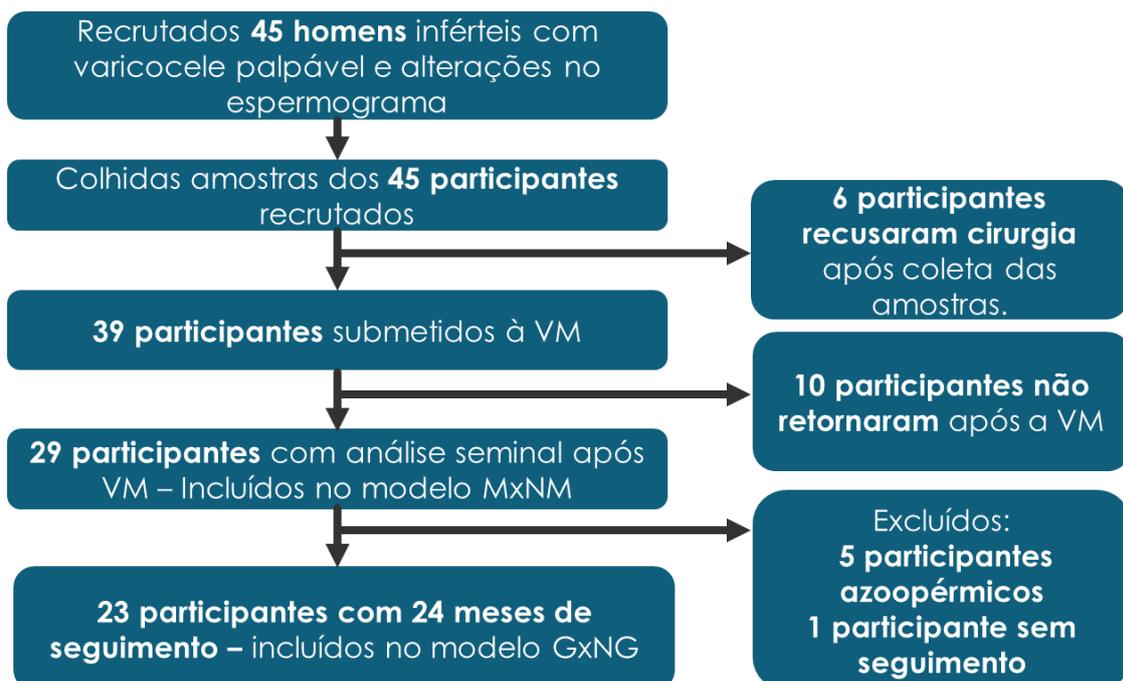
Os benefícios para a ciência são o maior entendimento sobre a fisiopatologia da varicocele e ampliação do uso da RMN de ^1H para a prática clínica.

5 RESULTADOS

5.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

Foram recrutados 45 homens inférteis com varicocele e parâmetros anormais da AS, no entanto, seis homens recusaram a cirurgia após a coleta da amostra de sêmen basal e 10 homens não retornaram após a cirurgia. Assim, apenas 29 participantes que realizaram VM e tinham dados de AS pós-operatória disponíveis foram incluídos na análise com base na melhora dos parâmetros de AS. Destes, cinco participantes com azoospermia e um participante que perdeu o seguimento após a AS pós-operatória foram excluídos da análise baseada na gravidez. Dezoito (62%) participantes preencheram os critérios de melhora e foram incluídos no grupo M; os 11 participantes restantes foram incluídos no grupo NM. Além disso, 10 participantes alcançaram gravidez natural durante o acompanhamento e foram incluídas no grupo G; enquanto os 13 participantes que não engravidaram as parceiras foram incluídos no grupo NG. A mediana do tempo para gravidez natural no grupo G foi de 3 (3,17) meses. O fluxograma do recrutamento de pacientes está exposto na **Figura 8**.

FIGURA 8 - Fluxograma dos participantes do estudo



As características clínicas e demográficas dos grupos estão apresentadas na **Tabela 1**. Não houve diferença quanto à distribuição dos participantes dos grupos G e NG entre os grupos M e NM (**Tabela 2**). A maioria dos parâmetros não mostrou diferenças entre os grupos M e NM; no entanto, os participantes do grupo NM apresentaram níveis mais baixos de LH. Houve dois (11%) participantes azoospermicos no grupo M três (27%) no grupo NM ($p = 0,33$).

5.2 DADOS DAS ANÁLISES SEMINAIS PRÉ-OPERATÓRIAS

Os participantes incluídos no grupo G apresentaram maior contagem total de espermatozoides basais ($21,8 \times 10^6$ espermatozoides vs. $5,0 \times 10^6$ espermatozoides; $p < 0,05$) e TMC ($7,1 \times 10^6$ vs. $1,2 \times 10^6$ espermatozoides; $p < 0,05$) quando comparado ao grupo NG. Além disso, os parceiros dos participantes do grupo G eram mais jovens do que os do grupo NG (28 vs. 32 anos; $p < 0,05$). Não houve diferenças significativas em relação aos achados intraoperatórios entre os grupos (**Tabela 3**).

TABELA 1 - Características clínicas e demográficas dos grupos

| | Não melhora | Melhora | p | Não gravidez | Gravidez | p |
|---|--------------------|-------------------|----------|---------------------|-------------------|----------|
| Número n (%) | 11 (38%) | 18 (62%) | NA | 13 (56%) | 10 (44%) | NA |
| Idade (anos), mediana (IIQ) | 32 (29, 37) | 31 (27, 36) | 0.62§ | 34 (28, 38) | 30 (27, 33) | 0.20§ |
| Idade da parceira (anos), mediana (IIQ) | 32 (29, 34) | 30 (27, 33) | 0.45§ | 32 (30, 35) | 28 (27, 30) | <0.05§ |
| Idade da puberdade (anos), mediana (IIQ) | 14 (14, 15) | 14 (13, 15) | 0.38§ | 14 (13, 15) | 14 (12, 15) | 0.55§ |
| Infertilidade primária (%) | 100% | 94% | 1.00† | 92% | 100% | 1.00† |
| Volume testicular direito pelo exame físico (mL), mediana (IIQ) | 15 (12, 20) | 15 (11, 20) | 0.83§ | 15 (11, 20) | 18 (14, 20) | 0.57§ |
| Volume testicular esquerdo pelo exame físico (mL), mediana (IIQ) | 10 (10, 15) | 11 (8, 20) | 0.70§ | 12 (6, 15) | 11 (10, 20) | 0.55§ |
| Varicocele bilateral (%) | 64% | 61% | 0.66† | 54% | 70% | 0.66† |
| Varicocele esquerda grau 1 (%) | 9% | 22% | | 16% | 20% | |
| Varicocele esquerda grau 2 (%) | 36% | 33% | | 38% | 20% | |
| Varicocele esquerda grau 3 (%) | 55% | 45% | 0.74† | 46% | 60% | 0.74† |
| Varicocele direita grau 1 (%) | 70% | 50% | | 33% | 86% | |
| Varicocele direita grau 2 (%) | 15% | 33% | | 33% | 14% | |
| Varicocele direita grau 3 (%) | 15% | 17% | 0.17† | 33% | 0% | 0.17† |
| Concentração espermática (10 ⁶ /mL), mediana (IIQ) | 5.0 (0.0, 11.0) | 3.0 (0.5, 11.5) | 0.89§ | 3.0 (0.0, 9) | 9.5 (3.0, 14.5) | 0.05§ |
| Contagem total de espermatozoides (10 ⁶ /mL), mediana (IIQ) | 12.5 (0.0, 36.0) | 8.5 (2.1, 21.8) | 0.82§ | 5.0 (2.7, 23.8) | 21.8 (13.5, 59.8) | <0.05§ |
| Motilidade progressiva (%), mediana (IIQ) | 26 (13, 42) | 26 (9, 36) | 0.70§ | 20 (10, 33) | 35 (25, 43) | 0.08§ |
| Total de espermatozoides móveis progressivos (10 ⁶ /mL), mediana (IIQ) | 1.9 (0.0, 23.0) | 1.7 (0.1, 7.1) | 0.68§ | 1.2 (0.2, 6.9) | 7.1 (2.4, 23.7) | <0.05§ |
| Morfologia (%), mediana (IIQ) | 5.5 (4.0, 10.0) | 9.0 (4.5, 11.0) | 0.46§ | 6.0 (3.5, 10.0) | 9.5 (4.5, 15.0) | 0.27§ |
| Volume (mL), mediana (IIQ) | 3.5 (2.5, 4.0) | 2.3 (1.5, 4.3) | 0.34§ | 2.5 (1.5, 3.8) | 4.0 (1.5, 6.0) | 0.15§ |
| pH, mediana (IIQ) | 7.5 (7.0, 8.0) | 7.0 (7.0, 8.0) | NA | 7.5 (7.0, 8.0) | 7.5 (7.0, 8.0) | NA |
| Testosterona (ng/dL), mediana (IIQ) | 393 (311, 604) | 347 (285, 553) | 0.25§ | 312 (257, 654) | 408 (334, 518) | 0.92§ |
| Testosterona livre (ng/dL), mediana (IIQ) | 8.8 (6.2, 11.1) | 7.6 (5.2, 11.1) | 0.45§ | 7.3 (4.5, 11.4) | 8.2 (6.3, 10.2) | 0.71§ |
| Estradiol (pg/mL), mediana (IIQ) | 25.9 (12.3, 35.1) | 36.4 (22.1, 40.8) | 0.18§ | 36.9 (25.1, 35.9) | 26.2 (20.3, 38.9) | 0.30§ |
| FSH (mUI/mL), mediana (IIQ) | 6.6 (4.5, 9.1) | 8.2 (4.0, 10.9) | 0.91§ | 6.3 (4.0, 9.1) | 6.8 (3.9, 8.4) | 0.80§ |
| LH (mUI/mL), mediana (IIQ) | 6.8 (4.8, 8.0) | 4.2 (2.7, 5.5) | <0.05§ | 4.7 (2.7, 7.0) | 4.2 (3.3, 5.8) | 0.85§ |
| Volume testicular direito pela ultrassonografia (mL), mediana (IIQ) | 12.6 (10.0, 15.5) | 11.1 (9.1, 13.8) | 0.31§ | 12.5 (8.9, 15.2) | 12.2 (9.8, 18.9) | 0.92§ |
| Volume testicular esquerdo pela ultrassonografia (mL), mediana (IIQ) | 9.7 (9.0, 10.9) | 9.7 (6.7, 12.4) | 0.78§ | 9.8 (8.0, 11.9) | 10.5 (8.1, 16.1) | 0.75§ |
| Diâmetro da varicocele direita pelo Doppler(cm), mediana (IIQ) | 2.5 (2.0, 4.1) | 2.8 (2.3, 3.2) | 0.91§ | 2.8 (2.0, 3.5) | 2.7 (2.3, 3.2) | 0.96§ |
| Diâmetro da varicocele esquerda pelo Doppler(cm), mediana (IIQ) | 4.0 (2.5, 4.6) | 3.6 (3.0, 4.2) | 0.68§ | 4.0 (2.7, 4.5) | 3.6 (3.1, 4.0) | 0.92§ |

Legenda: FSH = hormônio folículo estimulante; IMC = índice de massa corporal; LH = hormônio luteinizante; NA – não aplicável
†pelo teste exato de Fisher; §pelo teste de Mann Whitney;

TABELA 2 - Distribuição dos participantes entre os grupos

| Grupos | Melhora | Não melhora | p |
|---------------------------------|---------|-------------|------|
| Gravidez | 8 | 2 | 0.17 |
| Não Gravidez | 8 | 5 | |
| Excluídos / Perda de seguimento | 2 | 4 | |

Legenda: Pelo teste exato de Fisher

TABELA 3 - Achados intraoperatórios

| Parâmetro | Não melhora (n=11) | Melhora (n=18) | p [§] | Não gravidez (n=13) | Gravidez (n=10) | p [§] |
|---|-----------------------|-------------------|----------------|------------------------|--------------------|----------------|
| Diâmetro da maior veia esquerda (cm) | 4.0 (3.0–4.0) | 4.0 (3.0, 4.0) | 1.00 | 4.0 (3.5, 4.0) | 3.0 (3.0, 4.0) | 0.29 |
| Diâmetro da maior veia direita (cm) | 4.0 (3.0–4.0) | 3.0 (2.5, 4.0) | 0.36 | 3.0 (2.5, 4.0) | 3.0 (2.3, 4.0) | 0.73 |
| Número de veias ligadas à esquerda | 10 (8–13) | 11 (8, 16) | 0.34 | 12 (9, 13) | 11 (8, 18) | 0.73 |
| Número de veias ligadas à direita | 13 (7–15) | 9 (8, 13) | 0.41 | 10 (8, 13) | 12 (8, 17) | 0.62 |
| Número de artérias preservadas à esquerda | 2.0 (1.0–2.0) | 1.0 (1.0, 1.5) | 0.17 | 1.0 (1.0, 2.0) | 1.0 (1.0, 1.0) | 0.15 |
| Número de artérias preservadas à direita | 1.0 (1.0–2.0) | 1.0 (1.0, 2.0) | 1.00 | 2.0 (1.0, 2.0) | 1.0 (1.0, 2.5) | 0.36 |

Legenda: Mediana (Intervalo Interquartil); [§] teste de Mann-Whitney

5.3 DADOS DAS ANÁLISES SEMINAIS PÓS-OPERATÓRIAS

Quando os parâmetros de AS pós-operatória foram comparados entre os grupos, o grupo M apresentou maior concentração espermática, contagem total de espermatozoides, motilidade progressiva, TMC e morfologia do que o grupo NM (**Tabela 4**). Em relação às alterações da TMC desde o pré-operatório, o grupo M teve um aumento mediano de 12.2×10^6 espermatozoides, enquanto o grupo NM teve uma diminuição mediana de $-1,7 \times 10^6$ espermatozoides ($p < 0.05$). Quando as mudanças foram analisadas por meio de porcentagem, essa diferença foi ainda destacada, o grupo M demonstrou um aumento de 275% (variação de 94% a 34000%) e o grupo NM apresentou uma diminuição de -59% (variação de -97% a -34%) ($p < 0.05$). As comparações dos parâmetros da AS pós-operatória entre os grupos G e NG revelaram que o grupo G apresentou maior motilidade, TMC e morfologia progressivas (**Tabela 4**).

Um participante desenvolveu um hematoma que foi tratado de forma conservadora, enquanto outro participante teve uma artéria testicular direita ligada, mas outras 3 artérias testiculares direitas foram preservadas. Ambos os participantes com complicações foram classificados no grupo NM; em relação à gestação, a participante com hematoma foi classificada no grupo NG, enquanto a participante com artéria testicular direita ligada foi classificada no grupo G.

TABELA 4 - Dados das análises seminais pós-operatórias. Comparação entre os grupos

| Parâmetro | Não melhora | Melhora | p | Não gravidez | Gravidez | p |
|---|-----------------------------------|--------------------------------------|------------------|------------------------------------|--------------------------------------|------------------|
| Número n (%) | 11 (38%) | 18 (62%) | NA | 13 (56%) | 10 (44%) | NA |
| Tempo desde a cirurgia (dias), mediana (IIQ) | 120 (100, 155) | 105 (90, 150) | 0.36§ | 120 (90, 155) | 105 (90, 225) | 0.69§ |
| Concentração espermática (10⁶/mL), mediana (IIQ) | 1.0 (0.1, 8.0)[†] | 16.0 (4.5, 23.5)[†] | <0.05§ | 6.0 (0.9, 23.5) | 16.0 (8.5, 23.5) [†] | 0.21§ |
| Contagem total de espermatozoides (10⁶/mL), mediana (IIQ) | 5.0 (0.1, 30)[†] | 41.0 (13.8, 67.8)[†] | <0.05§ | 20.0 (3.7, 50.3) | 45.0 (33.0, 67.8) [†] | <0.05§ |
| Motilidade progressiva (%), mediana (IIQ) | 26 (3, 36) | 39 (27, 50)[†] | <0.05§ | 28 (16, 38) | 43 (37, 51)[†] | <0.05§ |
| Total de espermatozoides móveis progressivos (10⁶/mL), mediana (IIQ) | 0.2 (0.0, 9.7)[†] | 14.7 (5.5, 34.2)[†] | <0.05§ | 3.5 (0.2, 13.3)[†] | 22.1 (13.8, 34.2)[†] | <0.05§ |
| Morfologia (%), mediana (IIQ) | 5.0 (2.5, 8.5) | 9.0 (5.0, 10.0) | <0.05§ | 5.0 (4.0, 9.0) | 10.0 (9.0, 12.0) | <0.05§ |
| Volume (mL), mediana (IIQ) | 2.5 (1.7, 5.0) | 2.5 (2.0, 4.5) | 0.73§ | 2.0 (1.5, 4.5) | 3.3 (2.3, 5.5) | 0.11§ |
| pH, mediana (IIQ) | 8.0 (7.0, 8.0) | 7.5 (7.0, 8.0) | NA | 8.0 (7.3, 8.0) | 8.0 (7.3, 8.0) | NA |
| Mudança do Total de espermatozoides móveis progressivos (10⁶/mL), mediana (IQR) | -1.7 (-9.1, 0.0) | 12.2 (2.6, 26.3) | <0.05§ | 1.1 (-1.0, 12.2) | 19.1 (-2.0, 26.3) | 0.27§ |
| Mudança do Total de espermatozoides móveis progressivos (%), mediana (IQR) | -59 (-97, -34) | 275 (94, 1400) | <0.05§ | 1 (0, 11) | 1 (0, 6) | 0.97§ |

Legenda: § Teste de Mann-Whitney; † Diferente do pré-operatório

5.4 COMPARAÇÕES ENTRE DADOS DAS ANÁLISES SEMINAIS PRÉ E PÓS-OPERATÓRIAS

Como esperado, as mudanças entre os parâmetros de AS pré- e pós-operatórias revelaram padrões diferentes para os grupos M e NM. Os pacientes do grupo M apresentaram melhora significativa na concentração espermática ($3.0 \times 10^6/\text{mL}$ vs. 16.0×10^6 espermatozoides/mL; $p < 0.05$), contagem total de espermatozoides (8.5×10^6 vs. 41.0×10^6 espermatozoides; $p < 0.05$), motilidade progressiva (26% vs. 39%; $p < 0.05$) e TMC (1.7×10^6 vs. 14.7×10^6 espermatozoides; $p < 0.05$) (**Tabela 5**). Por outro lado, o grupo NM teve diminuição significativa na concentração de espermatozoides (5.0×10^6 vs. 1.0×10^6 espermatozoides/mL; $p < 0.05$), contagem total de espermatozoides (12.5×10^6 vs. 5.0×10^6 espermatozoides; $p < 0.05$) e TMC (1.9×10^6 vs. 0.2×10^6 espermatozoides; $p < 0.05$), (**Tabela 6**).

TABELA 5 - Comparação entre os parâmetros da análise seminal pré- e pós-operatória do Grupo melhora ($n=18$)

| Parâmetro | Pré-operatório | Pós-operatório | p [§] |
|--|-----------------|-------------------|----------------|
| Concentração espermática ($10^6/\text{mL}$), mediana (IIQ) | 3.0 (0.5, 11.5) | 16.0 (4.5, 23.5) | <0.05 |
| Contagem total de espermatozoides ($10^6/\text{mL}$), mediana (IIQ) | 8.5 (2.1, 21.8) | 41.0 (13.8, 67.8) | <0.05 |
| Motilidade progressiva (%), mediana (IIQ) | 26 (9, 36) | 39 (27, 50) | <0.05 |
| Total de espermatozoides móveis progressivos ($10^6/\text{mL}$), mediana (IIQ) | 1.7 (0.1, 7.1) | 14.7 (5.5, 34.2) | <0.05 |
| Morfologia (%), mediana (IIQ) | 9.0 (4.5, 11.0) | 9.0 (5.0, 10.0) | 0.24 |
| Volume (mL), mediana (IIQ) | 2.3 (1.5, 4.3) | 2.5 (2.0, 4.5) | 0.33 |
| pH, mediana (IIQ) | 7.0 (7.0, 8.0) | 7.5 (7.0, 8.0) | NA |

Legenda: § teste de Wilcoxon

TABELA 6 - Comparação entre os parâmetros da análise seminal pré- e pós-operatória do Grupo não melhora ($n=11$)

| Parâmetro | Pré-operatório | Pós-operatório | p [§] |
|--|------------------|----------------|----------------|
| Concentração espermática ($10^6/\text{mL}$), mediana (IIQ) | 5.0 (0.0, 11.0) | 1.0 (0.1, 8.0) | <0.05 |
| Contagem total de espermatozoides ($10^6/\text{mL}$), mediana (IIQ) | 12.5 (0.0, 36.0) | 5.0 (0.1, 30) | <0.05 |
| Motilidade progressiva (%), mediana (IIQ) | 26 (13, 42) | 26 (3, 36) | 0.46 |
| Total de espermatozoides móveis progressivos ($10^6/\text{mL}$), mediana (IIQ) | 1.9 (0.0, 23.0) | 0.2 (0.0, 9.7) | <0.05 |
| Morfologia (%), mediana (IIQ) | 5.5 (4.0, 10.0) | 5.0 (2.5, 8.5) | 0.68 |
| Volume (mL), mediana (IIQ) | 3.5 (2.5, 4.0) | 2.5 (1.7, 5.0) | 0.27 |
| pH, mediana (IIQ) | 7.5 (7.0, 8.0) | 8.0 (7.0, 8.0) | NA |

Legenda: § teste de Wilcoxon

As análises dos parâmetros de AS pós-operatórios dos grupos G e NG não revelaram diferenças em relação à linha de base no grupo NG, enquanto o grupo G teve um aumento significativo na TMC em relação à linha de base (7.1×10^6 vs. 22.1×10^6 espermatozoides; $p < 0,05$) (Tabelas 7 e 8).

TABELA 7 - Comparação entre os parâmetros da análise seminal pré- e pós-operatória do Grupo não gravidez ($n=13$)

| Parâmetro | Pré-operatório | Pós-operatório | p [§] |
|--|-----------------|------------------|----------------|
| Concentração espermática ($10^6/\text{mL}$), mediana (IIQ) | 3.0 (0.0, 9) | 6.0 (0.9, 23.5) | 0.26 |
| Contagem total de espermatozoides ($10^6/\text{mL}$), mediana (IIQ) | 5.0 (2.7, 23.8) | 20.0 (3.7, 50.3) | 0.09 |
| Motilidade progressiva (%), mediana (IIQ) | 20 (10, 33) | 28 (16, 38) | 0.30 |
| Total de espermatozoides móveis progressivos ($10^6/\text{mL}$), mediana (IIQ) | 1.2 (0.2, 6.9) | 3.5 (0.2, 13.3) | 0.16 |
| Morfologia (%), mediana (IIQ) | 6.0 (3.5, 10.0) | 5.0 (4.0, 9.0) | 1.03 |
| Volume (mL), mediana (IIQ) | 2.5 (1.5, 3.8) | 2.0 (1.5, 4.5) | 0.43 |
| pH, mediana (IIQ) | 7.5 (7.0, 8.0) | 8.0 (7.3, 8.0) | NA |

Legenda: § teste de Wilcoxon

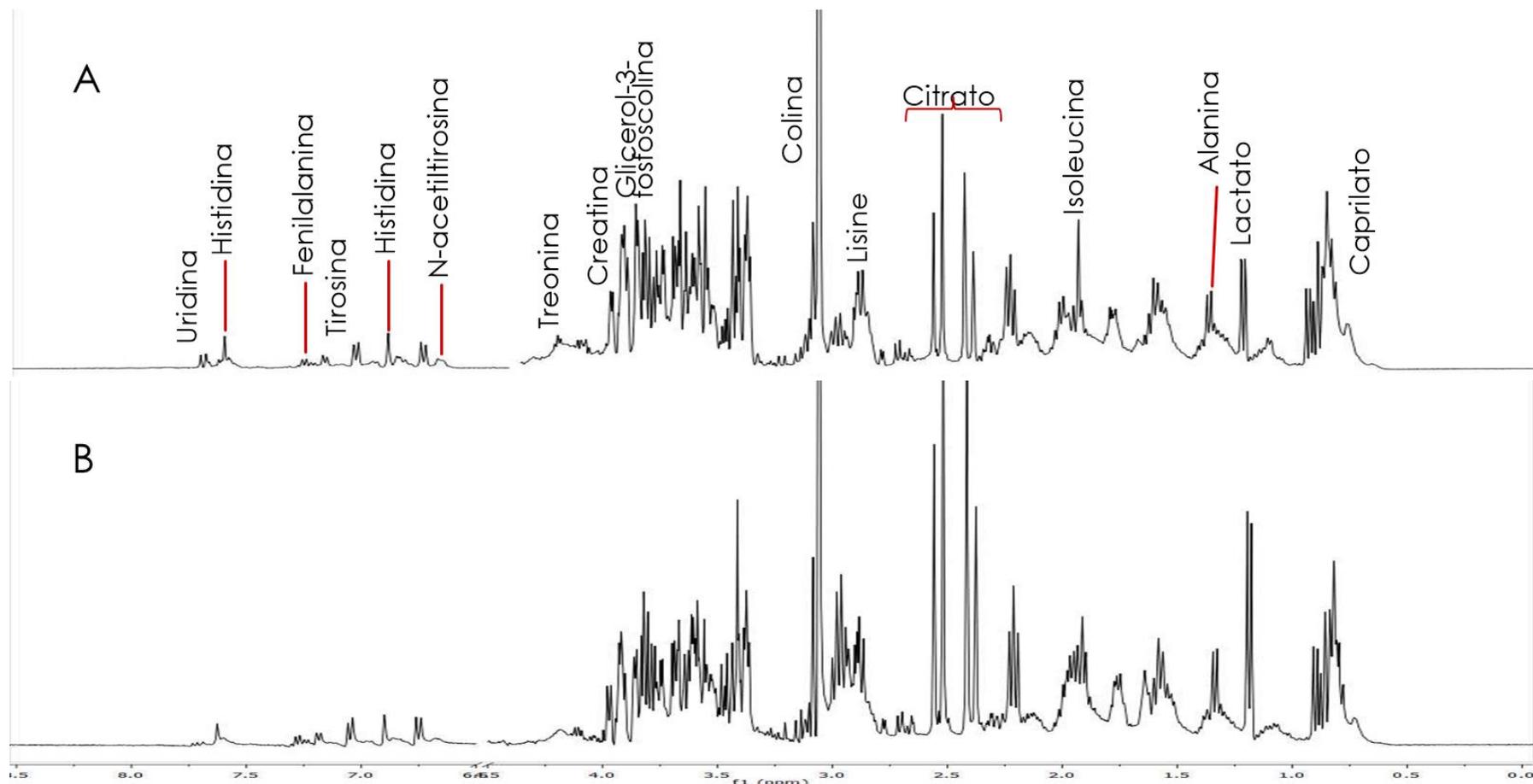
TABELA 8 - Comparação entre os parâmetros da análise seminal pre- e pós-operatória do Grupo gravidez ($n=10$)

| Parâmetro | Preoperatório | Posoperatório | p [§] |
|--|------------------------|--------------------------|-----------------|
| Concentração espermática ($10^6/\text{mL}$), mediana (IIQ) | 9.5 (3.0, 14.5) | 16.0 (8.5, 23.5) | 0.25 |
| Contagem total de espermatozoides ($10^6/\text{mL}$), mediana (IIQ) | 21.8 (13.5, 59.8) | 45.0 (33.0, 67.8) | 0.06 |
| Motilidade progressiva (%), mediana (IIQ) | 35 (25, 43) | 43 (37, 51) | 0.13 |
| Total de espermatozoides móveis progressivos ($10^6/\text{mL}$), mediana (IIQ) | 7.1 (2.4, 23.7) | 22.1 (13.8, 34.2) | <0.05 |
| Morfologia (%), mediana (IIQ) | 9.5 (4.5, 15.0) | 10.0 (9.0, 12.0) | 0.57 |
| Volume (mL), mediana (IIQ) | 4.0 (1.5, 6.0) | 3.3 (2.3, 5.5) | 0.84 |
| pH, mediana (IIQ) | 7.5 (7.0, 8.0) | 8.0 (7.3, 8.0) | NA |

Legenda: § teste de Wilcoxon

5.5 DADOS ESPECTRAIS E ANÁLISES MULTIVARIADAS

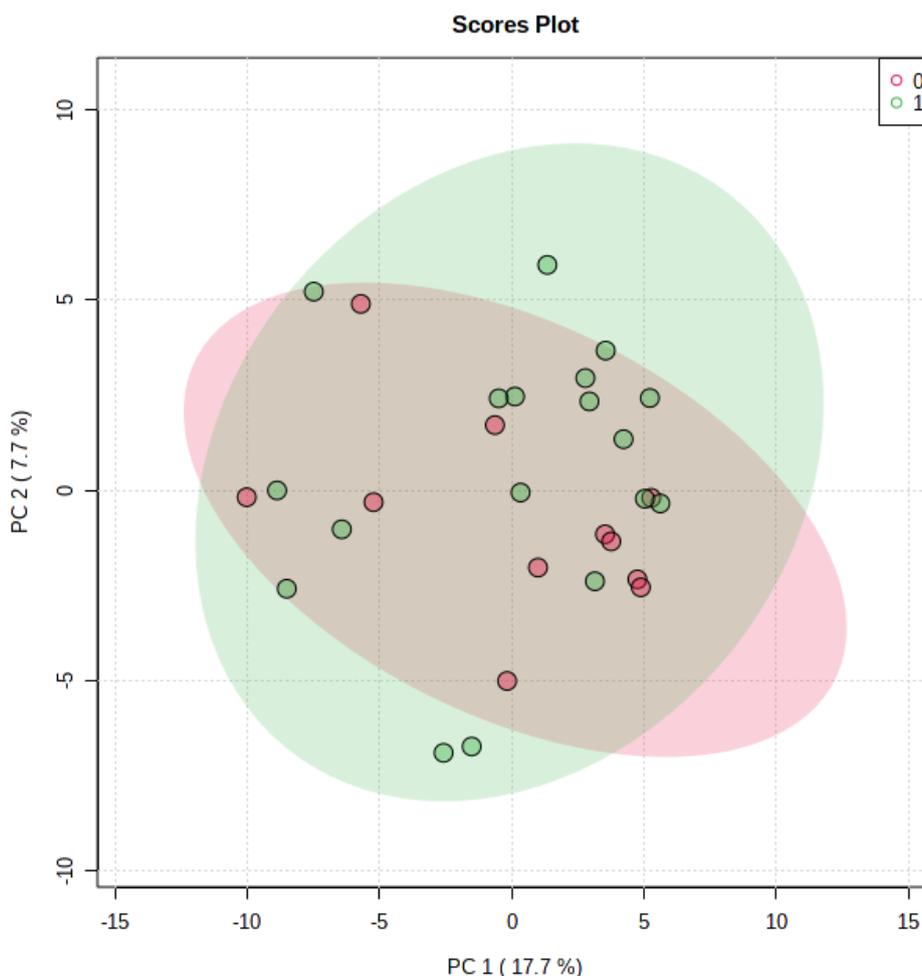
Exemplos de espectros de RMN de ^1H de plasma seminal são mostrados na **Figura 9**. As áreas sob os picos estão associadas à concentração de metabólitos ponderados pelo número de núcleos de hidrogênio em cada ambiente químico. Alguns picos tiveram seus respectivos compostos químicos atribuídos no espectro.

FIGURA 9 - Exemplos de espectros de RMN de ^1H de plasma seminal

Legenda: Exemplos de espectros de RMN de ^1H de plasma seminal (400 MHz, Presat-CPMG, D_2O). A) Amostra de grupo melhora e B) Amostra de grupo não melhora. Alguns sinais são atribuídos no espectro.

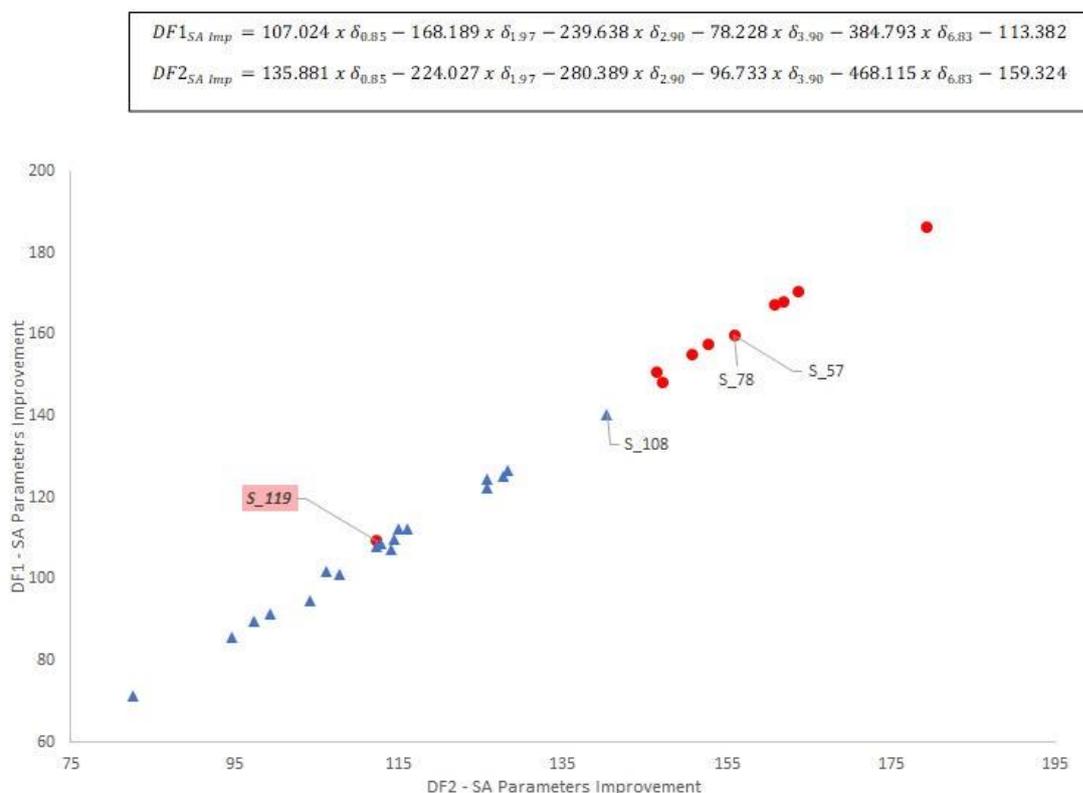
A análise exploratória por meio da PCA não mostrou agrupamento nas classes estudadas (**Figura 10**). Todavia, a PCA também não identificou amostras anômalas (*outliers*). A fim de otimizar os resultados referentes à discriminação entre os grupos M e NM, e os grupos G e NG, optou-se por utilizar a Análise Discriminante Linear, um método supervisionado. As funções discriminantes foram construídas utilizando-se cinco variáveis selecionadas utilizando o lambda de Wilks. As variáveis selecionadas para o modelo metabonômico LDA MxNM apresentaram os seguintes desvios químicos δ (ppm): 0.85, 1.97, 2.89, 3.90 e 6.83. A **Figura 11** mostra as Funções Discriminantes (DF) obtidas para o modelo metabonômico MxNM e projeção de amostras no espaço definido por estas DF.

FIGURA 10 - Análise de Componentes Principais



Legenda: Pontos verdes representam as amostras do grupo melhora e os pontos vermelhos as amostras do grupo não melhora.

FIGURA 11 - Gráfico de scores do modelo metabonômico LDA MxNM



Legenda: Gráfico de scores do modelo metabonômico LDA MxNM ($F_{23,5} = 10,35$ $P < 0,001$) usando 11 amostras do grupo melhora (diamantes azuis) e 18 amostras do grupo não melhora (pontos vermelhos). DF 1 e 2 são as Funções Discriminantes obtidas para o modelo metabonômico MxNM.

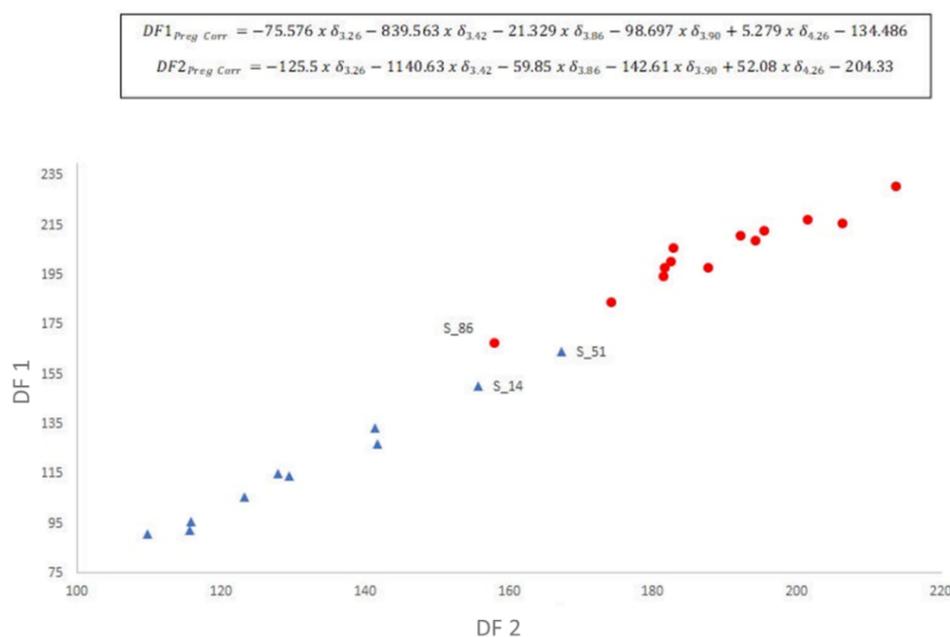
Baixos scores nas funções discriminantes levam a amostra a ser classificada como parte do grupo M, enquanto scores altos levam à classificação no grupo NM. A **Tabela 9** apresenta a matriz de confusão com os resultados do modelo MxNM obtidos após o LOOCV. As funções discriminantes foram avaliadas pelo teste exato de Fischer utilizando 29 e 5 graus de liberdade, apresentando $F_{23,5} = 10,35$ e $p < 0,001$. Os resultados apresentados na matriz de confusão indicam que o modelo MxNM apresentou valores de sensibilidade, especificidade e acurácia iguais a 94.4%, 90.9% e 93.1%, respectivamente.

TABELA 9 - Matriz de confusão – Modelo metabonômico LDA NxNM

| Modelo | Grupos | | |
|-------------|-------------------|-----------------------|--------------|
| | Melhora (n=18) | Não melhora (n=11) | |
| Melhora | 17 | 1 | p < 0.001 |
| Não Melhora | 1 | 10 | |

Legenda: Matriz de confusão – Modelo metabonômico LDA NxNM utilizando cinco variáveis selecionadas a partir de dados espectrais de RMN ^1H obtidos a partir de plasma seminal de 29 voluntários.

Utilizamos a mesma abordagem para criar um modelo para segregar os grupos G e NG. As variáveis selecionadas para o modelo metabonômico LDA GxNG apresentaram os seguintes desvios químicos δ (ppm): 3.26; 3.42; 3.86; 3.90; 4.26. As duas funções discriminantes e a projeção das amostras no espaço definidas por estas DF estão representadas na **Figura 12**.

FIGURA 12 - Gráfico de *scores* do modelo metabonômico LDA GxNG

Legenda: Gráfico de *scores* do modelo metabonômico LDA GxNG ($F_{17,5} = 27,95$ p-valor < 0.001) utilizando 10 amostras do grupo gravidez (triângulos azuis) e 13 amostras do grupo não gravidez (pontos vermelhos). DF 1 e 2 são as Funções Discriminantes obtidas para o modelo metabonômico GxNG.

A significância estatística do modelo foi avaliada pelo teste exato de Fischer, com 17 e 5 graus de liberdade, resultando em $F_{17,5} = 27,95$ ($p < 0.001$). O modelo foi validado por meio do LOOCV, e classificou corretamente todas as amostras, conforme apresentado na matriz de confusão (**Tabela 10**).

TABELA 10 - Matriz de confusão – Modelo metabonômico LDA GxNG

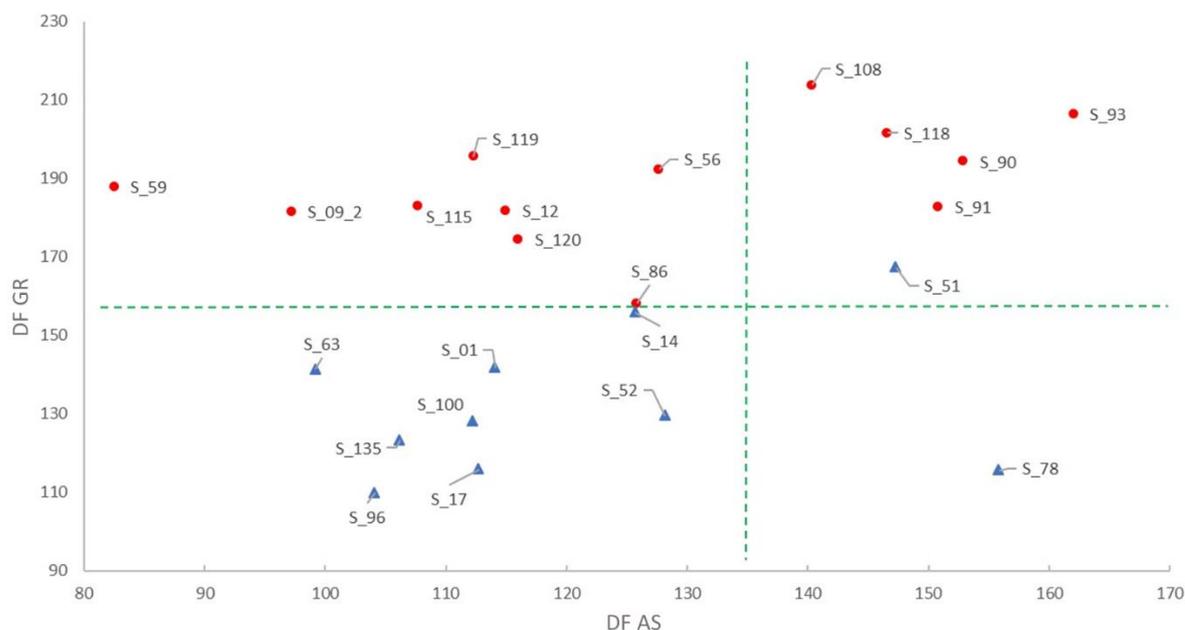
| Modelo | Grupos | | |
|--------------|--------------------|------------------------|--------------|
| | Gravidez (n=10) | Não gravidez (n=13) | |
| Gravidez | 10 | 0 | p < 0.001 |
| Não gravidez | 0 | 13 | |

Legenda: Matriz de confusão – Modelo metabonômico LDA GxNG utilizando cinco variáveis selecionadas a partir de dados espectrais de RMN ^1H obtidos a partir de plasma seminal de 23 voluntários.

A **Figura 13** mostra a projeção das amostras em um sistema de coordenadas formado por uma das funções discriminantes do modelo MxNM e uma das funções do modelo GxNG, e seus respectivos valores de corte.

Deve-se notar na **Figura 13** que as amostras 14, 51 e 86 são plotadas em uma região limítrofe entre os dois grupos. No caso das amostras 14 e 86, que pertencem a grupos diferentes, elas praticamente se sobrepõem no sistema de coordenadas definido pelas duas funções discriminantes. Isso sugere uma classificação duvidosa. Na validação cruzada, observou-se que o modelo GxNG classifica erroneamente apenas a amostra 31.

FIGURA 13 - Projeção das amostras no sistema de coordenadas definido pelas Funções Discriminantes para predição de melhoria dos parâmetros da análise seminal e gravidez



Legenda: Os círculos vermelhos são amostras de participantes que não conseguiram engravidar dentro de 24 meses após a cirurgia; os triângulos azuis são amostras de participantes que conseguiram engravidar sua parceira. As linhas tracejadas são os valores de corte para cada função discriminante. O DF AS é uma função discriminante obtida para o modelo metabonômico MxNM, e o DF GR é uma função discriminante obtida para o modelo metabonômico GxNG.

Os deslocamentos químicos selecionados e utilizados nas funções discriminantes do modelo MxNM foram atribuídos ao caprilato (δ 0.85 ppm), isoleucina (δ 1.97 ppm), creatina (δ 3.90 ppm) e N-acetiltirosina (NAT, δ 6.83 ppm). O sinal a δ 2.90 ppm não foi identificado. Em relação ao modelo GxNG, identificamos os seguintes metabólitos: carnitina (δ 3.42 ppm), N-acilcarnitina (NAC, δ 3.86 ppm), creatina (δ 3.90 ppm), treonina (δ 4.26 ppm). O sinal a δ 3.26 ppm pode ser atribuído à arginina ou glicose ou mesmo N-óxido de trimetilamina. A **Tabela 11** apresenta a intensidade média por grupo das variáveis utilizadas para a obtenção do escore de cada amostra nas funções discriminantes de ambos os modelos. Quando foram realizadas análises univariadas para avaliar a capacidade de cada variável de discriminar independentemente os grupos, verificou-se que nenhuma variável apresentou poder discriminatório para o modelo

MxNM. No entanto, para a modelagem de correlação gestacional, três variáveis apresentaram poder discriminatório, porém com níveis de acurácia significativamente inferiores ao modelo multivariado.

TABELA 11 - Estudo univariado a partir de variáveis utilizadas nas funções discriminantes

| δ (ppm) | Metabólitos | Intensidade Média Relativa | | p* | Acurácia - Modelo univariado (após LOOCV) |
|----------------|-------------------|----------------------------|--------------------|-------|---|
| | | Grupo Melhora | Grupo Não melhora | | |
| 0.85 | Caprilato | 0.1700 | 0.2265 | 0.688 | - |
| 1.97 | Isoleucina | 0.1134 | 0.0967 | 0.673 | - |
| 2.90 | Não identificado | -0.4493 | -0.4974 | 0.153 | - |
| 3.90 | Creatina | 1.0572 | 1.1119 | 0.680 | - |
| 6.83 | N-acetilrosina | -0.5242 | -0.5890 | 0.085 | - |
| | | Grupo Gravidez | Grupo Não gravidez | | |
| 3.26 | Não identificado | -0.0913 | -0.2774 | 0.017 | 70% |
| 3.42 | Carnitina | -0.4563 | -0.5137 | 0.016 | 78% |
| 3.86 | N-acetilcarnitina | 0.9012 | 0.9494 | 0.171 | - |
| 3.90 | Creatina | 1.0606 | 1.1041 | 0.758 | - |
| 4.26 | Treonina | -0.1841 | -0.0194 | 0.016 | 78% |

Legenda: *teste t de Student. Construção do modelo apenas para variáveis que apresentaram valor de P menor que 0.05. LOOCV = leave-one-out-cross validation

6 DISCUSSÃO

Neste trabalho, nós descrevemos, pela primeira vez, o uso de modelos metabonômicos para segregar homens inférteis com varicocele clínica de acordo com os desfechos da VM. Esses modelos preliminares foram capazes de diferenciar os homens que tiveram melhorias na AS, bem como aqueles que alcançaram a gravidez natural após a VM. Em nosso estudo, 62% dos participantes demonstraram melhora do TMC três meses após a VM. Essa taxa de melhora é similar ao relatado por outros autores (64 a 81%) (62, 85, 86). Além disso, houve uma diferença clinicamente significativa entre os grupos M e NM em relação às mudanças no TMC desde o pré-operatório até a AS pós-operatória (aumento do grupo M de 275% vs. diminuição do grupo NM de 59%), o que reforça os resultados opostos da VM nos participantes de cada grupo. Em relação à gravidez natural, 44% dos participantes conseguiram engravidar suas parceiras durante o período de acompanhamento de 24 meses após o procedimento. A literatura revela taxas de gravidez semelhantes após a varicocelectomia, variando de 26% a 60% (62, 85, 174), e com tempo médio de 6 meses (62). Curiosamente, o grupo G teve um TMC pós-operatório de $22,1 \times 10^6$ espermatozoides, enquanto o grupo NG teve um TMC pós-operatório de $3,5 \times 10^6$ espermatozoides. Esses achados estão de acordo com o ponto de corte de menos de 5×10^6 de TMC como prognóstico desfavorável para gravidez natural proposto por Hamilton e colaboradores (13).

Também demonstramos que os participantes cujos parâmetros de AS melhoraram após o procedimento apresentaram perfil de metaboloma seminal pré-operatório diferente daqueles que não melhoraram. Isso se soma aos achados de nosso estudo anterior mostrando composições diferenciais do metaboloma seminal em homens férteis e inférteis com varicocele (59). Além disso, aplicando o formalismo estatístico LDA aos dados espectrais de RMN de ^1H pré-operatórios de amostras de sêmen de homens inférteis com varicocele, criamos um modelo que distinguiu os homens cujos parâmetros de AS melhoraram após VM daqueles sem melhora, com acurácia de 93%. Ademais, também desenvolvemos um modelo metabonômico que discriminava os homens que engravidaram suas parceiras naturalmente após a VM daqueles que não o fizeram. A relação entre os diferentes perfis de metaboloma seminal encontrados em homens inférteis com varicocele e os diferentes resultados da VM ressaltam a natureza heterogênea da varicocele.

Diversos estudos têm tentado prever os resultados da varicocelectomia utilizando parâmetros como idade, IMC, tamanho da varicocele, parâmetros convencionais de AS, níveis de hormônios sexuais e marcadores bioquímicos (62, 95, 97, 175, 176). No entanto, o poder preditivo destes parâmetros quando usados individualmente ainda é controverso. Além disso, o único nomograma criado com esse objetivo mostrou-se inferior em um estudo de validação externa (98, 99). Assim, a metabonômica baseada em RMN de ^1H pode ter aplicação clínica, auxiliando no aconselhamento de homens inférteis com varicocele quanto ao seu prognóstico após a cirurgia.

Foram identificados quatro principais metabólitos responsáveis pela segregação dos grupos M e NM: caprilato (δ 0.85 ppm), isoleucina (δ 1.97 ppm), creatina (δ 3.90 ppm) e NAT (δ 6.83 ppm). Os níveis seminais desses metabólitos não discriminam os grupos quando analisados separadamente, no entanto, os grupos são segregados quando as intensidades desses metabólitos estão associadas em uma função discriminante. Assim, o aumento do nível de caprilato leva a amostra a ser classificada no grupo NM, uma vez que isso resultará em maiores escores nas funções discriminantes. Por outro lado, considerando que as demais variáveis apresentaram peso com valores negativos, aumentos nos níveis de isoleucina, NAT e creatina fazem com que a amostra seja classificada no grupo M.

Caprilato é um ácido graxo de cadeia média composto por oito carbonos encontrado frequentemente em produtos lácteos e óleo de palma. O caprilato funciona como uma fonte de energia "saudável", devido à sua rápida oxidação pelas mitocôndrias, suprimindo o acúmulo de gordura corporal (177). O metabolismo dos carboidratos via glicólise e fosforilação oxidativa é a principal fonte de energia dos espermatozoides maduros (178), no entanto, 24% do proteoma espermático é composto de proteínas envolvidas no metabolismo lipídico, sugerindo que a produção de ATP no gameta masculino pode ser alcançada também via oxidação de ácidos graxos (179). Deste modo, o aumento dos níveis de caprilato encontrados no grupo NM sugere uma diminuição da absorção desse substrato, que pode estar associada ao comprometimento do metabolismo energético dos espermatozoides em homens com varicocele. A isoleucina é um aminoácido ramificado essencial que encontra-se diminuído no sêmen de homens inférteis (59, 180). Da mesma forma, em nosso estudo, o aumento do nível de isoleucina em uma amostra a levou a ser classificada no grupo M. Os mecanismos exatos que ligam a isoleucina à infertilidade masculina não são claros, mas a participação no metabolismo energético e na resposta ao estresse oxidativo são as duas principais possibilidades. A creatina é um derivado de

aminoácidos que participa no metabolismo energético regenerando o trifosfato de adenosina (ATP). Além disso, a creatina também tem efeito antioxidante (181). Estudos utilizando amostras de tecido testicular de ratos demonstraram que o desenvolvimento de células germinativas requer grandes concentrações extracelulares de creatina (182). Nesta pesquisa, demonstramos que maiores concentrações relativas seminais de creatina foram associadas positivamente à fertilidade masculina. Por outro lado, um estudo recente empregando RMN de ^1H *in vivo* para avaliar o meio bioquímico de testículos de homens com azoospermia não obstrutiva não encontrou diferença nas concentrações de creatina entre os grupos experimental e controle (183). Sendo assim, as evidências sobre a importância da creatinina na espermatogênese humana ainda são conflitantes. Por fim, o aumento dos níveis de NAT, um metabólito derivado da tirosina, fez com que a amostra fosse classificada no grupo M. Em estudo anterior, nós evidenciamos uma maior concentração relativa de NAT no plasma seminal de homens férteis com varicocele (59). Sugere-se que a formação de NAT a partir da tirosina seja um mecanismo de eliminação de espécies reativas de oxigênio (184). Além disso, outros estudos demonstraram que os níveis seminais de tirosina estão alterados em homens inférteis, reforçando ainda mais a associação entre o metabolismo da tirosina/N-acetiltirosina e a fertilidade masculina (120, 185).

Com relação aos grupos G e NG, identificamos carnitina (δ 3.42 ppm), NAC (δ 3.86 ppm), creatina (δ 3.90 ppm), e treonina (δ 4.26 ppm) como os metabólitos mais importantes para a segregação grupal. Quanto maior a concentração relativa seminal de carnitina, NAC e creatina maior a chance de a amostra ser classificada no grupo G, por outro lado, a alta concentração relativa seminal de treonina aumenta a chance de a amostra ser classificada no grupo NG.

A carnitina e seu produto bioativo, a NAC, desempenham um papel importante no metabolismo energético, transportando ácidos graxos através da membrana mitocondrial externa, um dos primeiros passos da β -oxidação (186). Além disso, a carnitina e a NAC também atuam como antioxidantes, protegendo o material genético dos danos causados pelos radicais livres, prevenindo a apoptose, e regulando a fluidez das membranas fosfolipídicas (187). Portanto, a suplementação de carnitina e NAC tem sido amplamente utilizada no manejo da infertilidade masculina e está associada a melhorias nos parâmetros de AS e nas taxas de gestação (188, 189). Um estudo utilizando cromatógrafa líquida que analisou metabólitos urinários encontrou uma diminuição dos níveis de NAC e de outros

derivados de carnitina em homens inférteis com oligospermicos quando comparados com controles férteis (190). Em nosso estudo, o aumento das concentrações relativas seminais de carnitina e NAC foi associado à gravidez. A treonina é um aminoácido essencial envolvido no metabolismo lipídico e na síntese proteica (191). Além disso, modelos animais mostraram que a treonina também participa da proliferação e diferenciação celular, regulando a replicação do DNA cromossômico e o ciclo celular (192). Assim, parece lógico que a treonina desempenha um papel importante na espermatogênese. Entretanto, não há estudos em humanos avaliando a associação entre os níveis seminais de treonina e a infertilidade masculina. Neste estudo, o aumento dos níveis relativos de treonina no sêmen foi associado à incapacidade de alcançar uma gravidez natural após a VM.

Ressaltamos que, apesar da identificação desses metabólitos como variáveis importantes para a discriminação dos grupos em nosso estudo, as vias metabólicas que os relacionam com a infertilidade masculina e a resposta à VM permanecem em sua maioria desconhecidas. Portanto, mais pesquisas são necessárias para esclarecer a importância desses metabólitos para a espermatogênese.

Até o momento, nenhum outro estudo utilizou estratégias "ômicas" para identificar biomarcadores ou criar modelos capazes de prever os resultados da VM. No entanto, estudos utilizando proteômica para investigar as alterações no proteoma seminal em homens inférteis com varicocele mostraram que a expressão de proteínas relacionadas ao metabolismo energético e mecanismos antioxidantes foram as mais alteradas pela presença de varicocele (149-151). Além disso, Camargo e colaboradores, utilizando análise do proteoma por cromatografia líquida e espectrometria de massa, identificaram que o aumento de proteínas relacionadas ao transporte de ferro e a diminuição das relacionadas à regulação do radical hidroxila estão associadas a uma melhora da qualidade seminal após a varicocelectomia (154). Os autores também descreveram que a enzima tripeptidil peptidase-1, uma serina-protease relacionada à isquemia e inflamação, teve sua expressão aumentada em três vezes nos pacientes com melhora seminal após a cirurgia quando comparado àqueles com resultado negativo. Também utilizando cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massa, um estudo recente avaliou o metaboloma seminal, descrevendo alterações no metabolismo de fosfolipídios, de esfingolipídios, e de aminoácidos antes e após a varicocelectomia (156). Esses achados são corroborados pelo fato de que os metabólitos relacionados ao metabolismo energético e ao estresse oxidativo foram os mais importantes para a segregação entre os homens que melhoraram e aqueles

que não melhoraram a AS após a varicocelectomia em nosso estudo, destacando ainda mais a importância desses mecanismos na fisiopatologia da varicocele.

Devido à sua natureza preliminar, nosso estudo apresenta algumas limitações. O mais importante é o pequeno número de amostras utilizadas neste estudo. Portanto, estudos futuros com amostras maiores são necessários para confirmar nossos achados. Além disso, a avaliação das parceiras dos homens inférteis foi feita apenas por entrevista, e não foram realizados testes adicionais para identificar possíveis causas não diagnosticadas de infertilidade feminina. Assim, os fatores de fertilidade feminina não puderam ser definitivamente excluídos e podem ter sido um fator de confusão em nossas análises. No entanto, a idade jovem das parceiras e a ausência de sintomas ou história prévia de condições que poderiam causar infertilidade diminuem a probabilidade da presença de infertilidade relacionada a fatores femininos.

Um dos pontos fortes do nosso estudo foi a utilização da definição de infertilidade sugerida pela Sociedade Americana de Reprodução Humana (ASRM), que atualmente é considerada a melhor definição a ser aplicada em pesquisas (193). Além disso, os dois principais desfechos utilizados para avaliar o sucesso da VM (ou seja, parâmetros de AS e taxa de gravidez natural) foram avaliados no presente estudo. Embora a espectroscopia de RMN de ^1H ainda não esteja clinicamente disponível, todas as amostras coletadas já fazem parte da investigação inicial do homem infértil, o que facilita a inclusão dessa ferramenta na prática clínica. Além disso, o uso do modelo metabonômico pode ser de grande ajuda no aconselhamento de homens inférteis com varicocele, representando um avanço em direção à medicina de precisão no campo da infertilidade masculina.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Nestes estudos, nós demonstramos que a espectroscopia de RMN de ^1H do plasma seminal de amostras pré-operatórias pode ser usada em conjunto com ferramentas de estatística multivariada para criar modelos metabonômicos úteis para discriminar homens inférteis com varicocele clínica que melhoraram os parâmetros da AS ou alcançaram gravidez natural após VM daqueles que não o fizeram. Além disso, os metabólitos mais importantes para a segregação destes grupos estão envolvidos no metabolismo energético e na resposta ao estresse oxidativo, reforçando o papel fundamental desses mecanismos na fisiopatologia da varicocele.

Estudo com número maior de amostras e multicêntricos são necessários para confirmar estes achados. Além disso, o uso de outros biofluidos tais como sangue e urina pode ser útil na identificação de outros metabólitos importantes na fisiopatologia da varicocele bem como na criação de novos modelos metabonômicos.

REFERÊNCIAS

1. NETO, F. T. et al. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. **Seminars in cell & developmental biology**, v. 59, p.10-26, 2016.
2. TUREK, P. Male reproductive physiology. *In*: Wein AJ, Kavoussi LR, Partin AW, Peters CA, editors. **Campbell-Walsh Urology**, 11th ed. Philadelphia, PA: Elsevier Saunders; v. 1, p. 516-37, 2016.
3. ZEGERS-HOCHSCHILD, F. et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. **Fertility and sterility**, v. 92, n.5, p.1520-4, 2009.
4. ASRM. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. **Fertility and Sterility**, v. 99, n.1, p.63, 2013.
5. BOIVIN, J. et al. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. **Human Reproduction**, v. 22, n.6, p.506-12, 2007.
6. THOMA, M. E. et al. Prevalence of infertility in the United States as estimated by the current duration approach and a traditional constructed approach. **Fertility and sterility**, v. 99, n. 5, p.1324-31, 2013.
7. AGARWAL, A. et al. A unique view on male infertility around the globe. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n.37, 2015.
8. WHO. World Health Organization. **Infertility Prevalence Estimates, 1990–2021**, 2023.
9. RUTSTEIN, S.O., SHAH, I. H. **Infecundity, Infertility, and Childlessness in Developing Countries**. DHS Comparative Reports No. 9. Calverton, Maryland, USA: ORC Macro and the World Health Organization, 2004.
10. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. **Fertility and sterility**, v. 103, n.3, p. e18-25, 2015.
11. COOPER, T.G. et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. **Human Reproduction update**, v. 16, n.3, p. 231-45, 2010.
12. ESTEVES, S.C. Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 40, n. 4, p. 443-53, 2014.
13. HAMILTON, J.A. et al. Total motile sperm count: a better indicator for the severity of male factor infertility than the WHO sperm classification system. **Human Reproduction**, v. 30, n.5, p.1110-21, 2015.

14. BORGES, E. et al. Total motile sperm count has a superior predictive value over the WHO 2010 cut-off values for the outcomes of intracytoplasmic sperm injection cycles. **Andrology**, v. 4, n.5, p.880-6, 2016.
15. VANDER BORGHT, M.; WYNS, C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. **Clinical Biochemistry**, v. 62, p. 2-10, 2018.
16. BARRATT, C.L.R. et al. Diagnosis of male infertility: An analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. **Human Reproduction Update**, v. 23, n.6, p. 660-80, 2017.
17. VAN DER STEEG, J.W. et al. Pregnancy is predictable: a large-scale prospective external validation of the prediction of spontaneous pregnancy in subfertile couples. **Human Reproduction**, v. 22, n.2, p. 536-42, 2007.
18. SIGMAN, M. et al. Office evaluation of the subfertile male. *In*: In: Lipshultz, L.I., Howards, S.S., Niederberger, C.S., eds. **Infertility in the Male**. Cambridge University Press; p.153-176, 2009.
19. GORELICK, J.I.; GOLDSTEIN, M. Loss of fertility in men with varicocele. **Fertility and Sterility**, v. 9, n.3, p.613-6, 1993.
20. SIGMAN, M. There is more than meets the eye with varicoceles: current and emerging concepts in pathophysiology, management, and study design. **Fertility and Sterility**, v. 96, n.6, p.1281-2, 2011.
21. AGARWAL, A. et al. Differential proteomic profiling of spermatozoal proteins of infertile men with unilateral or bilateral varicocele. **Urology**, v. 85, n. 3, p. 580-8, 2015.
22. BROWN, J.S.; DUBIN, L.; HOTCHKISS, R.S. The varicocele as related to fertility. **Fertility and Sterility**, v. 18, n.1, p. 46-56, 1967.
23. JENSEN, C.F.S. et al. Varicocele and male infertility. **Nature Reviews Urology**, v. 14, n.9, p.523-33, 2017.
24. AGARWAL, A.; HAMADA, A, ESTEVES, S.C. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. **Nature Reviews Urology**, v. 9, n.12, p.678-90, 2012.
25. GOLDSTEIN, M.; EID, J.F. Elevation of intratesticular and scrotal skin surface temperature in men with varicocele. **Journal of Urology**, v. 142, n.3, p.743-5, 1989.
26. GAROLLA, A. et al. Twenty-four-hour monitoring of scrotal temperature in obese men and men with a varicocele as a mirror of spermatogenic function. **Human Reproduction**, v. 30, n.5, p.1006-13, 2015.
27. CHO, C.L.; ESTEVES, S.C.; AGARWAL, A. Novel insights into the pathophysiology of varicocele and its association with reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. **Asian Journal of Andrology**, v. 18, n.2, p.86-93, 2016.

28. CLAVIJO, R.I.; CARRASQUILLO, R.; RAMASAMY, R. Varicoceles: prevalence and pathogenesis in adult men. **Fertility and Sterility**, v. 108, n.3, p.364-9, 2017.
29. DE WIN, G. et al. Peak retrograde flow a potential objective management tool to identify young adults with varicocele 'at risk' for a high sperm DNA fragmentation. **Journal of Pediatric Urology**, v. 17, n.6, p.760.e1-e9, 2021.
30. GAT, Y et al. Varicocele, hypoxia and male infertility. Fluid Mechanics analysis of the impaired testicular venous drainage system **Human Reproduction**, v. 20, n. 9, p. 2614-9, 2005.
31. ISHIKAWA, T. et al. Increased testicular 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine in patients with varicocele. **BJU international**, v. 100, n. 4, p.863-6, 2007.
32. NALLELLA, K. P. et al. Relationship of interleukin-6 with semen characteristics and oxidative stress in patients with varicocele. **Urology**, v. 64, n.5, p.1010-3, 2004.
33. SAHIN, Z et al. Increased expression of interleukin-1alpha and interleukin-1beta is associated with experimental varicocele. **Fertility and Sterility**, v. 85, Suppl 1:1265-75, 2006.
34. KRZYSCIAK, W.; KOZKA, M. Generation of reactive oxygen species by a sufficient, insufficient and varicose vein wall. **Acta Biochimica Polonica**, v. 58, n.1, p. 89-94, 2011.
35. GLOWINSKI, J.; GLOWINSKI, S. Generation of reactive oxygen metabolites by the varicose vein wall. **European Journal of Vascular and Endovascular Surgery**, v. 23, n. 6, p.550-5, 2002.
36. ALLEN, J.D.; GOW, A.J. Nitrite, NO and hypoxic vasodilation. **British Journal of Pharmacology**, v. 158, n.7, p.1653-4, 2009.
37. DE STEFANI, S. et al. Experimental varicocele in the rat: early evaluation of the nitric oxide levels and histological alterations in the testicular tissue. **Andrologia**, v. 37, n. 4, p.115-8, 2005.
38. BIGOT, J.M.; CHATEL, A. The value of retrograde spermatic phlebography in varicocele. **European urology**, v. 6, n.5, p.301-6, 1980.
39. ITO, H et al. Internal spermatic vein prostaglandins in varicocele patients. **Fertility and Sterility**, v. 37, n.2, p.218-22, 1982.
40. ADAMOPOULOS, D. A. et al. Raised sodium, potassium, and urea concentrations in spermatic venous blood: an additional causative factor in the testicular dysfunction of varicocele? **Fertility and Sterility**, v. 48, n.2, p.331-3, 1987.
41. OZBEK, E. et al. The role of adrenomedullin in varicocele and impotence. **BJU international**, v. 86, n.6, p.694-8, 2000.

42. CAMOGLIO, F.S. et al. Varicocele and retrograde adrenal metabolites flow. An experimental study on rats. **Urologia internationalis**, v. 73, n.4, p.337-42, 2004.
43. HU, W. et al. Roles of adrenomedullin and hypoxia-inducible factor 1 alpha in patients with varicocele. **Andrologia**, v. 47, n.8, p.951-7, 2015.
44. BENOFF, S. et al. A potential role for cadmium in the etiology of varicocele-associated infertility. **Fertility and sterility**, v. 67, n.2, p.336-47, 1997.
45. BENOFF, S. et al. Deletions in L-type calcium channel alpha1 subunit testicular transcripts correlate with testicular cadmium and apoptosis in infertile men with varicoceles. **Fertility and Sterility**, v. 83, n.3, p.622-34, 2005.
46. JENG, S.Y.; WU, S.M.; LEE, J.D. Cadmium accumulation and metallothionein overexpression in internal spermatic vein of patients with varicocele. **Urology**, v. 73, n.6, p.1231-5, 2009.
47. LEWIS, S. E. M.; ESTEVES, S. C. What does a varicocele do to a man's fertility? There is much more than meets the eye. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 47, n. 2, p. 284-6, 2021.
48. GRIVEAU, J.F. LE LANNOU, D. Reactive oxygen species and human spermatozoa: physiology and pathology. **International Journal of Andrology**, v. 20, n.2, p.61-9, 1997.
49. AGARWAL, A. et al. The Impact of Single- and Double-Strand DNA Breaks in Human Spermatozoa on Assisted Reproduction. **International journal of molecular sciences**, v. 21, n.11, 2020.
50. AGARWAL, A. et al. Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. **Urology**, v. 73, n.3, p.461-9, 2009.
51. ALEXEYEV, M. et al. The maintenance of mitochondrial DNA integrity--critical analysis and update. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, v. 5, n.5, p.a012641, 2013.
52. YADAV, D.K. et al. Molecular dynamic simulations of oxidized skin lipid bilayer and permeability of reactive oxygen species. **Scientific Reports**, v. 9, n.1, p.4496, 2019.
53. TAHAMTAN, S. et al. Reduced sperm telomere length in individuals with varicocele is associated with reduced genomic integrity. **Scientific Reports**, v. 9, n.1, p.4336, 2019.
54. KALMBACH, K.H. et al. Telomeres and human reproduction. **Fertility and sterility**, v. 99, n.1, p.23-9, 2013.
55. CHEN, S.S. Significant predictive factors for subfertility in patients with subclinical varicocele. **Andrologia**, v. 49, n.10, 2017.
56. ZARGOOSHI, J. Sperm count and sperm motility in incidental high-grade varicocele. **Fertility and sterility**, v. 88, n.5, p.1470-3, 2007.

57. PASQUALOTTO, F. F. et al. Semen profile, testicular volume, and hormonal levels in infertile patients with varicoceles compared with fertile men with and without varicoceles. **Fertility and sterility**, v. 83, n.1, p.74-7, 2005.
58. WHO. World Health Organization. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. **Fertility and sterility**, v. 57, n.6, p.1289-93,1992.
59. NETO, F.T.L. et al. 1H NMR-based metabonomics for infertility diagnosis in men with varicocele. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 37, n.9, p.2233-47, 2020.
60. GAT, Y. et al. Physical examination may miss the diagnosis of bilateral varicocele: a comparative study of 4 diagnostic modalities. **The Journal of Urology**, v. 172, n.4 Pt, p.1414-7, 2004.
61. MORAG, B. et al The role of spermatic venography after surgical high ligation of the left spermatic veins: diagnosis and percutaneous occlusion. **Urologic radiology**, v. 7, n.1, p.32-4, 1985.
62. DUBIN, L.; AMELAR, R.D. Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. **Fertility and sterility**, v. 21, n.8, p.606-9, 1970.
63. BELAY, R.E. et al. Diagnosis of clinical and subclinical varicocele: how has it evolved? **Asian journal of andrology**, v. 18, n.2, p.182-5, 2016.
64. TRUM, J.W. et al. The value of palpation, varicoscreen contact thermography and colour Doppler ultrasound in the diagnosis of varicocele. **Human Reproduction**, v. 11, n.6, p.1232-5, 1996.
65. SHAKERI, S. et al. Inter-observer agreement on varicoceles diagnosis among patients referred to Shiraz Namazi Hospital. **International journal of Reproductive Biomedicine**, v. 16, n.10, p.649-52, 2018.
66. SOROKIN, I. et al. Interinstitutional variability in testicular volumes and varicocele presence by ultrasound: surprising discrepancies and implications for clinical decision making. **Urology**, v. 85, n.5, p.1079-84, 2015.
67. KIM, H. J. et al. Clinical significance of subclinical varicocelectomy in male infertility: systematic review and meta-analysis. **Andrologia**, v. 48, n. 6, p.654-61, 2016.
68. Male Infertility Best Practice Policy Committee of the American Urological Association; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Report on optimal evaluation of the infertile male. **Fertility and sterility**, v. 86, n.5 Suppl 1, p.S202-9, 2006.
69. SCHLEGEL, P.N. et al. Diagnosis and Treatment of Infertility in Men: AUA/ASRM Guideline PART II. **The Journal of urology**, v. 205, n.1, p. 44-51, 2021.

70. FUKUDA, T. et al. Assessment of Time-dependent Changes in Semen Parameters in Infertile Men After Microsurgical Varicocelectomy. **Urology**, v. 86, n.1, p.48-51, 2015.
71. MARMAR, J.L. et al. Reassessing the value of varicocelectomy as a treatment for male subfertility with a new meta-analysis. **Fertility and sterility**, v. 88, n.3, p.639-48, 2007.
72. BAAZEEM, A. et al. Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. **European urology**. v. 60, n.4, p.796-808, 2011.
73. ESTEVES, S.C.; ROQUE M.; AGARWAL, A. Outcome of assisted reproductive technology in men with treated and untreated varicocele: systematic review and meta-analysis. **Asian journal of andrology**, v. 18, n.2, p.254-8, 2016.
74. CANTORO, U.; POLITO, M.; MUZZONIGRO, G. Reassessing the role of subclinical varicocele in infertile men with impaired semen quality: a prospective study. **Urology**, v. 85, n.4, p.826-30, 2015.
75. THIRUMAVALAVAN, N. et al. The Impact of Microsurgical Repair of Subclinical and Clinical Varicoceles on Total Motile Sperm Count: Is There a Difference? **Urology**, v. 120, p. 109-13, 2018.
76. OU, N. et al. Bilateral is superior to unilateral varicocelectomy in infertile men with bilateral varicocele: Systematic review and meta-analysis. **Andrologia**. v. 51, n.11, p.e13462, 2019.
77. MINHAS, S. et al. European Association of Urology Guidelines on Male Sexual and Reproductive Health: 2021 Update on Male Infertility. **European urology**. v. 80, n.5, p.603-20, 2021.
78. ESTEVES, S.C.; ZINI, A.; COWARD, R.M. Best urological practices on testing and management of infertile men with abnormal sperm DNA fragmentation levels: the SFRAG guidelines. **International Brazilian Journal of Urology**, v. 47, n.6, p.1250-8, 2021.
79. GOLDSTEIN, M. et al. Microsurgical inguinal varicocelectomy with delivery of the testis: an artery and lymphatic sparing technique. **Journal of Urology**, v. 148, n.6, p.1808-11, 1992.
80. DING, H. et al. Open non-microsurgical, laparoscopic or open microsurgical varicocelectomy for male infertility: a meta-analysis of randomized controlled trials. **BJU international**, v. 110, n.10, p.1536-42, 2012.
81. JOHNSON, D.; SANDLOW, J. Treatment of varicoceles: techniques and outcomes. **Fertility and sterility**, v. 108, n.3, p.378-84, 2017.
82. HALPERN, J. et al. Percutaneous embolization of varicocele: technique, indications, relative contraindications, and complications. **Asian journal of andrology**, v. 18, n.2, p.234-8, 2016.

83. MARMAR, J.L.; DEBENEDICTIS, T.J.; PRAISS, D. The management of varicoceles by microdissection of the spermatic cord at the external inguinal ring. **Fertility and sterility**, v. 43, n.4, p.583-8, 1985.
84. ESTEVES, S.C.; MIYAOKA, R.; AGARWAL, A. Surgical treatment of male infertility in the era of intracytoplasmic sperm injection - new insights. **Clinics**, v. 66, n.8, p.1463-78, 2011.
85. Tiseo BC, Esteves SC, Cocuzza MS. Summary evidence on the effects of varicocele treatment to improve natural fertility in subfertile men. **Asian journal of andrology**, v. 18, n.2, p.239-45, 2016.
86. SHABANA, W. et al. Predictors of improvement in semen parameters after varicocelectomy for male subfertility: A prospective study. **Canadian Urological Association journal**, v. 9, n.9-10, p.E579-82, 2015.
87. CHO, C.L.; ESTEVES, S.C.; AGARWAL, A. Indications and outcomes of varicocele repair. **Panminerva Medica**, v. 61, n.2, p.152-63, 2019.
88. SAMPLASKI, M.K. et al. Varicocelectomy to "upgrade" semen quality to allow couples to use less invasive forms of assisted reproductive technology. **Fertility and sterility**, v. 108, n.4, p.609-12, 2017.
89. PERSAD, E. et al. Surgical or radiological treatment for varicoceles in subfertile men. **The Cochrane database of systematic reviews**, v. 4, n.4, p. Cd000479, 2021.
90. Chen SS, Huang WJ, Chang LS, Wei YH. Attenuation of oxidative stress after varicocelectomy in subfertile patients with varicocele. **Journal of Urology**, v. 179, n.2, p.639-42, 2008.
91. GOK, B. et al. The change in Thiol-Disulphide Homeostasis levels as an oxidative stress marker after varicocelectomy: Is there a relationship with sperm parameters? **Andrologia**, v. 52, n.3, p.e13515, 2020.
92. LIRA NETO, F.T.; ROQUE, M.; ESTEVES, S.C. Effect of varicocelectomy on sperm deoxyribonucleic acid fragmentation rates in infertile men with clinical varicocele: a systematic review and meta-analysis. **Fertility and sterility**, v. 116, n.3, p.696-712, 2021.
93. LIRA NETO, F.T.; ROQUE, M.; ESTEVES, S.C. Effect of varicocele and varicocelectomy on sperm deoxyribonucleic acid fragmentation rates in infertile men with clinical varicocele. **Minerva Obstetrics and Gynecology**, 2022.
94. WANG, J. et al. Inguinal and subinguinal micro-varicocelectomy, the optimal surgical management of varicocele: a meta-analysis. **Asian journal of andrology**, v. 17, n.1, p.74-80, 2015.
95. ATES, E. et al. Preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio as a new prognostic predictor after microsurgical subinguinal varicocelectomy. **Andrologia**, v. 51, n.2, p.e13188, 2019.

96. ZHANG, J.W. et al. Predictors for spontaneous pregnancy after microsurgical subinguinal varicocelectomy: a prospective cohort study. **International Urology and Nephrology**, v. 49, n.6, p.955-60, 2017.
97. ABOU GHAYDA, R. et al. Anthropometric Variables as Predictors of Semen Parameters and Fertility Outcomes after Varicocelectomy. **Journal of Clinical Medicine**, v. 9, n.4, 2020.
98. SAMPLASKI, M.K. et al. Nomograms for predicting changes in semen parameters in infertile men after varicocele repair. **Fertility and sterility**, v. 102, n.1, p.68-74, 2014.
99. JANG, W.S. et al. External validation of the post-varicocele repair semen analysis nomogram to predict total motile sperm count: A multicenter study. **Andrologia**, v. 52, n.11, p.e13809, 2020.
100. LIU, X. et al. Nomogram for Predicting Semen Parameters Improvement after Microscopic Varicocelectomy in Infertile Men with Abnormal Semen Parameters. **Journal of Personalized Medicine**, v. 13, n.1, 2022.
101. LIU, L. et al. Nomogram for predicting spontaneous pregnancy after microscopic varicocelectomy in infertile men with normal hormone. **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 22, n.1, p.791, 2022.
102. KOVAC, J.R.; PASTUSZAK, A.W.; LAMB, D.J. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. **Fertility and sterility**, v. 99, n.4, p. 998-1007,2013.
103. KARCEWSKI, K.J.; SNYDER, M.P. Integrative omics for health and disease. **Nature Reviews Genetics**, v. 19, n.5, p.299-310, 2018.
104. KANG, C.; BERTOLLA, R.; PAGANI, R. The '-ics' of male reproduction: genomics, epigenetics, proteomics, metabolomics, and microbiomics. **Current opinion in urology**, v. 33, n.1, p.31-8, 2023.
105. Dunn WB, Ellis DI. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **Trends in Analytical Chemistry**, v. 24, n.4, p.285-94, 2005.
106. Mayr M. Metabolomics: ready for the prime time? **Circulation Cardiovascular genetics**, v. 1, n.1, p.58-65, 2008.
107. JAYARAMAN, V. et al. Identification of biochemical differences between different forms of male infertility by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 31, n.9, p.1195-204, 2014.
108. WISHART, D.S. et al. HMDB 5.0: the Human Metabolome Database for 2022. **Nucleic Acids Research**, v. 50, n.D1, p. D622-D31, 2022.
109. MINAI-TEHRANI, A.; JAFARZADEH, N.; GILANY, K. Metabolomics: a state-of-the-art technology for better understanding of male infertility. **Andrologia**, v. 48, n.6, p.609-16, 2016.

110. NICHOLSON, J.K.; LINDON, J.C.; HOLMES, E. 'Metabonomics': understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. **Xenobiotica**, v. 29, n.11, p. 1187-9, 1999.
111. NICHOLSON, J.K. et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 1, n.1, p.153-61, 2002.
112. LINDON, J.C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J.K. So what's the deal with metabonomics? **Analytical chemistry**, v. 75, n.17, p.384A-91A, 2003.
113. ARAUJO, L.C.N. **Estudo piloto: diagnóstico do câncer urológico por via metabonômica**. 2016. Tese (Doutorado em Cirurgia) - Universidade Federal de Pernambuco Recife, 2016.
114. GODOY, M. M. et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. **Journal of viral hepatitis**, v. 17, n. 12, p. 854-8, 2010.
115. PONTES, T. A. et al. Osteopenia-osteoporosis discrimination in postmenopausal women by ¹H NMR-based metabonomics. **PloS one**, v. 14, n. 5, p. e0217348, 2019.
116. GUPTA, A. et al. ¹H NMR spectroscopic studies on human seminal plasma: a probative discriminant function analysis classification model. **Journal of pharmaceutical and biomedical analysis**, v. 54, n. 1, p. 106-13, 2011.
117. HAMAMAH, S. et al. ¹H nuclear magnetic resonance studies of seminal plasma from fertile and infertile men. **Journal of reproduction and fertility**, v. 97, n. 1, p. 51-5, 1993.
118. MAHER, A. D. et al. Seminal oligouridinoses: low uridine secretion as a biomarker for infertility in spinal neurotrauma. **Clinical Chemistry**, v. 54, n. 12, p. 2063-6, 2008.
119. ZHANG, X. et al. Metabolic characterization of asthenozoospermia using nontargeted seminal plasma metabolomics. **International journal of clinical chemistry**, v. 450, p. 254-61, 2015.
120. MUMCU, A. et al. Metabolomics analysis of seminal plasma in patients with idiopathic Oligoasthenoteratozoospermia using high-resolution NMR spectroscopy. **Andrology**, v. 8, n. 2, p. 450-6, 2020.
121. ZHANG, J. et al. Metabolomic analysis reveals a unique urinary pattern in normozoospermic infertile men. **Journal of proteome research**, v. 13, n. 6, p. 3088-99, 2014.
122. AARONSON, D. S. et al. A novel application of ¹H magnetic resonance spectroscopy: non-invasive identification of spermatogenesis in men with non-obstructive azoospermia. **Human Reproduction**, v. 25, n. 4, p. 847-52, 2010.

123. LIMA, S. B. et al. Expression of the HSPA2 gene in ejaculated spermatozoa from adolescents with and without varicocele. **Fertility and sterility**, v. 86, n. 6, p. 1659-63, 2006.
124. TU, L. H. et al. Potential role of prokineticin 2 in experimental varicocele-induced rat testes. **Urology**, v. 80, n. 4, p. 952 e15-9, 2012.
125. DEL GIUDICE, P.T. et al. Expression of the Fas-ligand gene in ejaculated sperm from adolescents with and without varicocele. **Journal of assisted reproduction and genetics**, v. 27, n. 2-3, p. 103-9, 2010.
126. MOSTAFA, T. et al. Seminal BAX and BCL2 gene and protein expressions in infertile men with varicocele. **Urology**, v. 84, n. 3, p. 590-5, 2014.
127. ZALATA, A. A. et al. Androgen receptor expression relationship with semen variables in infertile men with varicocele. **Journal of Urology**, v. 189, n. 6, p. 2243-7, 2013.
128. AMER, M. K. et al. Ropporin gene expression in infertile asthenozoospermic men with varicocele before and after repair. **Urology**, v. 85, n. 4, p. 805-8, 2015.
129. FINELLI, R. et al. Oxidative Stress: A Comprehensive Review of Biochemical, Molecular, and Genetic Aspects in the Pathogenesis and Management of Varicocele. **The World Journal of Men's Health**, v. 40, n. 1, p. 87-103, 2022.
130. ICHIOKA, K. et al. Genetic polymorphisms in glutathione S-transferase T1 affect the surgical outcome of varicocelectomies in infertile patients. **Asian journal of andrology**, v. 11, n. 3, p. 333-41, 2009.
131. CHEN, S. S. et al. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and male infertility in Taiwanese patients with varicocele. **Human Reproduction**, v. 17, n. 3, p. 718-25, 2002.
132. YANG, B. et al. Molecular characteristics of varicocele: integration of whole-exome and transcriptome sequencing. **Fertility and sterility**, v. 115, n. 2, p. 363-72, 2021.
133. SONG, G. J.; LEWIS, V. Mitochondrial DNA integrity and copy number in sperm from infertile men. **Fertility and sterility**, v. 90, n. 6, p. 2238-44, 2008.
134. GABRIEL, M. S. et al. Influence of microsurgical varicocelectomy on human sperm mitochondrial DNA copy number: a pilot study. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, n. 8, p. 759-64, 2012.
135. HEIDARI, M. M. et al. Mitochondrial Genetic Variation in Iranian Infertile Men with Varicocele. **International journal of fertility & sterility**, v. 10, n. 3, p. 303-9, 2016.
136. GASHTI, N. G. et al. 4977-bp mitochondrial DNA deletion in infertile patients with varicocele. **Andrologia**, v. 46, n. 3, p. 258-62, 2014.

137. KOBAYASHI, H. et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. **Human Molecular Genetics**, v. 16, n. 21, p. 2542-51, 2007.
138. SANTANA, V. P. et al. Differential DNA methylation pattern and sperm quality in men with varicocele. **Fertility and Sterility**, v. 114, n. 4, p. 770-8, 2020.
139. BAHREINIAN, M. et al. DNA hypomethylation predisposes sperm to DNA damage in individuals with varicocele. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 61, n. 4, p. 179-86, 2015.
140. UCAR, V. B. et al. Is methylenetetrahydrofolate reductase (MTHFR) gene A1298C polymorphism related with varicocele risk? **Andrologia**, v. 47, n. 1, p. 42-6, 2015.
141. LA SALLE, S. et al. Loss of spermatogonia and wide-spread DNA methylation defects in newborn male mice deficient in DNMT3L. **BMC Developmental Biology**, v. 7, p. 104, 2007.
142. TAVALEE, M. et al. Effect of varicocelectomy on sperm functional characteristics and DNA methylation. **Andrologia**, v. 47, n. 8, p. 904-9, 2015.
143. MOSTAFA, T. et al. Seminal miRNA Relationship with Apoptotic Markers and Oxidative Stress in Infertile Men with Varicocele. **BioMed Research International**, 2016.
144. JI, Z. et al. Expressions of miR-15a and its target gene HSPA1B in the spermatozoa of patients with varicocele. **Reproduction**, v. 147, n. 5, p. 693-701, 2014.
145. ATA-ABADI, N. S. et al. Hypoxia-related long noncoding RNAs are associated with varicocele-related male infertility. **PloS one**, v. 15, n. 4, p. e0232357, 2020.
146. SADEK, A. et al. Sperm chromatin condensation in infertile men with varicocele before and after surgical repair. **Fertility and sterility**, v. 95, n. 5, p. 1705-8, 2011.
147. CAMARGO, M.; INTASQUI, P.; BERTOLLA, R. P. Proteomic profile of seminal plasma in adolescents and adults with treated and untreated varicocele. **Asian Journal of Andrology**, v. 18, n. 2, p. 194-201, 2016.
148. DEL GIUDICE, P. T. et al. Determination of testicular function in adolescents with varicocele - a proteomics approach. **Andrology**, v. 4, n. 3, p. 447-55, 2016.
149. ZYLBERSZTEJN, D. S. et al. Proteomic analysis of seminal plasma in adolescents with and without varicocele. **Fertility and Sterility**, v. 99, n. 1, p. 92-8, 2013.
150. AGARWAL, A. et al. Proteomic signatures of infertile men with clinical varicocele and their validation studies reveal mitochondrial dysfunction leading to infertility. **Asian Journal of Andrology**, v. 18, n. 2, p. 282-91, 2016.
151. HOSSEINIFAR, H. et al. Study of sperm protein profile in men with and without varicocele using two-dimensional gel electrophoresis. **Urology**, v. 81, n. 2, p. 293-300, 2013.

152. CAMARGO, M. et al. Unbiased label-free quantitative proteomic profiling and enriched proteomic pathways in seminal plasma of adult men before and after varicocelectomy. **Human Reproduction**, v. 28, n. 1, p. 33-46, 2013.
153. HOSSEINIFAR, H. et al. Study of the effect of varicocelectomy on sperm proteins expression in patients with varicocele and poor sperm quality by using two-dimensional gel electrophoresis. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 31, n. 6, p. 725-9, 2014.
154. CAMARGO, M. et al. Molecular pathways of varicocele and its repair - A paired labelled shotgun proteomics approach. **Journal of Proteomics**, v. 196, p. 22-32, 2019.
155. PANNER SELVAM, M. K.; SAMANTA, L.; AGARWAL, A. Functional Analysis of Differentially Expressed Acetylated Spermatozoal Proteins in Infertile Men with Unilateral and Bilateral Varicocele. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 9, 2020.
156. ZHANG, X. et al. Effects of varicocele and microsurgical varicocelectomy on the metabolites in semen. **Scientific Reports**, v. 12, n. 1, p. 5179, 2022.
157. ZHANG, X. et al. Untargeted metabolomics identified kynurenine as a predictive prognostic biomarker in acute myocardial infarction. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 950441, 2022.
158. DING, X. et al. Identification of metabolomics-based prognostic prediction models for ICU septic patients. **International immunopharmacology**, v. 108, p. 108841, 2022.
159. XIE, J.; LI, L.; XING, H. Metabolomics in gestational diabetes mellitus: A review. **International Journal of Clinical Chemistry**, v. 539, p. 134-43, 2023.
160. ROBERTSON, D. G. Metabonomics in toxicology: a review. **Toxicological sciences**, v. 85, n. 2, p. 809-22, 2005.
161. TRYGG, J.; LUNDSTEDT, T. **Chemometrics Techniques for Metabonomics**. In: LINDON, J. C.; NICHOLSON, J. K.; HOLMES, E. The Handbook of Metabonomics and Metabolomics: Elsevier BV, 2007.
162. WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. **Current Metabolomics**, v. 1, n. 1, p. 92-107, 2013.
163. BRERETON, R. B. **Chemometrics for Pattern Recognition**. West Sussex: John Wiley & Sons, 2009.
164. OUARDIGHI, A. E.; AKADI, A. E.; ABOUTAJDINE, D. **Feature Selection on Supervised Classification Using Wilk's Lambda Statistic**. In: International Symposium on Computational Intelligence and Intelligent Informatics, 2007.
165. RUBINGH, C. M. et al. Assessing the performance of statistical validation tools for megavariable metabolomics data. **Metabolomics**, v. 2, n. 2, p. 53-61, 2006.

166. WHO - World Health Organization. **Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen**. 6th ed. 2021.
167. VERMEULEN, A.; VERDONCK, L.; KAUFMAN, J. M. A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum. **The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, v. 84, n. 10, p. 3666-72, 1999.
168. NIKBAKHT, R.; SAHARKHIZ, N. The influence of sperm morphology, total motile sperm count of semen and the number of motile sperm inseminated in sperm samples on the success of intrauterine insemination. **International Journal of Fertility & Sterility**, v. 5, n. 3, p. 168-73, 2011.
169. WANG, Q.; YU, Y.; LIU, Y.; WANG, L. Outcome of varicocelectomy on different degrees of total motile sperm count: A systematic review and meta-analysis. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 65, n. 6, p. 430-6, 2019.
170. ZEGERS-HOCHSCHILD, F. et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. **Fertility and Sterility**, v. 108, n. 3, p. 393-406, 2017.
171. ESTEVES, S. C.; MIYAOKA, R.; ROQUE, M.; AGARWAL, A. Outcome of varicocele repair in men with nonobstructive azoospermia: systematic review and meta-analysis. **Asian Journal of Andrology**, v. 18, n. 2, p. 246-53, 2016.
172. WISHART, D. S. et al. HMDB 4.0: the human metabolome database for 2018. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. D1, p. D608-D17, 2018.
173. PAIVA, C. et al. Identification of endogenous metabolites in human sperm cells using proton nuclear magnetic resonance ((1) H-NMR) spectroscopy and gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). **Andrology**, v. 3, n. 3, p. 496-505, 2015.
174. MAJZOUB, A. et al. Effect of microsurgical varicocelectomy on fertility outcome and treatment plans of patients with severe oligozoospermia: An original report and meta-analysis. **Andrologia**, v. 53, n. 6, p. e14059, 2021.
175. KIMURA, M. et al. Age is a significant predictor of early and late improvement in semen parameters after microsurgical varicocele repair. **Andrologia**, v. 49, n.3, 2017.
176. SCHIFF, J.D.; LI, P.S.; GOLDSTEIN, M. Correlation of ultrasound-measured venous size and reversal of flow with Valsalva with improvement in semen-analysis parameters after varicocelectomy. **Fertility and Sterility**, v. 86, n.1, p. 250-2, 2006.
177. TAKEUCHI, H. et al. The application of medium-chain fatty acids: edible oil with a suppressing effect on body fat accumulation. **Asia Pacific Journal of Clinical Nutrition**, v. 17, Suppl. 1, p.320-3, 2008.
178. VISCONTI, P.E. Sperm bioenergetics in a nutshell. **Biology of Reproduction**, v. 87, n.3, p.72, 2012.
179. AMARAL, A. et al. Human sperm tail proteome suggests new endogenous metabolic pathways. **Molecular & cellular proteomics**, v. 12, n.2, p.330-42, 2013.

180. QIAO S. et al. Seminal plasma metabolomics approach for the diagnosis of unexplained male infertility. **PloS one**, v. 12, n.8, p.e0181115, 2017.
181. LAWLER, J.M. et al. Direct Antioxidant Properties of Creatine. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 290, n.1, p.47-52, 2002.
182. GRIFFIN J. L., et al The biochemical profile of rat testicular tissue as measured by magic angle spinning 1H NMR spectroscopy. **FEBS Letters**, v. 486, n.3, p.225-9, 2000.
183. NTORKOU, A. et al. In vivo biochemical investigation of spermatogenic status: 1H-MR spectroscopy of testes with nonobstructive azoospermia. **European Radiology**, v. 30, n.8, p. 4284-94, 2020.
184. VAN OVERVELD, F.W. et al. Tyrosine as important contributor to the antioxidant capacity of seminal plasma. **Chemico-biological interactions**, v. 127, n.2, p.151-61, 2000.
185. GUPTA, A. et al. Influence of histamine and H1-receptor antagonists on ejaculated human spermatozoa: role of intrasperm Ca²⁺. **Indian Journal of Experimental Biology**, v. 42, n.5, p.481-5, 2004.
186. VIRMANI, M.A.; CIRULLI. M. The Role of l-Carnitine in Mitochondria, Prevention of Metabolic Inflexibility and Disease Initiation. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 23, n.5, 2022.
187. SZYMAŃSKI, M. et al. Comparison of 3- and 6-Month Outcomes of Combined Oral L-Carnitine Fumarate and Acetyl-L-Carnitine Therapy, Included in an Antioxidant Formulation, in Patients with Idiopathic Infertility. **American Journal of Men's Health**, v. 15, n.5, p.15579883211036790, 2021.
188. ZHANG, X. et al. The efficacy of combined l-carnitine and l-acetyl carnitine in men with idiopathic oligoasthenoteratozoospermia: A systematic review and meta-analysis. **Andrologia**, v. 52, n.2, p.e13470, 2020.
189. ZHOU, X.; LIU, F.; ZHAI, S. Effect of L-carnitine and/or L-acetyl-carnitine in nutrition treatment for male infertility: a systematic review. **Asia Pacific journal of clinical nutrition**, v. 16, Suppl 1, p.383-90, 2007.
190. ZHANG, J. et al. Urinary metabolome identifies signatures of oligozoospermic infertile men. **Fertility and Sterility**, v. 102. n.1, p. 44-53 e12, 2014.
191. TANG, Q. et al. Physiological Functions of Threonine in Animals: Beyond Nutrition Metabolism. **Nutrients**, v. 13, n.8, 2021.
192. RYU, J.M.; HAN, H.J. L-threonine regulates G1/S phase transition of mouse embryonic stem cells via PI3K/Akt, MAPKs, and mTORC pathways. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n.27, p.23667-78, 2011.
193. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. **Fertility and Sterility**, v. 113, n.3, p.533-5, 2020.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Investigação da Varicocele Através de Análise Metabonômica Baseada na Espectroscopia de RMN de Hidrogênio de Soro de Sêmen, Soro de Sangue e Urina.

Você está sendo convidado a participar de uma pesquisa porque foi atendido ou está sendo atendido nesta instituição. Esta pesquisa está sob a responsabilidade do pesquisador Dr. Filipe Tenório Lira Neto e sob a orientação do Prof. Dr. Salvador Vilar Lima Correia, com endereço Rua Guilherme Salazar, n 150, apt 601E, Poço da Panela, Recife – PE, CEP 52061-275, telefone (81) 2126-3649 e (81) 982322435, e e-mail para contato pesquisavaricoceleimip@gmail.com.

Para que você possa decidir se quer participar ou não, precisa conhecer os benefícios, os riscos e as consequências pela sua participação. Este documento é chamado de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) e tem esse nome porque você só deve aceitar participar desta pesquisa depois de ter lido e entendido este documento. Leia as informações com atenção e converse com o pesquisador responsável e com a equipe da pesquisa sobre quaisquer dúvidas que você tenha. Caso haja alguma palavra ou frase que você não entenda, converse com a pessoa responsável por obter este consentimento, para maiores esclarecimentos. Caso prefira, converse com os seus familiares, amigos e com a equipe médica antes de tomar uma decisão. Se você tiver dúvidas depois de ler estas informações, entre em contato com o pesquisador responsável. Após receber todas as informações, e todas as dúvidas forem esclarecidas, você poderá fornecer seu consentimento, rubricando e/ou assinando em todas as páginas deste Termo, em duas vias (uma do pesquisador responsável e outra do participante da pesquisa), caso queira participar.

PROPÓSITO DA PESQUISA

O objetivo deste estudo é avaliar se alterações metabólicas (características) encontradas no sêmen (esperma), sangue e urina de pacientes varicocele podem, em um futuro, serem utilizadas para o diagnóstico e tratamento desta doença. Com resultados tentaremos melhorar as indicações e o seguimento do tratamento da varicocele, diminuindo complicações, os custos e a necessidade de exames desnecessários, melhorando a qualidade do tratamento específico.

PROCEDIMENTOS DA PESQUISA

Aceitando participar o Sr. deverá fornecer uma amostra pequena (o equivalente a dois tubos pequenos de 4 mililitros cada, ou que corresponde a aproximadamente duas colheres de sopa) de sangue, de urina, e de sêmen (esperma), que será coletado no laboratório do IMIP-PE. Este material (sangue, urina e esperma), será tratado diretamente no laboratório e analisado no Laboratório de Química da UFPE. Todas as amostras biológicas coletadas durante esta pesquisa, serão utilizadas apenas para os propósitos descritos neste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Não havendo necessidade de nenhum outro exame ou procedimento invasivo, bem como não haverá alteração do tipo ou da programação de seu tratamento na unidade de urologia. Durante o estudo o Sr. poderá ser perguntado sobre alguns detalhes de sua evolução clínica pelo pesquisador, respondendo a um questionário. Se você concordar, os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa consultarão seus dados clínicos e laboratoriais que se encontram no seu prontuário. Os dados coletados no prontuário serão mantidos em sigilo e confidencialidade.

O Sr. será acompanhado normalmente no ambulatório de urologia e não haverá nenhum prejuízo para o seu tratamento.

BENEFÍCIOS

Os benefícios estão relacionados ao desenvolvimento de um método diagnóstico não invasivo e seguro que poderá servir para o diagnóstico, indicação de tratamento, e para o acompanhamento dos pacientes varicocele e infertilidade. Se o Sr. for diagnosticado com varicocele e infertilidade, você receberá tratamento e acompanhamento adequados no serviço de urologia do IMIP-PE

RISCOS

Os riscos estimados são relativos à queixa de dor ou desconforto durante a coleta de sangue e ao constrangimento ou mal-estar social dos sujeitos para coleta do sêmen e entrega do material. Para minimizar esses riscos, a coleta dessas amostras será feita em local adequado e por profissionais experientes.

CUSTOS

Não haverá remuneração para participar desta pesquisa, bem como o senhor não pagará nada para participar da mesma. Se houver necessidade, as despesas para a sua participação serão assumidas pelos pesquisadores (ressarcimento de transporte e alimentação). Fica também garantida indenização em casos de danos, comprovadamente decorrentes da participação na pesquisa, conforme decisão judicial ou extrajudicial.

CONFIDENCIALIDADE

Se você optar por participar desta pesquisa, as informações sobre a sua saúde e seus dados pessoais serão mantidas de maneira confidencial e sigilosa. Seus dados somente serão utilizados depois sem sua identificação. Apenas os pesquisadores autorizados terão acesso aos dados individuais, resultados de exames e testes bem como às informações do seu registro médico. Mesmo que estes dados sejam utilizados para propósitos de divulgação e/ou publicação científica, sua identidade permanecerá em segredo. Estes dados ficarão armazenados em pastas de arquivo e sob a forma de planilhas eletrônicas criptografadas sob a responsabilidade do pesquisador, no endereço Rua Gilherme Salazar, n 150, apt 601E, Poço da Panela, Recife – PE, CEP 52061-275, pelo período de mínimo 5 anos

PARTICIPAÇÃO VOLUNTÁRIA

A sua participação é voluntária e a recusa em autorizar a sua participação não acarretará quaisquer penalidades ou perda de benefícios aos quais você tem direito, ou mudança no seu tratamento e acompanhamento médico nesta instituição. Você poderá retirar seu consentimento a qualquer

momento sem qualquer prejuízo. Em caso de você decidir interromper sua participação na pesquisa, a equipe de pesquisadores deve ser comunicada e a coleta de dados relativos à pesquisa será imediatamente interrompida.

ACESSO AOS RESULTADOS DE EXAMES

Você pode ter acesso a qualquer resultado relacionado à esta pesquisa. Estes resultados serão enviados ao seu médico e ele falará com você. Se você tiver interesse, você poderá receber uma cópia dos resultados.

GARANTIA DE ESCLARECIMENTOS

A pessoa responsável pela obtenção deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido lhe explicou claramente o conteúdo destas informações e se colocou à disposição para responder às suas perguntas sempre que tiver novas dúvidas. Você terá garantia de acesso, em qualquer etapa da pesquisa, sobre qualquer esclarecimento de eventuais dúvidas e inclusive para tomar conhecimento dos resultados desta pesquisa. Neste caso, por favor, ligue para o Dr. Filipe Tenório Lira Neto no telefone (81) 982322435 de 08:00 às 18:00. Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Centro de Ciências da Saúde da UFPE e pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do IMIP. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre esta pesquisa, entre em contato com o CEP-IMIP e/ou CEP-UFPE com o que objetiva defender os interesses dos participantes, respeitando seus direitos e contribuir para o desenvolvimento da pesquisa desde que atenda às condutas éticas. O CEP-IMIP está situado à **Rua dos Coelhos, nº 300, Boa Vista. Diretoria de Pesquisa do IMIP, Prédio Administrativo Orlando Onofre, 1º Andar tel: 2122-4756**

– E-mail: comitedeetica@imip.org.br O CEP/IMIP funciona de 2ª a 6ª feira, nos seguintes horários: 07:00 às 11:30 h (manhã) e 13:30 às 16:00h (tarde), e o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: (Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br).

Este termo está sendo elaborado em duas vias, sendo que uma via ficará com você e outra será arquivada com os pesquisadores responsáveis.

CONSENTIMENTO

Li as informações acima e entendi o propósito do estudo. Ficaram claros para mim quais são procedimentos a serem realizados, riscos, benefícios e a garantia de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que a minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso aos dados e de esclarecer minhas dúvidas a qualquer tempo.

Entendo que meu nome não será publicado e toda tentativa será feita para assegurar o meu anonimato.

Concordo voluntariamente em participar desta pesquisa e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidade ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido.

() Eu concordo em participar desta pesquisa e **CONCORDO** em ter minhas amostras armazenadas e utilizadas para uso em pesquisas futuras aprovadas pelo Comitê de Ética em Pesquisa do IMIP e para isto deverei assinar no futuro, um novo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, se eu concordar. OU

() Eu concordo em participar desta pesquisa, mas **NÃO CONCORDO** em ter minhas amostras armazenadas para uso em pesquisas futuras.

Eu, por intermédio deste, dou livremente meu consentimento para participar nesta pesquisa.

Local e Data: _____

Nome e Assinatura do participante

____/____/____

Nome e Assinatura do Responsável Legal
(quando pertinente)

Impressão
digital

Data

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores):

| | |
|-------------|-------------|
| Nome: | Nome: |
| Assinatura: | Assinatura: |

Eu, abaixo assinado, expliquei completamente os detalhes relevantes desta pesquisa ao paciente indicado acima e/ou pessoa autorizada para consentir pelo mesmo. Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente para a participação desta pesquisa.

____/____/____

Nome e Assinatura do Responsável pela obtenção do Termo

Data

APÊNDICE B – FICHA DE COLETA DE DADOS

FICHA DE AVALIAÇÃO DO PACIENTE

| | | | |
|---|--------------|--|--|
| Nº. | Nome: | DN: ___/___/___ | Idade: |
| Infertilidade: <input type="checkbox"/> Primária <input type="checkbox"/> Secundária. Tempo: | | Exame físico: IMC: _____ <input type="checkbox"/> Varicocele esq. Grau: <input type="checkbox"/> Varicocele dir. Grau: | Outra causa de infertilidade? Qual? |
| Comorbidade: Puberdade idade _____ anos <input type="checkbox"/> HAS <input type="checkbox"/> DM <input type="checkbox"/> Dislipidemia <input type="checkbox"/> Criptorquidismo lado: _____ <input type="checkbox"/> IST Qual? _____ <input type="checkbox"/> Medicamentos: _____ <input type="checkbox"/> Tabagismo _____ cig/d <input type="checkbox"/> Trauma escrotal <input type="checkbox"/> Exposição a agrotóxicos: _____ <input type="checkbox"/> ITU/epididimite <input type="checkbox"/> Drogas recreativas Qual? _____ <input type="checkbox"/> Testosterona/Esteroides Qual/Quando? _____ <input type="checkbox"/> Malformações _____ <input type="checkbox"/> Cirurgia Qual/Quando? _____ <input type="checkbox"/> Filhos(idades): _____ Ocupação: _____ | | | |
| Dados da parceira: Idade _____ anos G ___ P ___ A ___ Menstruação regular () S () N Ciclo: _____ dias Dismenorreia () S () N Menorragia () S () N Doença pélvica () S () N qual? _____ Cirurgia pélvica () S () N qual? _____ Tratamento de fertilidade () S () N qual? _____ Anticoncepcional anterior: _____ | | | |
| Exames Solicitados Pré-Operatório <input type="checkbox"/> USG de bolsa escrotal. Data: ___/___/____. Vol TD: _____ mL Vol TE: _____ mL Refluxo venoso D () E () Diâmetro da veia D _____ mm E _____ mm <input type="checkbox"/> Espermograma. Data: ___/___/____. Vol _____ mL Ph _____ Conc _____ x10 ⁶ Mot A+B _____ % Mot C _____ % Kruger _____ % <input type="checkbox"/> Perfil Hormonal. Data: ___/___/____. Resultado: T _____ E _____ FSH _____ LH _____ SBHG _____ Albumina _____ | | Exames Solicitados Pré-Operatório <input type="checkbox"/> USG de bolsa escrotal. Data: ___/___/____. Vol TD: _____ mL Vol TE: _____ mL Refluxo venoso D () E () Diâmetro da veia D _____ mm E _____ mm <input type="checkbox"/> Espermograma. Data: ___/___/____. Vol _____ mL Ph _____ Conc _____ x10 ⁶ Mot A+B _____ % Mot C _____ % Kruger _____ % <input type="checkbox"/> Perfil Hormonal. Data: ___/___/____. Resultado: T _____ E _____ FSH _____ LH _____ SBHG _____ Albumina _____ | |
| O paciente apresentou Complicação da doença? | | <input type="checkbox"/> Não apresentou nenhuma complicação. Sim , apresentou: <input type="checkbox"/> dor <input type="checkbox"/> atrofia testicular <input type="checkbox"/> hipogonadismo <input type="checkbox"/> hematoma <input type="checkbox"/> Infecção <input type="checkbox"/> dor pós-cirurgia <input type="checkbox"/> outros: | |

Observações: _____

Data: ___/___/____ **Médico Responsável:** _____

APÊNDICE C – ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO NO PERIÓDICO ANDROLOGY

Received: 5 October 2021 | Revised: 9 August 2022 | Accepted: 20 August 2022

DOI: 10.1111/andr.13281

ORIGINAL ARTICLE

ANDROLOGY  WILEY

Prediction of semen analysis parameter improvement after varicocelectomy using ¹H NMR-based metabolomics assays

Filipe Tenorio Lira Neto^{1,3,5}  | Ronmilson Alves Marques² | Alexandre de Freitas Cavalcanti Filho³ | João Eduardo Freire da Fonte⁴ | Salvador Vilar Correia Lima⁵ | Ricardo Oliveira Silva⁶

¹Andros Recife, Recife, Brazil. Department of Urology, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira, Recife, Brazil. Departamento de Cirurgia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

²Department of Fundamental Chemistry, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

³Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira, Recife, Brazil

⁴Department of Radiology, Real Hospital de Beneficência Portuguesa, Recife, Brazil

⁵Department of Surgery, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

⁶Department of Fundamental Chemistry, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

Correspondence

Filipe Tenorio Lira Neto, Andros Recife, Recife, Brazil. Department of Urology, Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira, Recife, Brazil. Departamento de Cirurgia, Universidade Federal de Pernambuco, Avenida Boa Viagem, n.178, apt 901, Recife-PE, CEP 51011-000, Brazil.
Email: filipe@androsrecife.com.br

Funding information

Pernambuco Science and Technology Foundation - FACEPE. Grant/Award Number: APQ-0765-1.06/14; National Council for Scientific and Technological Development. Grant/Award Numbers: CNPq 306616/2013-0, 88887.500945/2020-00

Abstract

Background: Varicocele is the most common correctable cause of male infertility; however, predicting varicocelectomy outcomes is difficult. "Omics" techniques have been increasingly used to develop new diagnostic and prognostic tools for several male infertility causes, and could be applied to study varicocele.

Objectives: The objective is to create metabolomics models capable of segregating men who improved semen analysis (SA) parameters or achieved natural pregnancy after microsurgical varicocelectomy (MV) from those who did not, using hydrogen-1 nuclear magnetic resonance (¹H NMR) spectra of seminal plasma of pre-operative samples.

Material and methods: We recruited 29 infertile men with palpable varicocele. ¹H NMR spectra of seminal plasma were obtained from pre-operative samples and used to create metabolomics models. Improvement was defined as an increase in the total motile progressive sperm count (TMC) of the post-operative SA when compared to the baseline, and pregnancy was assessed for 24 months after MV.

Results: Using linear discriminant analysis (LDA), we created a model that discriminated the men who improved SA from those who did not with accuracy of 93.1%. Another model segregated men who achieved natural pregnancy from men who did not. We identified seven metabolites that were important for group segregation: caprylate, isoleucine, N-acetyltyrosine, carnitine, N-acetylcarnitine, creatine, and threonine.

Discussion: We described the use of metabolomics model to predict with high accuracy the outcomes of MV in infertile men with varicocele. The most important

© 2022 American Society of Andrology and European Academy of Andrology.

Andrology. 2022;10:1581–1592.

wileyonlinelibrary.com/journal/andr

1581

metabolites for group segregation are involved in energy metabolism and oxidative stress response, highlighting the pivotal role of these mechanisms in the pathophysiology of varicocele.

Conclusions: ^1H NMR spectroscopy of seminal plasma can be used in conjunction with multivariate statistical tools to create metabolomics models useful to segregate men with varicocele based on the reproductive outcomes of MV. These models may help counseling infertile men with varicocele regarding their prognosis after surgery.

KEYWORDS

fertility, metabolome, metabolomics, NMR spectroscopy, pregnancy, varicocele

1 | INTRODUCTION

Varicocele is the most common correctable cause of male infertility, found in 40% of infertile men.¹ This condition is defined as an abnormal dilation of internal spermatic veins because of venous blood reflux caused by incompetent venous valves. Several pathophysiological mechanisms have been proposed to explain the damage to spermatogenesis induced by varicocele, including testicular hyperthermia, excessive oxidative stress, reflux of adrenal gland metabolites, damage to the blood-testis barrier, and formation of anti-sperm antibodies.²

Treatment of varicoceles is recommended for infertile men who have palpable varicoceles and abnormal semen analysis (SA) parameters.³ In this scenario, varicocele correction has been shown to improve SA parameters, pregnancy rate, and assisted reproductive techniques outcomes.^{4–7} Microsurgical varicocelectomy (MV) is the gold-standard treatment for varicoceles, because of its high efficacy and low morbidity when compared with other treatment options.^{8,9} However, not every infertile man who undergoes varicocelectomy will improve SA parameters or achieve natural pregnancy after the procedure. In fact, literature shows SA improvement rates ranging from 64% to 81%^{10–12} and natural pregnancy rates from 29% to 60% after MV.^{8,10,13} Furthermore, predicting varicocelectomy outcomes at individual level is a difficult task. Despite the identification of several aspects that affect varicocelectomy outcomes, such as age, varicocele grade, body mass index (BMI) testicular size, sperm concentration, sperm motility, follicle-stimulating hormone (FSH) levels, and inflammation markers,^{11,12,14–17} to this date, there are no clinically validated predictors or prediction tools that precisely foresee MV outcomes.¹⁸

In order to develop new diagnostic, therapeutic, and prognostic tools for several male infertility causes, “omics” techniques have been increasingly used.¹⁹ The “omics” methods use high-throughput techniques to study several biological systems in a step-by-step fashion, progressing from the most basic information, the genome, passing through mechanisms that modify and process this information, the epigenome and the transcriptome, reaching the functional elements, the proteome, and ending in the net effects of their action, the metabolome, and the phenome. This integrated approach relies heavily on chemical analytical methods, producing a massive amount of data

that should be interpreted using bioinformatics and computational analysis tools in order to deliver clinically useful information.²⁰

The metabolome, the complete set of metabolites in a sample, is the final product of all biological processes and has a direct relationship to phenotypes, being influenced by various physiological and pathological factors.²¹ Metabonomics is the study of how the metabolome of living systems changes in response to endogenous or exogenous stimuli.^{22,23} Metabonomics studies apply several different techniques to analyze the changes of the metabolome caused by a certain stimulus. Hydrogen-1 nuclear magnetic resonance (^1H NMR) spectroscopy is the most used of such techniques, and functions by extracting spectral data from biological samples. Further processing of these data is carried out with chemometrics and multivariate statistical tools.^{22,24,25} There are several reports using ^1H NMR-based metabonomics to identify biomarkers useful in the diagnosis of some male infertility conditions.¹⁹ Recently, our group has applied this strategy, using ^1H NMR spectra of seminal plasma to create metabonomics-based models that were able to discriminate fertile healthy men from fertile men with varicocele and from infertile men with varicocele.²⁶ Therefore, we hypothesized that the seminal metabolome carries not only diagnostic, but also prognostic information that could be used to predict the outcomes of microsurgical varicocelectomy.

We aimed to study if changes in the seminal metabolome caused by varicocele could be used to create metabolomics models capable of discriminating men who improved SA parameters after MV from those who did not improve, as well as to create a model to segregate men who achieved natural pregnancy from those who did not.

2 | METHODS

2.1 | Patient and study groups

This study was approved by the Research Ethics Committee of Universidade Federal de Pernambuco and Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira (approval n. 2.075.028). We invited infertile men with palpable varicocele, aged between 18 and 50 years, and attending a male fertility outpatient clinic. Infertility was defined based on the Practice Committee of the American Society for Reproductive

Medicine as failure to conceive after 12 months of regular and unprotected intercourse.²⁷ Participants were excluded if they presented any of the following: evidence of urogenital infection, genetic defects, history of cryptorchidism, current or recent (<12 months) use of testosterone or any anabolic steroids, history of chemotherapy or radiotherapy, history of scrotal trauma, history of scrotal surgery. All the participants underwent complete evaluation by a single male infertility specialist. Puberty age was considered as the age when the participant first noticed appearance of pubic hair or an increase of penile or testicular size. Physical exam was performed in a warm and well illuminated room, with the participant in supine and standing positions. Testicular size was measured using a Prader orchidometer and varicocele grade was classified based on the Dubin and Amelar criteria.²⁸ The female partners were questioned about their age, past history of fertility and/or fertility treatments, past history of pelvic surgeries or pelvic pathologies, and about the regularity and intensity of their menstrual cycle. However, further female fertility evaluation was not available at our institution. Written informed consent was obtained from all participants before their inclusion in the study and anonymity was granted.

All participants underwent SA, scrotal duplex ultrasonography (USGD), and sex hormones levels measurement. SA was performed by the same technician according the World Health Organization guidelines, seminal pH was measured using pH testing strips.²⁹ Scrotal duplex ultrasonography was performed by a single radiologist (GE Logiq S8 GE Healthcare, Wauwaosa, WI, USA) using a linear high-frequency probe (SL 15-8-MHz GE Healthcare, Wauwaosa, WI, USA), and was used to evaluate testicular size, varicocele diameter, and venous reflux. Venous blood samples were drawn from each participant between 7 and 11 AM, after an overnight fast. Total testosterone (reference range: 206 to 1200 ng/dL), estradiol (reference range: 11.6 to 41.2 pg/mL), follicle stimulating hormone (FSH) (reference range: 1.4 to 18.1 mIU/mL), luteinizing hormone (LH) (reference range: 1.5 to 9.3 mIU/mL), and sex hormone binding protein (reference range: 10 to 57 nmol/L) levels were measured in real-time by a solid-phase chemiluminescent immunoassay with the use of an automated analyzer (ADVIA Centaur XP, Siemens Healthcare Diagnostics, www.siemens-healthineers.com). Albumin levels (reference range: 3.4 to 4.8 g/dL) were measured using a colorimetric assay (Abbott Diagnostics, Abbott Park, IL, USA) with an autoanalyzer (Architect® c16000, Abbott Diagnostics, www.corelaboratory.abbott). Free testosterone levels (reference range: 49.9 to 199.9 pg/mL) were calculated using the validated formula of Vermeulen et al.³⁰ Severe oligospermic (<5 × 10⁶ spermatozoa/mL) or azoospermic patients were included only when their karyotyping was normal and Y chromosome microdeletions were absent.

After diagnostic work-up, all participants with one or more abnormal SA parameters were submitted to artery and lymphatic sparing microsurgical subinguinal varicocelectomy³¹ by a single surgeon (FTLN). During follow-up, participants were instructed to collect a new semen sample for SA 3 months after the procedure. Participants were followed up until 24 months or until natural pregnancy if it happened before this time period.

The participants were divided into groups based on the improvement of SA parameters (improved vs. non-improved groups) and whether or not they achieved natural pregnancy (pregnant vs. non-pregnant groups) after MV during follow-up. We defined improvement as an increase of at least 20% in the total motile progressive sperm count (TMC) of the post-operative SA in comparison to the baseline. This definition was based on several publications reporting that TMC is a better pregnancy predictor than other conventional SA parameters.^{32–35} Pregnancy was defined as the presence of a gestational sack with heartbeat.³⁶ Participants with azoospermia and normal genetic workup were included in the analysis based on improvement of SA parameters, but excluded from the analysis based on pregnancy because of the low probability of natural pregnancy evidenced by the literature.³⁷

2.2 | ¹H NMR analysis

¹H NMR spectra were acquired at the Analytics Central of the Fundamental Chemistry Department at the Universidade Federal de Pernambuco using the semen samples produced before surgery. The investigators performing NMR analysis were blinded to the classification of each patient. Following semen liquefaction, the samples were centrifuged at 3000 g for 15 min to separate the spermatozoa from the supernatant seminal plasma. The seminal plasma samples were kept frozen at -20°C until ¹H NMR analysis. After thawing, 400 µL of seminal plasma were added to 200 µL of D₂O, and each sample was submitted to ¹H NMR analysis separately and randomly. ¹H NMR spectra were acquired using VNMR5400 spectrometer operating at 400 MHz. The Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) pulse sequence with pre-saturation of the water signal was used as follows: spectral window of 4.8 kHz, saturation delay of 2.0 s, acquisition time of 1.704 s, 90° RF pulse, temperature of 27°C, 88 cycles, tau equal to 0.0004 s, bigtau equal to 0.07 s and 128 scans. Each spectrum was acquired using total time equal to 10.0 min 4 seg. The line broadening used was 0.3 Hz, baseline and phase distortions were corrected manually, and the signal attributed to citrate methylene group (δ 2.65 ppm) was used as internal chemical shift reference. Using the MestreNova 9.0 software, the region of the spectra between δ 8.01 and 0.69 ppm was divided into regions equals to 0.04 ppm. The region between δ 5.50 and 4.50 ppm was excluded because it contained a residual signal of water. A matrix with 29 rows (cases) and 160 variables (bins of ¹H NMR spectra plus two class variables) was built and submitted to multivariate analysis.

2.3 | Statistical analysis

To investigate the distribution of demographic and clinical data between groups, univariate tests were performed using GraphPad Prism 6 software (GraphPad Software, Inc., La Jolla, CA). Because of the small sample size, we chose to use non-parametric tests and to present numerical data using median and interquartile range. The

Mann-Whitney's U-test was used to compare continuous variables between two groups. In addition, to compare baseline versus post-operative continuous variables from the same group, we used the Wilcoxon signed rank test. Categorical variables were compared by Fisher's exact test. A *p* value of <0.05 was set as the level of statistical significance.

2.4 | Multivariate statistical analysis

We built metabonomics models with two different aims: 1) to differentiate improved group (I) from non-improved group (NI) (model IxNI); 2) to segregate the pregnant group (P) from the non-pregnant group (NP) (model PxNP). Linear discriminant analysis (LDA) metabonomics models was performed using the TIBCO Data Science / Statistica 12 software (StatSoft Europe, Hamburg, Germany). The models developed by LDA were built using five variables selected using Wilks' lambda, and validated by leave-one-out-cross validation (LOOCV). Fisher's exact test was used to evaluate the discriminant functions. It was performed using 23 and 5 degrees of freedom for the model IxNI, and 17 and 5 degrees of freedom for the model (PxNP). Results were presented using confusion matrices with sensitivity, specificity and accuracy values. In addition, we created a model that combined one discriminant function from the model IxNI with one discriminant function from the model PxN. The samples were projected on the space defined by these two discriminant functions. Arbitrarily, we defined two cutoff points for classification: samples which presented score values of less than 145 in the IxNI discriminant function and less than 156 in the PxNP discriminant function, were classified as samples with high probability of success after varicocelectomy microsurgery.

The chemical shifts identified by the models as the most important variables for group discrimination were assigned to metabolites using the Human Metabolome Database (HMDB)³⁸ and the work by Paiva et al.³⁹

3 | RESULTS

3.1 | Group demographics

We enrolled and collected baseline semen samples from 45 men infertile with varicocele and abnormal SA parameters, however six men declined surgery after collecting the baseline semen sample and 10 men were lost to follow-up after surgery. Thus, only 29 participants who underwent MV and had post-operative SA data available were included in the analysis based on the improvement of post-operative SA parameters. Among these, five participants with azoospermia and one participant that was lost to follow-up after the post-operative SA were excluded from the analysis based on pregnancy. Eighteen (62%) participants fulfilled the improvement criteria and were included in the group I; the remaining 11 participants were included in the group NI. Furthermore, 10 participants achieved natural pregnancy during the follow-up and were included in the group P; while the 13 par-

ticipants that failed to do so were included in the group NP. There was no difference regarding the distribution of the participants from groups P and NP among the groups I and NI (Table S1). The baseline clinical characteristics of the groups are shown in Table 1. Most parameters showed no differences between the groups I and NI; however, group I participants had lower LH levels. There were two (11%) azoospermic participants in the group I, and three (27%) in the group NI (*p*-value = 0.33). Participants included in group P showed higher baseline total sperm count (21.8×10^6 vs. 5.0×10^6 spermatozoa; *p*-value < 0.05) and TMC (7.1×10^6 vs. 1.2×10^6 spermatozoa; *p*-value < 0.05) when compared to group NP. In addition, the partners of group P participants were younger than those of group NP (28 vs. 32 years; *p*-value < 0.05). There were no significant differences regarding intraoperative findings between the groups (Table S2).

3.2 | Post-operative semen analysis

As expected, the changes between pre-operative and post-operative SA parameters revealed different patterns for the groups I and NI. The patients of group I showed significant improvements in sperm concentration (3.0×10^6 vs. 16.0×10^6 spermatozoa/mL; *p*-value < 0.05), total sperm count (8.5×10^6 vs. 41.0×10^6 spermatozoa; *p*-value < 0.05), progressive motility (26% vs. 39%; *p*-value < 0.05), and TMC (1.7×10^6 vs. 14.7×10^6 spermatozoa; *p*-value < 0.05) (Table S3). Conversely, the group NI had significant decrease in sperm concentration (5.0×10^6 vs. 1.0×10^6 spermatozoa/mL; *p*-value < 0.05), total sperm count (12.5×10^6 vs. 5.0×10^6 spermatozoa; *p*-value < 0.05), and TMC (1.9×10^6 vs. 0.2×10^6 spermatozoa; *p*-value < 0.05), (Table S4).

Analyses of the post-operative SA parameters of groups P and NP revealed no differences from baseline in group NP whereas the group P had a significant increase in TMC from baseline (7.1×10^6 vs. 22.1×10^6 spermatozoa; *p*-value < 0.05) (Tables S5 and S6).

When the post-operative SA parameters were compared between the groups, the group I showed higher sperm concentration, total sperm count, progressive motility, TMC, and morphology than the group NI (Table 2). Concerning the changes of TMC from baseline, the group I had a median increase of 12.2×10^6 spermatozoa whereas the group NI had a median decrease of -1.7×10^6 spermatozoa (*p*-value < 0.05). When the changes were analyzed using percentage, this difference was further highlighted, the group I demonstrated an increase of 275% (range 44% to 3400%) and the group NI had a decrease of -59% (range -8% to -96%) (*p*-value < 0.05). The comparisons of post-operative SA parameters between groups P and NP revealed that group P had higher progressive motility, TMC, and morphology (Table 2).

One participant developed a hematoma which was treated conservatively, while another participant had one right testicular artery ligated, but other three right testicular arteries were preserved. Both participants with complications were classified in group NI; regarding pregnancy, the participant with hematoma was classified in group NP whereas the participant with ligated right testicular artery was classified in group P.

TABLE 1 Baseline clinical characteristics

| | Non-improved | Improved | p-Value | Non-pregnant | Pregnant | p-Value |
|--|-------------------|-------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| Number n (%) | 11 (38%) | 18 (62%) | NA | 13 (56%) | 10 (44%) | NA |
| Age (years), median (IQR) | 32 (29, 37) | 31 (27, 36) | 0.62 ^b | 34 (28, 38) | 30 (27, 33) | 0.20 ^b |
| Partner age (years), median (IQR) | 32 (29, 34) | 30 (27, 33) | 0.45 ^b | 32 (30, 35) | 28 (27, 30) | <0.05 ^b |
| Puberty age (years), median (IQR) | 14 (14, 15) | 14 (13, 15) | 0.38 ^b | 14 (13, 15) | 14 (12, 15) | 0.55 ^b |
| Primary infertility (%) | 100% | 94% | 1.00 [†] | 92% | 100% | 1.00 [†] |
| Right testis size by physical exam (mL), median (IQR) | 15 (12, 20) | 15 (11, 20) | 0.83 ^b | 15 (11, 20) | 18 (14, 20) | 0.57 ^b |
| Left testis size by physical exam (mL), median (IQR) | 10 (10, 15) | 11 (8, 20) | 0.70 ^b | 12 (6, 15) | 11 (10, 20) | 0.55 ^b |
| Bilateral varicocele (%) | 64% | 61% | 0.66 [†] | 54% | 70% | 0.66 [†] |
| Grade 1 left varicocele (%) | 9% | 22% | | 16% | 20% | |
| Grade 2 left varicocele (%) | 36% | 33% | | 38% | 20% | |
| Grade 3 left varicocele (%) | 55% | 45% | 0.74 [†] | 46% | 60% | 0.74 [†] |
| Grade 1 right varicocele (%) | 70% | 50% | | 33% | 86% | |
| Grade 2 right varicocele (%) | 15% | 33% | | 33% | 14% | |
| Grade 3 right varicocele (%) | 15% | 17% | 0.17 [†] | 33% | 0% | 0.17 [†] |
| Sperm concentration (10 ⁶ /mL), median (IQR) | 5.0 (0.0, 11.0) | 3.0 (0.5, 11.5) | 0.89 ^b | 3.0 (0.0, 9) | 9.5 (3.0, 14.5) | 0.05 ^b |
| Total sperm count (10 ⁶ /mL), median (IQR) | 12.5 (0.0, 36.0) | 8.5 (2.1, 21.8) | 0.82 ^b | 5.0 (2.7, 23.8) | 21.8 (13.5, 59.8) | <0.05 ^b |
| Progressive motility (%), median (IQR) | 26 (13, 42) | 26 (9, 36) | 0.70 ^b | 20 (10, 33) | 35 (25, 43) | 0.08 ^b |
| Total progressive motile sperm count (10 ⁶ /mL), median (IQR) | 1.9 (0.0, 23.0) | 1.7 (0.1, 7.1) | 0.68 ^b | 1.2 (0.2, 6.9) | 7.1 (2.4, 23.7) | <0.05 ^b |
| Morphology (%), median (IQR) | 5.5 (4.0, 10.0) | 9.0 (4.5, 11.0) | 0.46 ^b | 6.0 (3.5, 10.0) | 9.5 (4.5, 15.0) | 0.27 ^b |
| Volume (mL), median (IQR) | 3.5 (2.5, 4.0) | 2.3 (1.5, 4.3) | 0.34 ^b | 2.5 (1.5, 3.8) | 4.0 (1.5, 6.0) | 0.15 ^b |
| pH, median (IQR) | 7.5 (7.0, 8.0) | 7.0 (7.0, 8.0) | NA | 7.5 (7.0, 8.0) | 7.5 (7.0, 8.0) | NA |
| Testosterone (ng/dL), median (IQR) | 393 (311, 604) | 347 (285, 553) | 0.25 ^b | 312 (257, 654) | 408 (334, 518) | 0.92 ^b |
| Free testosterone (ng/dL), median (IQR) | 8.8 (6.2, 11.1) | 7.6 (5.2, 11.1) | 0.45 ^b | 7.3 (4.5, 11.4) | 8.2 (6.3, 10.2) | 0.71 ^b |
| Estradiol (pg/mL), median (IQR) | 25.9 (12.3, 35.1) | 36.4 (22.1, 40.8) | 0.18 ^b | 36.9 (25.1, 35.9) | 26.2 (20.3, 38.9) | 0.30 ^b |
| FSH (mIU/mL), median (IQR) | 6.6 (4.5, 9.1) | 8.2 (4.0, 10.9) | 0.91 ^b | 6.3 (4.0, 9.1) | 6.8 (3.9, 8.4) | 0.80 ^b |
| LH (mIU/mL), median (IQR) | 6.8 (4.8, 8.0) | 4.2 (2.7, 5.5) | <0.05 ^b | 4.7 (2.7, 7.0) | 4.2 (3.3, 5.8) | 0.85 ^b |
| Right testis size by ultrasound (mL), median (IQR) | 12.6 (10.0, 15.5) | 11.1 (9.1, 13.8) | 0.31 ^b | 12.5 (8.9, 15.2) | 12.2 (9.8, 18.9) | 0.92 ^b |
| Left testis size by ultrasound (mL), median (IQR) | 9.7 (9.0, 10.9) | 9.7 (6.7, 12.4) | 0.78 ^b | 9.8 (8.0, 11.9) | 10.5 (8.1, 16.1) | 0.75 ^b |
| Right testicular vein size by color Doppler (cm), median (IQR) | 2.5 (2.0, 4.1) | 2.8 (2.3, 3.2) | 0.91 ^b | 2.8 (2.0, 3.5) | 2.7 (2.3, 3.2) | 0.96 ^b |
| Left testicular vein size by color Doppler (cm), median (IQR) | 4.0 (2.5, 4.6) | 3.6 (3.0, 4.2) | 0.68 ^b | 4.0 (2.7, 4.5) | 3.6 (3.1, 4.0) | 0.92 ^b |

Abbreviations: BMI, body mass index; FSH, follicle stimulating hormone; LH, luteinizing hormone; NA, not applicable.

[†]by Fisher exact test; ^bby Mann Whitney test.

3.3 | Spectral data and multivariate analyses

Examples of ¹H NMR spectra of seminal plasma are shown in Figure S1. The areas under the peaks are associated to concentration of metabolites weighted by number of hydrogen nuclei in each chemical environment. Some peaks had their respective chemical compounds assigned in the spectrum.

Exploratory analysis using principal components analysis (PCA) did not show clustering in studied classes. In order to optimize the results regarding the discrimination between groups I and NI, and groups P

and NP, we decided to use linear discriminant analysis, a supervised method. Discriminant functions (DFs) were built using five variables selected using Wilks' lambda. The variables selected for the LDA metabonomics model IxNI presented the following chemical shifts δ (ppm): 0.85, 1.97, 2.89, 3.90, and 6.83. Figure 1 shows the DFs obtained for the metabonomics model IxNI and projection of samples at space defined by these DF.

Low scores at DFs lead the sample to be classified as part of the group I, while high scores lead to classification in the group NI. Table 3 presents confusion matrix with LDA-Metabonomics model IxNI

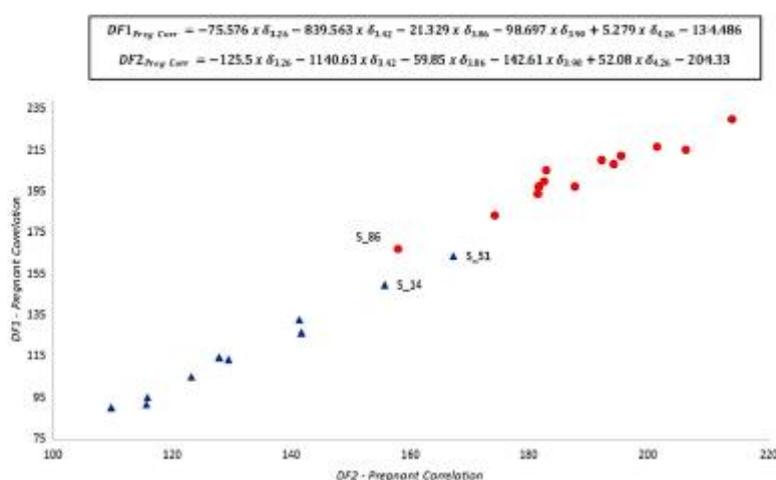


FIGURE 2 Score plot from LDA metabonomics model PxNP ($F_{17,5} = 27,95$ p -value < 0.001) using 10 samples from pregnant group (blue triangles) and 13 samples from non-pregnant group (red dots). DF 1 and 2 are the discriminant functions obtained for the metabonomics model PxNP.

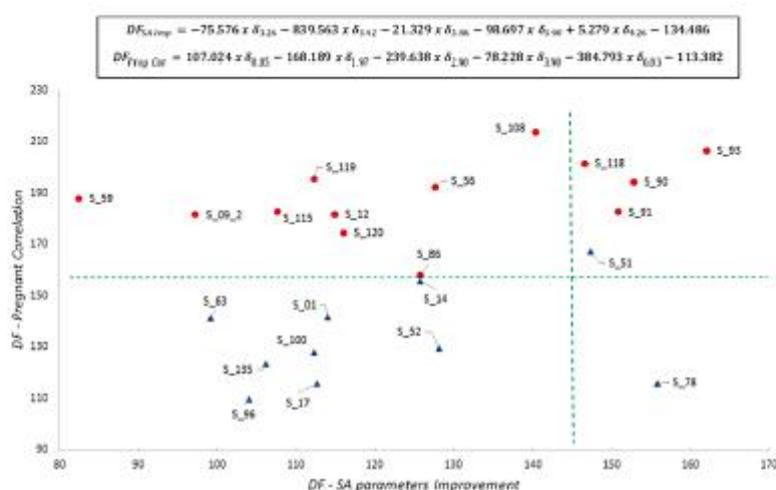


FIGURE 3 Projection of the samples in the coordinate system defined by discriminant functions for SA parameter improvement prediction and pregnancy correlation. Red circles are samples from participants who did not achieve pregnancy within 24 months of surgery; the blue triangles are samples from participants who managed to impregnate their partner. The dashed lines are the cut-off values for each discriminant function. $DF_{SA IMP}$ is a discriminant functions obtained for the metabonomics model NxNI, and $DF_{PRE COR}$ is a discriminant functions obtained for the metabonomics model PxNP.

case of sample numbers 14 and 86, which belong to different groups, they practically overlap in the coordinate system defined by the two discriminant functions. This suggests a dubious classification. In the cross-validation, we observed that the model PxNP misclassifies only the sample number 31.

Chemical shifts selected and used in DFs of model NxNI were attributed to caprylate ($\delta 0.85$ ppm), isoleucine ($\delta 1.97$ ppm), creatine

($\delta 3.90$ ppm), and N-acetyltyrosine (NAT, $\delta 6.83$ ppm). The signal at $\delta 2.90$ ppm was not identified. Regarding model PxNP, we identified the following metabolites: carnitine ($\delta 3.42$ ppm), N-acetylcarnitine (NAC, $\delta 3.86$ ppm), creatine ($\delta 3.90$ ppm), threonine ($\delta 4.26$ ppm). The signal at $\delta 3.26$ ppm can be attributed to arginine or glucose or even trimethylamine N-oxide. Table S7 presents the mean intensity per group of the variables used to obtain score of each sample at

TABLE 3 Confusion matrix-LDA metabonomics model IxNI using five variables selected from ^1H NMR spectral data obtained from seminal plasma of 29 volunteers

| Model | Groups | | p-Value |
|--------------|-------------------|-----------------------|---------|
| | Improved (n = 18) | Non-improved (n = 11) | |
| Improved | 17 | 1 | <0.001 |
| Non-improved | 1 | 10 | |

TABLE 4 Confusion matrix-LDA metabonomics model PxNP using five variables selected from ^1H NMR spectral data obtained from seminal plasma of 23 volunteers

| Model | Groups | | p-Value |
|--------------|-------------------|-----------------------|---------|
| | Pregnant (n = 11) | Non-pregnant (n = 12) | |
| Pregnant | 11 | 0 | <0.001 |
| Non-pregnant | 0 | 12 | |

DFs of both models. When univariate analyses were performed to assess the ability of each variable to independently discriminate the groups, we found that no variable presented discriminatory power in for the model IxNI. However, for pregnancy correlation modeling, three variables showed discriminatory power, but with accuracy levels significantly lower than the multivariate model.

4 | DISCUSSION

We described, for the first time, the use of metabonomics to segregate infertile men with clinical varicocele based on the outcomes of MV. These preliminary models were able to differentiate men who had improvements in SA as well as those who achieved natural pregnancy after MV.

In our study, 62% of the participants demonstrated improvement in the TMC three months after MV. This rate of improvement is within the range reported by other authors (64% to 81%).¹⁰⁻¹² In addition, there was a clinically significant difference between the groups I and NI regarding the changes in the TMC from the baseline to the post-operative SA (group I increase of 275% vs. group NI decrease of 59%), which reinforces the opposite results of MV in the participants of each group. Regarding natural pregnancy, 44% of the participants were able to impregnate their wives during the 24 months follow-up period after the procedure. The literature reveals similar pregnancy rates after varicocelectomy, ranging from 26% to 60%.^{20,11,13} Interestingly, group P had a median post-operative TMC of 22.1×10^6 spermatozoa while the group NP had a median post-operative TMC of 3.5×10^6 spermatozoa. These findings are in agreement with cut-off levels of TMC proposed by Hamilton et al. as prognostic factors of natural pregnancy (< 5×10^6 spermatozoa as poor prognosis and > 20×10^6 spermatozoa as good prognosis).³³

We demonstrated that participants whose SA parameters improved after the procedure displayed different pre-operative seminal metabolome profile from those who did not improve. This adds to the findings of our previous study showing differential compositions of the seminal metabolome in fertile and infertile men with varicocele.²⁶ In addition, applying the statistical formalism LDA to pre-operative ^1H NMR spectral data from semen samples of infertile men with varicocele, we created a model that distinguished men whose SA parameters improved after MV from those without improvement, with accuracy of 93%. Furthermore, we also developed a model that discriminated men who naturally impregnated their wives after MV from those who did not. The relationship between the different seminal metabolome profiles found in infertile men with varicocele and the varying outcomes of MV highlights the heterogeneous nature of varicocele.

Several studies have tried to predict the results of varicocelectomy using parameters such as age, BMI, varicocele size, conventional SA parameters, sex hormones levels, and biochemical markers.^{11,14,16,40,41} However, the predictive power of many parameters when used individually is still controversial. In addition, the only nomogram created with this objective was shown to underperform in an external validation study.^{17,18} Thus, ^1H NMR-based metabonomics can have clinical application, helping in the counseling of infertile men with varicocele regarding their prognosis after surgery.

We identified the four main metabolites responsible for groups I and NI segregation: caprylate, isoleucine, creatine, and NAT. Seminal levels of these metabolites do not discriminate the groups when analyzed separately, however, the groups are segregated when the intensities of these metabolites are associated in a discriminant function. Thus, increased caprylate level leads the sample to be classified in the group NI, as this will result in higher scores at discriminant functions. Conversely, considering that the other variables showed loading with negative values, increases in the levels of isoleucine, NAT, and creatine cause the sample to be classified in the group I.

Caprylate is a medium-chain fatty acid composed of eight carbons found frequently in dairy products and palm oil. Caprylate functions as a "healthy" energy source, because of its rapid oxidation by mitochondria, suppressing body fat accumulation.⁴² Carbohydrate metabolism via glycolysis and oxidative phosphorylation is the main energy source of mature spermatozoa,⁴³ however, 24% of the sperm metabolic proteome includes proteins involved in lipid metabolism, suggesting that production of ATP in the male gamete may be achieved also via fatty acid oxidation.⁴⁴ Thus, the increased levels of caprylate found in the group NI suggest a decreased uptake of this substrate which may be associated with impaired sperm energy metabolism in men with varicocele. Isoleucine is a branched essential amino acid that has been shown to be decreased in the semen of infertile men.^{26,45} Similarly, in our study increased level of isoleucine in a sample led it to be classified in the group I. The exact mechanisms linking isoleucine with male infertility are unclear, but participation in energy metabolism and oxidative stress response are the two main possibilities. Creatine is an amino acid derivative which participates in energy metabolism regenerating adenosine triphosphate (ATP). In

addition, creatine also has antioxidant effect.⁴⁶ Studies using samples of testicular tissue from rats demonstrated that developing germ cells require large extracellular concentrations of creatine to maintain cell viability and function.⁴⁷ Likewise, we found that higher relative seminal concentrations of creatine were associated with male fertility. Conversely, a recent study employing in-vivo ¹H NMR to evaluate the biochemical milieu in testes of men with nonobstructive azoospermia, did not find different concentrations of creatine between the study and control groups.⁴⁸ Nonetheless, the evidence about the importance of creatinine in human spermatogenesis is lacking. Lastly, increased levels of NAT, a metabolite derived from tyrosine, caused a sample to be classified in the group I. In the same way, we previously reported higher relative concentration of NAT in the seminal plasma of fertile men with varicocele.²⁶ It is suggested that formation of NAT from tyrosine is a reactive oxidative species scavenging mechanism.⁴⁹ Moreover, other studies have demonstrated that seminal levels of tyrosine are altered in infertile men, further reinforcing the association between tyrosine/N-acetyltyrosine metabolism and male infertility.^{50,51}

Regarding groups P and NP, we identified carnitine, NAC, creatine, and threonine as the most important metabolites for group segregation. The higher the relative seminal concentration of carnitine, NAC, and creatine the higher the chance of the sample to be classified in the group P, on the other side, high relative seminal concentration of threonine increases the chance of the sample to be classified in group NP.

Carnitine and its bioactive product, LAC, play a major role in energy metabolism, transporting fatty acids across the outer mitochondrial membrane, one of the first steps of β -oxidation.⁵² In addition, carnitine and LAC also act as antioxidants, protecting genetic material from damage caused by oxygen free radicals, and prevent apoptosis by regulating the fluidity of phospholipid membranes.⁵³ Therefore, carnitine and LAC supplementation have been widely used in the management of male infertility and are associated with improvements in SA parameters and pregnancy rates.^{54,55} A study liquid chromatograph to analyze urinary metabolites found decreased level of LAC and other carnitine derivatives in oligospermic infertile men when compared with fertile controls.⁵⁶ In our study increased seminal concentrations of carnitine and LAC were associated with pregnancy. Threonine is an essential amino acid involved in lipid metabolism and protein synthesis.⁵⁷ Moreover, animal models have shown that threonine also participates in cell proliferation and differentiation, regulating chromosomal DNA replication and the cell cycle process.⁵⁸ Thus, it seems logical that threonine plays an important role in spermatogenesis, however, there are no human studies evaluating the association between seminal threonine levels and male infertility. In this study, increased relative levels of threonine in the semen were associated with failure to achieve a natural pregnancy.

We highlight that despite the identification of these metabolites as important variables for groups' discrimination in our study, the metabolic pathways linking them with male infertility and the response to MV remain mostly unknown. Therefore, further research is needed to clarify the importance of these metabolites for spermatogenesis.

To this date, no other study used any "omics" strategies in order to identify biomarkers or create models capable of predicting the

results of MV. However, studies using proteomics to investigate the changes in the seminal proteome in infertile men with varicocele have shown that the expression of proteins related to energy metabolism and antioxidant mechanisms were the most altered by the presence of varicocele.^{59–61} In addition, studies revealed that the seminal proteomic profile of infertile men undergoing varicocelectomy shifted toward "homeostasis," that is, the initial condition of normality, when compared to the seminal proteomic profile before surgery, which exhibited a state of stress response.⁶² Furthermore, proteins that provide protection against damage from oxidative stress and excess heat returned to their normal levels after varicocelectomy, confirming the benefit of the surgery for some men.⁶³ A recent study using liquid chromatography coupled with mass spectrometry to study the seminal metabolome demonstrated changes in the glycerol phospholipid metabolism, sphingolipid metabolism, and amino acid metabolism before and after varicocelectomy.⁶⁴ These findings are corroborated by the fact that metabolites related to energy metabolism and oxidative stress were the most important for the segregation between men who improved and those who did not improve SA after varicocelectomy in our study, further highlighting the importance of these mechanisms in pathophysiology of varicocele.

As a result of its preliminary nature, our study has some limitations. The most important is the small number of samples used in this study. Therefore, future studies with larger samples sizes are required to confirm our findings. Furthermore, the evaluation of the infertile men's partners was made by interview only, and no additional tests were performed to identify possible undiagnosed causes of female infertility. Thus, female fertility factors could not be definitely excluded and may have been a confusion factor in our analyses. However, the young age of the partners and the absence of symptoms or previous history of conditions that could cause infertility decrease the likelihood of the presence of female factor infertility.

One of the strengths of our study was the use of the infertility definition suggested by the American Society for Human Reproduction, which is currently considered the best definition to be applied in research.²⁷ In addition, the two main outcomes used to evaluate the success of MV (i.e., SA parameters and natural pregnancy rate) were assessed in the present study. Although ¹H-NMR spectroscopy is not clinically available yet, all samples collected are already part of the initial workup of the infertile man, which facilitates the inclusion of this tool in the clinical practice. Furthermore, the use of the metabolomics model can be of great help in counseling infertile men with varicocele, representing an advance toward precision medicine in the field of male infertility.

5 | CONCLUSION

We demonstrated that ¹H NMR spectroscopy of seminal plasma can be used in conjunction with multivariate statistical tools to create metabolomics models useful to discriminate infertile men with clinical varicocele who improved SA parameters or achieved natural pregnancy after MV from those who did not. In addition, the most important

metabolites for group segregation are involved in energy metabolism and oxidative stress response, reinforcing the pivotal role of these mechanisms in the pathophysiology of varicocele.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

Filipe T. L. Neto, Ronmilson A. Marques, Salvador V. C. Lima, and Ricardo O. Silva designed and coordinated the study. Filipe T. L. Neto performed the surgical procedures. João E. F. da Font performed scrotal Doppler ultrasound. Filipe T. L. Neto and Alexandre F. C. Filho collected samples and clinical data. Ronmilson A. Marques and Ricardo O. Silva extracted and analyzed $^1\text{H-NMR}$ spectra. Filipe T. L. Neto, Ronmilson A. Marques, and Ricardo O. Silva performed the statistical analyses. All authors contributed to data interpretation and wrote sections of the manuscript. All authors read and approved the submitted version.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The authors confirm that the data supporting the findings of this study are available within the article [and/or] its supplementary materials

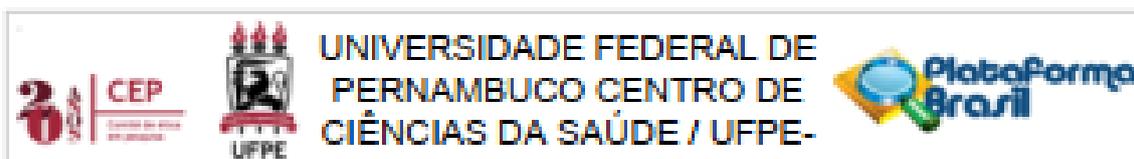
ORCID

Filipe Tenorio Lira Neto  <https://orcid.org/0000-0002-6783-307X>

REFERENCES

- Gorelick JL, Goldstein M. Loss of fertility in men with varicocele. *Fertil Steril*. 1993;59(3):613-616.
- Kantartzis PD, Goulis CD, Goulis GD, Papadimas I. Male infertility and varicocele: myths and reality. *Hippokratia*. 2007;11(3):99-104. <https://doi.org/10.1007/s11255-017-1564-4>
- Schlegel PN, Sigman M, Collura B, et al. Diagnosis and treatment of infertility in men: AUA/ASRM guideline PART II. *J Urol*. 2021;205(1):44-51. <https://doi.org/10.1097/ju.0000000000001520>
- Fukuda T, Miyake H, Enatsu N, Matsushita K, Fujisawa M. Assessment of time-dependent changes in semen parameters in infertile men after microsurgical varicocelelectomy. *Urology*. 2015;86(1):48-51. <https://doi.org/10.1016/j.urol.2015.04.014>
- Marmar JL, Agarwal A, Prabakaran S, et al. Reassessing the value of varicocelelectomy as a treatment for male subfertility with a new meta-analysis. *Fertil Steril*. 2007;88(3):639-648. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2006.12.008>
- Baazeem A, Belzile E, Ciampi A, et al. Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. *Eur Urol*. 2011;60(4):796-808. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2011.06.018>
- Esteves SC, Roque M, Agarwal A. Outcome of assisted reproductive technology in men with treated and untreated varicocele: systematic review and meta-analysis. *Asian J Androl*. 2016;18(2):254-258. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.163269>
- Wang J, Xia SJ, Liu ZH, et al. Inguinal and subinguinal micro-varicocelelectomy, the optimal surgical management of varicocele: a meta-analysis. *Asian J Androl*. 2015;17(1):74-80. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.136443>
- Ding H, Tian J, Du W, Zhang L, Wang H, Wang Z. Open non-microsurgical, laparoscopic or open microsurgical varicocelelectomy for male infertility: a meta-analysis of randomized controlled trials. *BJU Int*. 2012;110(10):1536-1542. <https://doi.org/10.1111/j.1464-410X.2012.11093.x>
- Tiseo BC, Esteves SC, Cocuzza MS. Summary evidence on the effects of varicocele treatment to improve natural fertility in subfertile men. *Asian J Androl*. 2016;18(2):239-245. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.172639>
- Dubin L, Amelar RD. Varicocele size and results of varicocelelectomy in selected subfertile men with varicocele. *Fertil Steril*. 1970;21(8):606-609. [https://doi.org/10.1016/s0015-0282\(16\)37684-1](https://doi.org/10.1016/s0015-0282(16)37684-1)
- Shabana W, Teleb M, Dawod T, et al. Predictors of improvement in semen parameters after varicocelelectomy for male subfertility: a prospective study. *Can Urol Assoc J*. 2015;9(9-10):E579-E582. <https://doi.org/10.5489/cuaj.2808>
- Majzoub A, ElBardisi H, Covarrubias S, et al. Effect of microsurgical varicocelelectomy on fertility outcome and treatment plans of patients with severe oligozoospermia: an original report and meta-analysis. *Andrologia*. 2021;53(6):14059. <https://doi.org/10.1111/and.14059>
- Ates E, Ucar M, Keskin MZ, Gokce A. Preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio as a new prognostic predictor after microsurgical subinguinal varicocelelectomy. *Andrologia*. 2019;51(2):13188. <https://doi.org/10.1111/and.13188>
- Zhang JW, Xu QQ, Kuang YL, Wang Y, Xu F, Tian YD. Predictors for spontaneous pregnancy after microsurgical subinguinal varicocelelectomy: a prospective cohort study. *Int Urol Nephrol*. 2017;49(6):955-960. <https://doi.org/10.1007/s11255-017-1564-4>
- Abou Ghayda R, El-Douehi RZ, Lee JY, et al. Anthropometric variables as predictors of semen parameters and fertility outcomes after varicocelelectomy. *J Clin Med*. 2020;9(4):1160. <https://doi.org/10.3390/jcm9041160>
- Samplaski MK, Yu C, Kattan MW, et al. Nomograms for predicting changes in semen parameters in infertile men after varicocele repair. *Fertil Steril*. 2014;102(1):68-74. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.03.046>
- Jang WS, Kim KH, Lim KT, et al. External validation of the post-varicocele repair semen analysis nomogram to predict total motile sperm count: a multicenter study. *Andrologia*. 2020;52(11):13809. <https://doi.org/10.1111/and.13809>
- Kovac JR, Pastuszak AW, Lamb DJ. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. *Fertil Steril*. 2013;99(4):998-1007. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.111>
- Karczewski KJ, Snyder MP. Integrative omics for health and disease. *Nat Rev Genet*. 2018;19(5):299-310. <https://doi.org/10.1038/nrg.2018.4>
- Mayr M. Metabolomics: ready for the prime time? *Circ Cardiovasc Genet*. 2008;1(1):58-65. <https://doi.org/10.1161/CIRCGENETICS.108.808329>
- Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. Metabonomics: understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. 1999;29(11):1181-1189. <https://doi.org/10.1080/004982599238047>
- Dunn WB, Ellis DI. Metabolomics: current analytical platforms and methodologies. *TrAC, Trends Anal Chem*. 2005;24(4):285-294. <https://doi.org/10.1016/j.trac.2004.11.021>
- Pontes TA, Barbosa AD, Silva RD, Melo-Junior MR, Silva RO. Osteopenia-osteoporosis discrimination in postmenopausal women by $^1\text{H-NMR}$ -based metabolomics. *PLoS One*. 2019;14(5):e0217348. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0217348>
- Lindon JC, Holmes E, Nicholson JK. So what's the deal with metabolomics? *Anal Chem*. 2002;75(17):384A-391A.
- Neto FTL, Marques RA, de Freitas Cavalcanti Filho A, et al. $^1\text{H-NMR}$ -based metabolomics for infertility diagnosis in men with varicocele. *J Assist Reprod Genet*. 2020;37(9):2233-2247. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01896-2>
- Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2020;113(3):533-535. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.11.025>
- Dubin L, Amelar RD. Varicocelelectomy: 986 cases in a twelve-year study. *Urology*. 1977;10(5):446-449. [https://doi.org/10.1016/0090-4295\(77\)90132-7](https://doi.org/10.1016/0090-4295(77)90132-7)

ANEXO A – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DO CCS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: *Investigação da Varicocele Através de Análise Metabonômica Baseada na Espectroscopia de RMN de Hidrogênio de Soro de Sêmen, Soro de Sangue, e de Urina*

Pesquisador: Felipe Tenório Lira Neto

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 64211917.1.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER:

Número do Parecer: 1.978.735

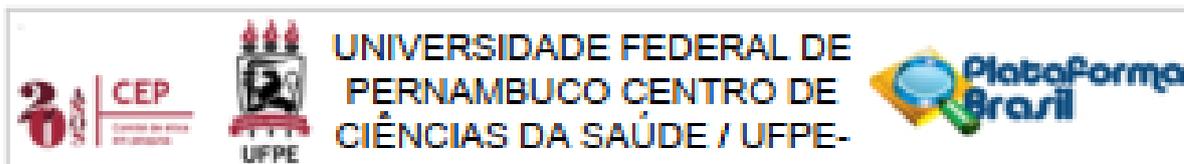
Apresentação do Projeto:

Trata-se de um Projeto de Pesquisa do Mestrado em Cirurgia do Programa de Pós-graduação em Cirurgia apresentado pelo aluno Felipe Tenório Lira Neto, sob a orientação do Prof.Dr. Salvador Vilar Cordeira Lima, cujo objetivo principal é proceder a Investigação da Varicocele Através de Análise Metabonômica Baseada na Espectroscopia de RMN de Hidrogênio de Soro de Sêmen, Soro de Sangue e de Urina.

A varicocele é citada como causa de 35% a 80% dos casos de Infertilidade masculina, no entanto, a relação de causa-efeito entre varicocele e Infertilidade masculina ainda não está esclarecida não obstante os estudos revelando melhora da fertilidade quando homens inférteis são submetidos à varicocelectomia.

Desde o ano 2000, estudos metabonômicos têm sido utilizados para criar modelos que sejam capazes de auxiliar o diagnóstico e prognóstico das mais diferentes doenças. A construção de um modelo metabonômico por um meio não invasivo como a RMN de H-1 (avalia as alterações dos metabólitos

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1ª andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-900
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepcca@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.878.735

decorrentes de doença) do soro do sêmen, do sangue e de urina, poderá constituir um auxílio para definir em quais pacientes a presença de varicocele impacta na fertilidade, ajudando no diagnóstico e no aconselhamento quanto à necessidade de tratamento.

Trata-se de uma Investigação clínica diagnóstica, prospectiva, com delineamento longitudinal, que visa estudar o perfil metabonômico de pacientes inférteis com varicocele e compará-lo com o perfil metabonômico de pacientes férteis com varicocele e de pacientes férteis sem varicocele.

Serão incluídos no estudo 105 voluntários, maiores de 50 anos, atendidos no Ambulatório de Urologia do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira e Serviço de Urologia do HC-UFPE os quais serão distribuídos em 3 grupos com 35 pacientes: Grupo I – Pacientes que tenham diagnóstico de infertilidade com varicocele palpável, independente do grau da varicocele, Grupo II - Pacientes com filhos que procuram o serviço para a realização de vasectomia que tenham varicocele e Grupo III – Pacientes que procuram o serviço para realização de vasectomia sem varicocele.

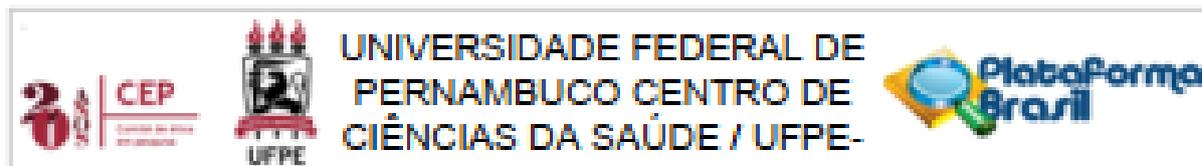
O grupo I fornecerá amostras biológicas antes e 3 meses após o tratamento, a fim de serem realizadas análises pareadas e comparativas com grupos II e III.

O Projeto será realizado em conjunto com o Serviço de Urologia do HCUFPE e com o Serviço de Urologia do IMP-PE. Todos serão encaminhados ao laboratório para coleta de exames hormonais, espermograma, além de soro de sangue, soro de sêmen, e urina.

A coleta das amostras, sangue, sêmen e urina, será realizada no laboratório de análises clínicas do IMPPE, de modo habitual, ressaltando que a coleta de tais biofluidos faz parte da investigação de rotina dos pacientes com varicocele e infertilidade, e dos que são submetidos à vasectomia.

A análise das amostras será processada no laboratório da Central Analítica do Departamento de Química

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepcca@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.376.735

Fundamental (DQF) da UFPE. O Grupo de Metabonômica e Ensino de Química (GEMEQ-UFPE) ficará responsável pela obtenção dos espectros de RMN de H-1 e a construção dos modelos metabonômicos. De acordo com os resultados obtidos os pesquisadores estimam a utilização de um método diagnóstico inovador, que busque determinar se a varicocele está envolvida na fisiopatologia da infertilidade masculina, bem como se o tratamento cirúrgico é benéfico aos pacientes. Por ser considerado um método minimamente invasivo, poderá, inclusive, ser considerado como um teste rápido de ser executado, seguro, simples, indoloso, confiável e de baixo custo.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário

1) Construir modelos metabonômicos, a partir de dados espectrais de RMN de H-1 obtidos de soro de sangue, soro de sêmen, e urina, para o diagnóstico de pacientes inférteis com varicocele.

Objetivos Secundários

1) Diferenciar pacientes férteis com varicocele (grupo 1), de pacientes inférteis com varicocele (grupo 2), e de pacientes férteis sem varicocele (grupo 3), a partir do modelo proposto.

2) Analisar se o modelo metabonômico de pacientes inférteis com varicocele se aproxima do modelo metabonômico dos pacientes férteis com ou sem varicocele após a realização de varicocelectomia.

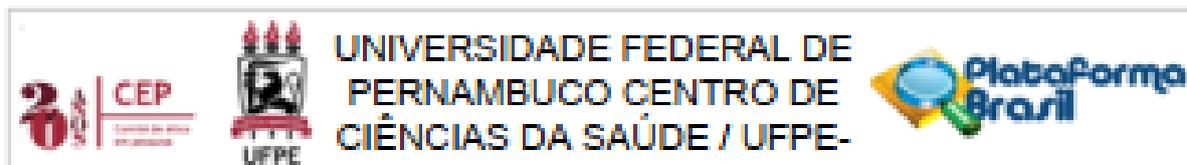
3) Investigar quais metabólitos endógenos presentes no soro do sêmen, soro de sangue, e urina estão associados à discriminação entre as amostras.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos

Queixa de dor ou desconforto durante a coleta de sangue e ao constrangimento ou mal estar social dos

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.746-900
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8288 E-mail: cepcca@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.076.728

sujeitos para coleta do sêmen e entrega do material.

Benefícios

Os benefícios esperados estão relacionados com o possível desenvolvimento de um método diagnóstico não invasivo, seguro e que poderá servir tanto para o diagnóstico, quanto para o acompanhamento dos pacientes com varicocele e infertilidade.

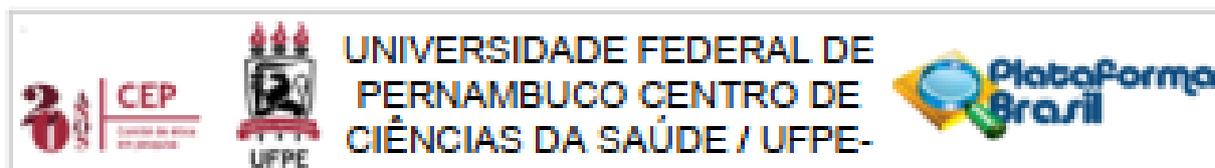
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de um estudo cujos resultados poderão acrescentar informações quanto a infertilidade relacionada a pacientes portadores de varicocele. Busca determinar se a varicocele está envolvida na fisiopatologia da infertilidade, bem como se o tratamento cirúrgico é benéfico aos pacientes. A construção dos modelos metabonômicos obtidos dos espectros de RNM de ^1H de pacientes com varicocele pode se tornar, no futuro, um exame útil no diagnóstico, no prognóstico, bem como modificação de protocolos de tratamento e acompanhamento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- 1-Folha de Rosto preenchida de forma adequada;
- 2-TCLE redigido de forma clara e em linguagem acessível aos voluntários;
- 3-Orçamento estimado em R\$ 4.735,00 referente a despesas com transporte e alimentação dos voluntários e material de escritório. Todos os custos sob a responsabilidade do pesquisador.
- 4-Cronograma: Coleta de dados programada para o período de maio de 2017 a janeiro de 2018;
- 5-Cartas de anuência do Departamento de Química Fundamental e do Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira anexada.
- 6-Ficha de avaliação e coleta de dados do paciente anexada;
- 7-Curriculum vitae do pesquisador, orientador e colaboradores anexados;
- 8-Termo de compromisso assinado pelo pesquisador anexado.
- 9-Carta de anuência do Serviço de Urologia do HC não anexada.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepcca@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.676.726

Recomendações:

Sem recomendações

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O pesquisador anexou a carta de anuência do Serviço de Urologia do HC UFPE atendendo de forma adequada à pendência documental gerada.

Considerações Finais e Ortótipo do CEP:

As exigências foram atendidas e o protocolo está **APROVADO**, sendo liberado para o início da coleta de dados. Informamos que a **APROVAÇÃO DEFINITIVA** do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

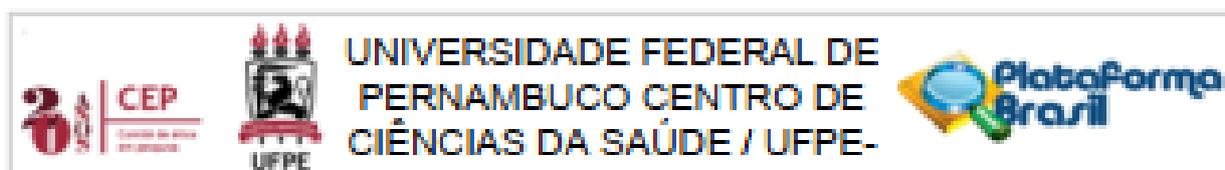
Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do(a) pesquisador(a) assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|--------------------------------|--|------------------------|-------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_798297.pdf | 10/03/2017 13:12:08 | | Acesso |

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-000
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.676.725

| | | | | |
|---|--|------------------------|--------------------------|--------|
| Outros | CARTADERESPPOSTAASPENDENCIAS.pdf | 10/03/2017 13:11:44 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | CartaAnuenciUrologiaHC.pdf | 09/03/2017 21:24:12 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Folha de Rosto | folhaDeRosto.pdf | 31/01/2017 10:41:55 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | termodecompromisso.jpg | 31/01/2017 10:39:24 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.docx | 31/01/2017 10:38:29 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | ANEXO2FichaColetaDados.docx | 30/01/2017 17:56:33 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | VaricoceleMetabonomicaABNT2.docx | 28/01/2017 16:24:10 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | comprovantemestrado.pdf | 28/01/2017 16:23:27 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | anuenciadoqf.pdf | 28/01/2017 16:22:57 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | anuenciainmp.pdf | 28/01/2017 16:21:51 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | termodecompromissoassinado.pdf | 28/01/2017 16:21:13 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | CurriculoLattesFlaviaCristinaMoronePinto.pdf | 22/01/2017 16:39:03 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | CurriculoLattesRicardoOliveiradaSilva.pdf | 22/01/2017 16:38:07 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | CurriculoLattesLeslieCliffordNoronhaAraujo.pdf | 22/01/2017 16:37:06 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | CurriculoLattesRonilsonAlvesMarques.pdf | 22/01/2017 16:36:11 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | CurriculoLattesSalvadorMlarCorneliaLima.pdf | 22/01/2017 16:34:38 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | CurriculoLattesSeraficoPereiraGabralJunior.pdf | 22/01/2017 16:33:51 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | CurriculoLattesFilipeTenorioLiraNeto.pdf | 22/01/2017 16:32:47 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |

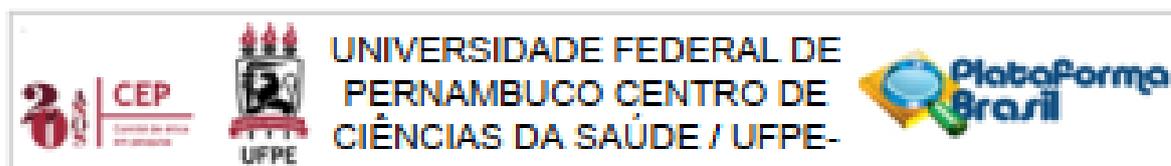
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Aprovação da CONEP:

Não

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.740-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepcca@ufpe.br



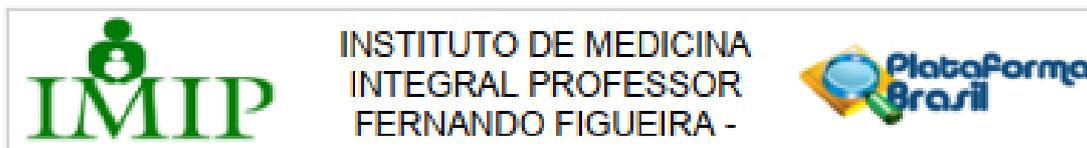
Continuação do Parecer: 1.678.735

RECIFE, 23 de Março de 2017

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.748-900
UF: PE Município: RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 E-mail: cepcca@ufpe.br

ANEXO B – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DO IMIP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação da Varicocele Através de Análise Metabômica Baseada na Espectroscopia de RMN de Hidrogênio de Soro de Sêmen, Soro de Sangue, e de Urina

Pesquisador: Filipe Tenório Lira Neto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 64211917.1.3001.5201

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.075.028

Apresentação do Projeto:

o pesquisador apresenta de forma objetiva o tema de infertilidade e varicocele, pontuando as possíveis hipóteses

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Construir modelos metabômicos, a partir de dados espectrais de RMN de H-1 obtidos de soro de sangue, soro de sêmen, e urina, para o diagnóstico de pacientes inférteis com varicocele

Objetivo Secundário:

- Diferenciar pacientes férteis com varicocele (grupo 1), de pacientes inférteis com varicocele (grupo 2), e de pacientes férteis sem varicocele (grupo 3), a partir do modelo proposto.
- Analisar se o modelo metabômico de pacientes inférteis com varicocele se aproxima do modelo metabômico dos pacientes férteis com ou sem varicocele após a realização de varicocelectomia.
- Investigar quais metabólitos endógenos presentes no soro do sêmen, soro de sangue, e urina estão associados à discriminação entre as

Endereço: Rua dos Coelhos, 300

Bairro: Boa Vista

CEP: 55.070-550

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2122-4758

Fax: (81)2122-4782

E-mail: comitedeetica@imip.org.br



INSTITUTO DE MEDICINA
INTEGRAL PROFESSOR
FERNANDO FIGUEIRA -



Continuação do Parecer: 2.075.028

amostras.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Inerentes à pesquisa e pesquisa. O pesquisador pontua tais aspectos adequadamente

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa bem escrita, onde o Investigador faz adequadamente o delineamento do tema e as lacunas do conhecimento.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

adequados

Recomendações:

não há

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

apresentar relatórios parciais semestrais e relatório final ao CEP-IMIP

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|---|------------------------|--------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB INFORMações BÁSICAS_DO_P ROJETO_799297.pdf | 10/03/2017 13:12:08 | | Acelto |
| Outros | CARTADERESPSTAASPENDENCIAS .pdf | 10/03/2017 13:11:44 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Informações Básicas do Projeto | PB INFORMações BÁSICAS_DO_P ROJETO_799297.pdf | 09/03/2017 21:24:31 | | Acelto |
| Outros | CartaAnuenciUrologiaHC.pdf | 09/03/2017 21:24:12 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Informações Básicas do Projeto | PB INFORMações BÁSICAS_DO_P ROJETO_799297.pdf | 31/01/2017 10:42:16 | | Acelto |
| Folha de Rosto | folhaDeRosto.pdf | 31/01/2017 10:41:55 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | termodecompromisso.jpg | 31/01/2017 10:39:24 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.docx | 31/01/2017 10:38:29 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Informações Básicas do Projeto | PB INFORMações BÁSICAS_DO_P ROJETO_799297.pdf | 30/01/2017 17:56:50 | | Acelto |
| Outros | ANEXO2FichaColetaDados.docx | 30/01/2017 | Filipe Tenório Lira | Acelto |

Endereço: Rua dos Coelhos, 306

Bairro: Boa Vista

CEP: 55.070-550

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2122-4756

Fax: (81)2122-4762

E-mail: comitedestica@imip.org.br



INSTITUTO DE MEDICINA
INTEGRAL PROFESSOR
FERNANDO FIGUEIRA -



Continuação do Parecer: 2.075.028

| | | | | |
|---|--|------------------------|--------------------------|--------|
| Outros | ANEXO2FichaColetaDados.docx | 17:56:33 | Neto | Acelto |
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_799297.pdf | 28/01/2017 16:24:58 | | Acelto |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | VaricoceleMetabonomicaABNT2.docx | 28/01/2017 16:24:10 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | comprovantemestrado.pdf | 28/01/2017 16:23:27 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | anuenciadqf.pdf | 28/01/2017 16:22:57 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | anuenciamp.pdf | 28/01/2017 16:21:51 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | temodecompromissoassinado.pdf | 28/01/2017 16:21:13 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | CurriculoLattesFlavlaCristinaMoronePinto.pdf | 22/01/2017 16:39:03 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | CurriculoLattesRicardoOliveiradaSilva.pdf | 22/01/2017 16:38:07 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | CurriculoLattesLeslieCliffordNoronhaAraujo.pdf | 22/01/2017 16:37:06 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | CurriculoLattesRonmilsonAlvesMarques.pdf | 22/01/2017 16:36:11 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | CurriculoLattesSalvadorVilarComelaLima.pdf | 22/01/2017 16:34:38 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | CurriculoLattesSeraficoPerelraCabralJunior.pdf | 22/01/2017 16:33:51 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |
| Outros | CurriculoLattesFilipeTenorioLiraNeto.pdf | 22/01/2017 16:32:47 | Filipe Tenório Lira Neto | Acelto |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 22 de Maio de 2017

Assinado por:

Gláucia Virgínia de Queiroz Lins Guerra
(Coordenador)

Endereço: Rua dos Coelhos, 300

Bairro: Boa Vista

CEP: 50.070-550

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2122-4756

Fax: (81)2122-4782

E-mail: comitedetica@imip.org.br

ANEXO C - ATIVIDADES COMPLEMENTARES

ORIGINAL ARTICLE: ANDROLOGY

Effect of varicocelectomy on sperm deoxyribonucleic acid fragmentation rates in infertile men with clinical varicocele: a systematic review and meta-analysis

Filipe Tenório Lira Neto, M.D.,^{a,b} Matheus Roque, M.D., Ph.D.,^c and Sandro C. Esteves, M.D., Ph.D.^{d,e,f}

^a Andros Redfe, Andrology Clinic, Recife, Brazil; ^b Department of Urology, Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira, Recife, Brazil; ^c Department of Reproductive Medicine, Mater Prime, 04029-200 São Paulo, Brazil; ^d ANDROFERT, Andrology and Human Reproduction Clinic, Referral Center for Male Reproduction, 13075-460 Campinas, Brazil; ^e Division of Urology, Department of Surgery, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; and ^f Department of Clinical Medicine, Faculty of Health, Aarhus University, Aarhus, Denmark

Objective: To evaluate the effect of varicocelectomy on sperm deoxyribonucleic acid fragmentation (SDF) rates in infertile men with clinical varicocele.

Design: Systematic review and meta-analysis.

Setting: Not applicable.

Patient(s): Infertile men with clinical varicocele subjected to varicocelectomy.

Intervention(s): Systematic search using PubMed/Medline, EMBASE, Cochrane's central database, Scielo, and Google Scholar to identify relevant studies published from inception until January 2021. We included studies comparing SDF rates before and after varicocelectomy in infertile men with clinical varicocele.

Main Outcome Measure(s): The primary outcome was the difference between the SDF rates before and after varicocelectomy. A meta-analysis of weighted data using random-effects models was performed. Results were reported as weighted mean differences (WMD) with 95% confidence intervals (CIs). Subgroup analyses were performed on the basis of the SDF assay, varicocelectomy technique, preoperative SDF levels, varicocele grade, follow-up time, and study design.

Result(s): Nineteen studies involving 1,070 patients provided SDF data. Varicocelectomy was associated with reduced postoperative SDF rates (WMD -7.23% ; 95% CI: -8.86 to -5.59 ; $I^2 = 91\%$). The treatment effect size was moderate (Cohen's $d = 0.68$; 95% CI: 0.77 to 0.60). The pooled results were consistent for studies using sperm chromatin structure assay, terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP-biotin nick end labeling, sperm chromatin dispersion test, and microsurgical varicocele repair. Subgroup analyses showed that the treatment effect was more pronounced in men with elevated vs. normal preoperative SDF levels, but the impact of varicocele grade remained equivocal. Meta-regression analysis demonstrated that SDF decreased after varicocelectomy as a function of preoperative SDF levels (coefficient: 0.23 ; 95% CI: 0.07 to 0.39).

Conclusion(s): We concluded that pooled results from studies including infertile men with clinical varicocele indicated that varicocelectomy reduced the SDF rates. The treatment effect was greater in men with elevated (vs. normal) preoperative SDF levels. Further research is required to determine the full clinical implications of SDF reduction for these men. (Fertil Steril® 2021; ■:■-■. ©2021 by American Society for Reproductive Medicine.)

Key Words: Male infertility, oxidative stress, semen, sperm DNA fragmentation, varicocele

Discuss: You can discuss this article with its authors and other readers at <https://www.fertstertdialog.com/posts/32128>

Received December 28, 2020; revised April 4, 2021; accepted April 6, 2021.

F.T.L.N. has nothing to disclose. M.R. has nothing to disclose. S.C.E. has nothing to disclose.

Reprint requests: Sandro C. Esteves, M.D., Ph.D., ANDROFERT, Andrology and Human Reproduction Clinic, Referral Center for Male Reproduction, Avenida Doutor Heitor Penteado, 1464, 13075-460 Campinas, Brazil (E-mail: s.esteves@androfert.com.br).

Fertility and Sterility® Vol. ■, No. ■, ■ 2021 0015-0282/536.00

Copyright ©2021 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.
<https://doi.org/10.1016/j.fertstert.2021.04.003>

REVIEW ARTICLE

Correspondence:

Rilipe Tenorio Lira Neto, Departamento de Cirurgia, Universidade Federal de Pernambuco, Rua Guilherme Salazar, n 150, apt 601 E, Recife, PE CEP 52061-275, Brazil.
E-mail: rtenorio.uro@gmail.com

Keywords:

erectile function, male fertility, mythology, religion

Received: 1-Sep-2018

Revised: 12-Jan-2019

Accepted: 24-Jan-2019

doi: 10.1111/andr.12599

Gods associated with male fertility and virility

^{1,2}F. T. L. Neto, ³P. V. Bach, ¹R. J. L. Lyra, ¹J. C. Borges Junior, ²G. T. d. S. Maia, ⁴L. C. N. Araujo and ²S. V. C. Lima

¹Andros Recife, Recife, Brazil, ²Departamento de Cirurgia, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil, ³Division of Urology, University of Alberta, Edmonton, AB, Canada, ⁴Faculdade de Medicina de Olinda, Olinda, Brazil

ABSTRACT

Background: Human fertility has always been a topic of curiosity and devotion. Many cultures consider fertility to be a necessity for the survival and perpetuation of mankind and since early times, myths were created to explain this fabulous process. Fertility gods were ubiquitous in numerous ancient human cultures and were used both to understand fertility and to cope with infertility by means of rituals and offerings.

Objectives: This manuscript aims to catalog and describe the deities associated with male fertility and virility.

Material and methods: We conducted a comprehensive search for the terms "male fertility god" and "male virility god" on the internet using web-based search engines. Based on the information retrieved, we selected those deities directed related to male fertility and/or virility and further deepened the search using Pubmed and Medline databases for peer-reviewed articles as well as books and articles about ancient mythology.

Results: We identified several gods linked to male fertility and virility in various cultures from Egypt, Greece, Rome, India, South-western United States, France, Colombia and Buthan.

Discussion: Most of these deities were depicted with an erect phallus and with other fertility symbols like snakes. Some deities were also associated with plants and/or animal fertility and their festivals were often held during the harvest period.

Conclusion: Gods of male fertility and virility played important roles in many ancient cultures. Offerings and rituals to these gods were the only available options to deal with problems of reproduction and demonstrate the lengths to which ancient people would go seeking cures for infertility.

INTRODUCTION

Human fertility has always been a topic of curiosity and devotion. Since many cultures have long regarded fertility as a necessity for the survival and perpetuation of mankind, myths were often formed to explain this fabulous process. Fertility gods were ubiquitous in nearly all ancient human cultures and were used both to help understand fertility and to cope with infertility through the use of rituals and offerings.

Some of the earliest deities related to human fertility were also associated with agriculture, bringing together two fundamental processes for human survival (Behjati-Ardakani *et al.*, 2016). Despite the fact that male and female components of fertility have been known since ancient times, the majority of fertility gods and goddesses are linked to female fertility. This predominance of deities associated with female fertility was likely related to the better understanding of female fertility and pregnancy as observed in the Egyptian Kahun papyrus (Haimov-Kochman *et al.*, 2005) and in texts from ancient Greece (Haimov-Kochman

et al., 2005). The focus on female fertility resulted in an increased number of 'treatments' available for infertile women when compared to those available for men.

Although less prevalent than their female counterparts, male fertility, and virility gods were present in most mythologies and were some of the earliest deities worshiped owing to their importance to some paternalistic societies. In these cultures, festivals, offerings, and rituals were offered to guarantee or attest to the fertility of their leaders and followers.

The objective of this study is to review the literature surrounding gods associated with male fertility and virility in ancient cultures as well as some of the rituals and offerings used in their worship.

METHODS

We conducted a comprehensive search for the terms 'male fertility god' and 'male virility god' on the internet using the web-based search engines Google, Bing and ask.com. Based on the information retrieved, we selected deities directly related to male

Minerva Obstetrics and Gynecology 2022 Oct 12

DOI: [10.23736/S2724-606X.22.05169-7](https://doi.org/10.23736/S2724-606X.22.05169-7)

Copyright © 2022 EDIZIONI MINERVA MEDICA

language: English

Effect of varicocele and varicocelectomy on sperm deoxyribonucleic acid fragmentation rates in infertile men with clinical varicocele

Filipe T. LIRA NETO ^{1,2}, Matheus ROQUE ³, Sandro C. ESTEVES ^{4,5,6} 

¹ AndrosRecife, Andrology Clinic, Recife, Brazil; ² Department of Urology, Prof. Fernando Figueira Institute of Integrative Medicine, Recife, Brazil; ³ Department of Reproductive Medicine, Mater Prime, São Paulo, Brazil; ⁴ ANDROFERT, Andrology and Human Reproduction Clinic, Referral Center for Male Reproduction, Campinas, Brazil; ⁵ Division of Urology, Department of Surgery, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, Brazil; ⁶ Department of Clinical Medicine, Faculty of Health, Aarhus University, Aarhus, Denmark

PDF

Varicocele is the leading cause of male infertility. It can affect sperm quantity and quality through various non-mutually exclusive pathophysiological mechanisms, mainly oxidative stress. Excessive production of reactive oxygen species may overwhelm the sperm's defenses against oxidative stress and harm the sperm's DNA. Excessive sperm DNA breaks, so-called sperm DNA fragmentation, result from the oxidative stress cascade and are commonly found in the ejaculates of men with varicocele and fertility-related issues. Measuring sperm DNA fragmentation can provide valuable information on the extent of harm and might help select candidates for surgical treatment. Varicocelectomy is beneficial for alleviating oxidative stress-associated infertility and improving sperm DNA integrity. However, reproductive outcomes of infertile men with elevated sperm DNA fragmentation rates and surgically treated varicoceles remain poorly studied, and there is a need for well-designed trials to determine the impact of sperm DNA fragmentation reduction on natural and medically assisted reproduction.