



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

FILIPE TENÓRIO LIRA NETO

**INVESTIGAÇÃO DA VARICOCELE ATRAVÉS DE ANÁLISE METABONÔMICA
BASEADA NA ESPECTROSCOPIA DE RMN DE HIDROGÊNIO DE SORO DE
SÊMEN - ESTUDO PILOTO**

Recife

2019

FILIPE TENÓRIO LIRA NETO

**INVESTIGAÇÃO DA VARICOCELE ATRAVÉS DE ANÁLISE METABONÔMICA
BASEADA NA ESPECTROSCOPIA DE RMN DE HIDROGÊNIO DE SORO DE
SÊMEN - ESTUDO PILOTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Área de Concentração: Cirurgia Clínica e Experimental

Orientador: Prof. Dr. Salvador Vilar Correia Lima

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva

Recife

2019

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4 1010

L768i Lira Neto, Filipe Tenório.
Investigação da varicocele através de análise metabonômica baseada na espectroscopia de RMN de hidrogênio de soro de sêmen - estudo piloto / Filipe Tenório Lira Neto. – 2019.
70 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientador: Salvador Vilar Correia Lima.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Cirurgia. Recife, 2019.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Infertilidade masculina. 2. Sêmen. 3. Metabolômica. 4. Espectroscopia de ressonância nuclear magnética. 5. Análise discriminante. I. Lima, Salvador Vilar Correia (Orientador). II. Título.

617.91

CDD (20.ed.)

UFPE (CCS 2020-153)

FILIPPE TENÓRIO LIRA NETO

**INVESTIGAÇÃO DA VARICOCELE ATRAVÉS DE ANÁLISE METABONÔMICA
BASEADA NA ESPECTROSCOPIA DE RMN DE HIDROGÊNIO DE SORO DE
SÊMEN - ESTUDO PILOTO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Cirurgia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Cirurgia.

Aprovada em: 21/02/2019.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Salvador Vilar Correia Lima (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Geraldo de Aguiar Cavalcanti (Examinador Interno)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a. Dr^a. Beate Saegesser Santos (Examinador Externo)
Universidade Federal de Pernambuco

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 meu filho **Filipe**, que me traz alegria e amor desde o seu nascimento; Aos demais **familiares** e **amigos**,
Dedico.

AGRADECIMENTOS

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

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

Ao Professor Dr. Leslie Clifford Noronha Araújo, pela idealização do projeto e incentivo para seu desenvolvimento;

Ao Mestre 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.

“Para subir você precisa aprender a desistir”.

(LI, PHILIP S.)

RESUMO

Definida como dilatação anormal das veias do plexo pampiniforme devido à ineficiência de suas válvulas, a varicocele é causa de 35% a 80% dos casos de infertilidade masculina. Este trabalho teve como objetivo criar modelos metabonômicos capazes de ajudar no diagnóstico da varicocele e na discriminação entre homens com varicocele férteis e inférteis, através da análise metabonômica baseada na espectroscopia de ressonância magnética nuclear de hidrogênio (RMN de ^1H) de soro de sêmen. Foi realizada uma investigação clínica diagnóstica, prospectiva, com delineamento transversal utilizando homens acompanhados pelo Serviço de Urologia do IMIP. Foram criados 3 grupos: um composto de homens férteis sem varicocele (grupo C), outro composto de homens férteis com varicocele (grupo VF), e um terceiro composto de homens inférteis com varicocele (grupo VI). Foram feitas realização de exames hormonais e espermograma, além de coleta de soro de sêmen para análise no laboratório da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE. Utilizando-se ferramentas de estatística multivariada para análise dos dados gerados a partir dos espectros de RMN de ^1H de soro de sêmen, foram criados modelos metabonômicos capazes de discriminar os grupos. Foram recrutados 43 participantes, sendo 12 no grupo C, 15 no grupo VF e 16 no grupo VI. Os dados demográficos mostraram que os homens do grupo VI tinham concentração espermática, contagem total de espermatozoides, motilidade espermática e contagem total de espermatozoides móveis progressivos menores quando comparados aos grupos C e VF, bem como diâmetros venosos bilateralmente maiores no exame de ultrassonografia com Doppler quando comparado com o grupo VF. Foram criados 2 modelos utilizando análise discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais e análise discriminante linear para discriminar homens sem varicocele daqueles com varicocele com acurácia de 89% e 93% respectivamente. Também foi gerado um modelo de análise discriminante linear que diferenciou homens férteis com varicocele daqueles inférteis com varicocele com uma acurácia de 96%. O presente estudo demonstrou que RMN de ^1H de soro de sêmen pode ser utilizada em conjunto com ferramentas de estatística multivariada para a criação de modelos metabonômicos úteis na discriminação entre homens com e sem varicocele, e entre homens com varicocele férteis e inférteis. Futuros estudos são necessários para validar externamente os modelos criados e aprofundar a investigação dos metabólitos importantes para a segregação dos grupos.

Palavras-chave: Infertilidade Masculina. Sêmen. Metabolômica. Espectroscopia de Ressonância Nuclear Magnética. Análise Discriminante.

ABSTRACT

Defined as an abnormal dilation of the pampiniform plexus veins due to valve insufficiency, varicocele is responsible for 35% to 80% of male infertility cases. This study aims to create metabonomics models useful in the diagnosis of varicocele and in the discrimination between fertile men with varicocele and those infertile with varicocele through the use of metabonomics analysis based on nuclear magnetic resonance spectroscopy of seminal plasma. A prospective diagnostic investigation with a cross-sectional design was performed using men attending Urology Department of IMIP. We divided the participants into three groups: one group of fertile men without varicocele (group C), another composed of fertile men with varicocele (VF group), and a third group of infertile men with varicocele (group VI). All participants were sent to the Laboratory of Clinical Analysis for sexual hormones levels measurement, standard semen analysis, and collection of seminal plasma for analysis in the laboratory of the Analytical Center of the Fundamental Chemistry Department of Universidade Federal de Pernambuco. Using multivariate statistical tools to analyze the data generated from nuclear magnetic resonance spectra of seminal plasma, metabonomic models capable of discriminating the groups were created. For this pilot study, 43 participants were enrolled, 12 in group C, 15 in VF group and 16 in group VI. Demographic data showed that men in group VI had lower sperm concentration, total sperm count, lower sperm motility, total progressive motile sperm counts when compared to groups C and VF, as well as bilaterally larger venous diameter on color Doppler ultrasonography when compared to the VF group. Using orthogonal partial least squares discriminant analysis and linear discriminant analysis, two models were created to discriminate between men with and without varicocele with accuracy of 89% and 93%, respectively. Moreover, a linear discriminant analysis model that differentiated fertile men with varicocele from infertile men with varicocele with an accuracy of 96% was also generated. This study demonstrated that nuclear magnetic resonance of seminal plasma coupled with multivariate statistical tools can be used to create metabonomic models useful in discriminating between men with and without varicocele, and between fertile men with varicocele and infertile men with varicocele. Future studies are needed to validate externally the models created and to deepen the investigation of the metabolites important for the segregation of the groups.

Keywords: Male infertility. Semen. Metabolomics. Magnetic Resonance Spectroscopy. Discriminant Analysis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Distribuição das causas de infertilidade	15
Figura 2 – Anatomia da varicocele.....	16
Figura 3 – Fisiopatologia da varicocele.....	17
Figura 4 – Modelo de fluxo da informação em organismos vivos	20
Figura 5 – Representação esquemática da espectroscopia por RMN de ^1H	21
Figura 6 – Exemplo de espectro de RMN de ^1H de soro de sêmen humano.....	21
Figura 7 – Exemplo de espectro de RMN de ^1H de soro de sêmen.....	41
Figura 8 – Análise exploratória utilizando PCA	42
Figura 9 – OPLS-DA controle x varicocele. A- <i>score plot</i> . B- Figuras de mérito.....	42
Figura 10 – Variáveis que melhor discriminaram os grupos C e V no modelo OPLS-DA identificadas pelos respectivos deslocamentos químicos	43
Figura 11 – Detalhe dos deslocamentos químicos associados às variáveis que melhor discriminaram os grupos C e V no modelo OPLS-DA. A – 2,91 ppm. B – 6,66 ppm. C 7,46 ppm. D 8,26 ppm. E 8,34 ppm	43
Figura 12 – Resultado da LDA para a comparação entre os grupos C e V.....	44
Figura 13 – Resultado da LDA para a comparação entre os grupos VF e VI.....	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Características demográficas e clínicas grupos VF, VI e C.....	37
Tabela 2 – Características demográficas e clínicas grupos C e V.....	39
Tabela 3 – Características demográficas e clínicas grupos VF e VI.....	40
Tabela 4 – Resultados do Modelo da LDA (depois da validação cruzada) usando os dados espectrais de RMN de 1H para discriminação entre os grupos C e V.....	45
Tabela 5 – Resultados da PLS-DA e OPLS-DA (após a validação cruzada) usando os dados espectrais de RMN de 1H para a discriminação entre os grupos VF e VI.....	45
Tabela 6 – Resultados da LDA (após a validação cruzada) usando os dados espectrais de RMN de 1H para a discriminação entre os grupos VF e VI.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA	Análise de Variância
DA	Análise Discriminante
DQF	Departamento de Química Fundamental
EF	Exame Físico
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
GRUPO C	Grupo Controle
GRUPO V	Grupo Varicocele
GRUPO VF	Grupo Varicocele Fértil
GRUPO VI	Grupo Varicocele Infértil
IMIP	Instituto de Medicina Integral Prof. Fernando Figueira
IMC	Índice de Massa Corpórea
LDA	Análise Discriminante Linear
LH	Hormônio Luteinizante
LOOCV	<i>Leave-one-out-cross Validation</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
OPLS-DA	Análise Discriminante por mínimos quadrados parciais ortogonais
PLS-DA	Análise Discriminante por mínimos quadrados parciais
RMN de ¹ H	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio 1
UFPE	Universidade Federal de Pernambuco
USGD	Ultrassonografia de Bolsa Escrotal com Doppler
VPP	Valor Preditivo Positivo
VPN	Valor Preditivo Negativo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	INFERTILIDADE MASCULINA.....	14
1.2	VARICOCELE	15
1.3	METABONÔMICA.....	18
1.4	ANÁLISE MULTIVARIADA	21
1.5	JUSTIFICATIVA DO ESTUDO	24
2	OBJETIVOS	25
2.1	OBJETIVO GERAL	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	25
3	REVISÃO DA LITERATURA	26
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	LOCAL DO ESTUDO	31
4.2	TIPO DE ESTUDO.....	31
4.3	SELEÇÃO.....	31
4.3.1	Critérios de inclusão	31
4.3.2	Critérios de exclusão	32
4.4	PROCEDIMENTOS	32
4.4.1	Procedimentos técnicos	32
4.4.2	Procedimentos analíticos	34
4.4.3	Procedimentos éticos	36
4.4.3.1	Aprovação pelo comitê de ética do CCS	36
4.4.3.2	Proteção dos indivíduos envolvidos no estudo.....	36
5	RESULTADOS	37
5.1	DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS	37
5.1.1	Varicocele Fértil x Varicocele Infértil x Controle	37
5.1.2	Controle x Varicocele	37

5.1.3	Varicocele Fértil x Varicocele Infértil.....	39
5.2	DADOS ESPECTRAIS E ANÁLISES MULTIVARIADAS	41
5.2.1	Controle x Varicocele	41
5.2.2	Varicocele Fértil x Varicocele Infértil.....	45
6	DISCUSSÃO.....	47
7	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	50
	REFERÊNCIAS	51
	APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	58
	ANEXO A - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DO CCS	61
	ANEXO B - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DO IMIP	68

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFERTILIDADE MASCULINA

A espermatogênese é o processo biológico responsável pela formação do gameta masculino. Ocorrendo nos túbulos seminíferos dos testículos, e sobre a influência de diversos fatores hormonais, a espermatogênese culmina na liberação de espermatozoides maduros (1). 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 (2).

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, e, dentre estes, um fator causal masculino é encontrado em até 50% dos casos (5, 6). No Brasil, um estudo da Organização Mundial de Saúde (OMS) revelou que 18.3% das mulheres em idade fértil nunca tiveram filhos apesar de relações sexuais frequentes, estatística similar a de outros países em desenvolvimento (7). 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 (8).

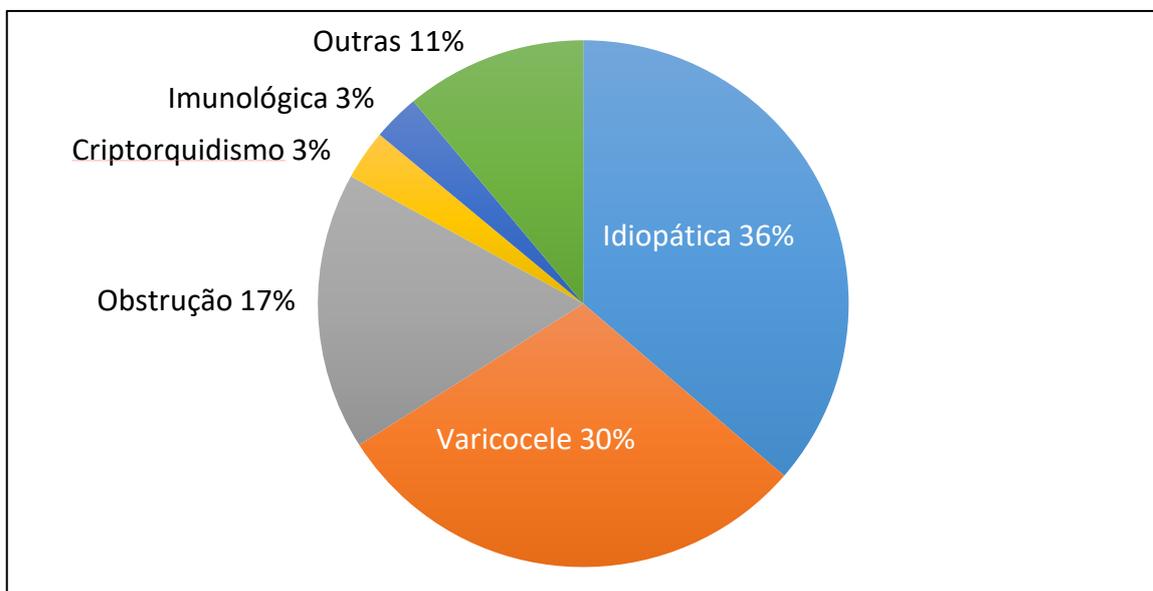
É importante destacar que os valores de referência dos parâmetros do espermograma foram estabelecidos pela OMS, sendo baseados exclusivamente nos percentis 5 de uma amostra de 1953 homens férteis provenientes de apenas 8 países, dentre os quais o Brasil não está incluído (9). A metodologia escolhida 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 (10). 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.

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 (8, 11-13).

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” (14). 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) (14).

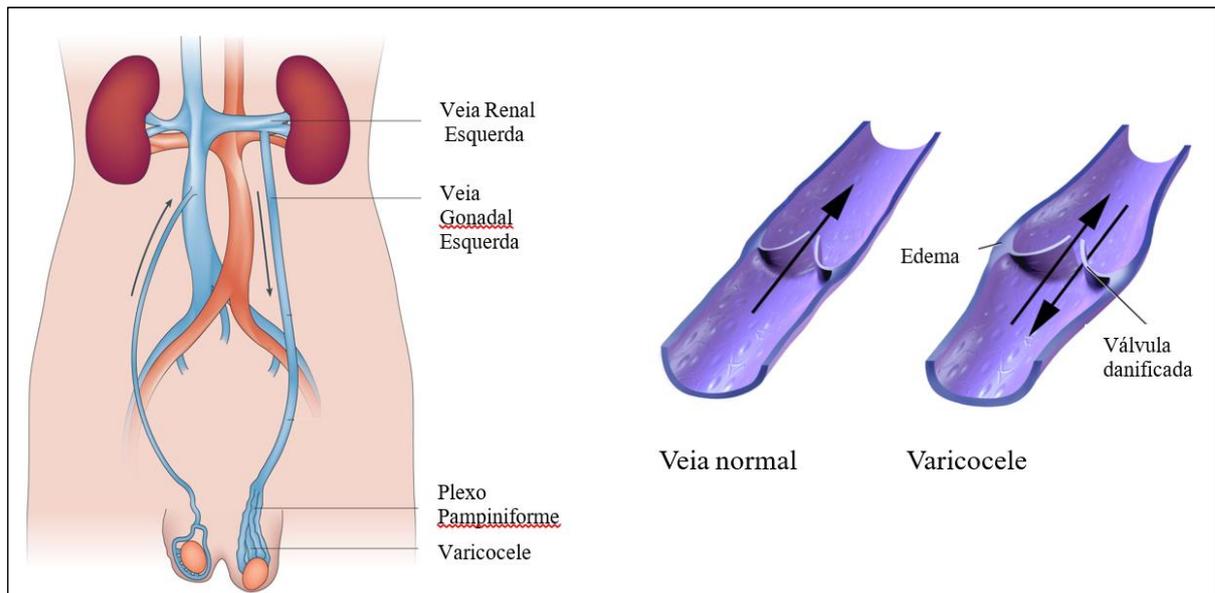
1.2 VARICOCELE

Dentre as causas masculinas de infertilidade, a varicocele destaca-se pela sua frequência. Definida como dilatação anormal das veias gonadais que compõem o plexo pampiniforme, a varicocele é encontrada em até 15% da população masculina adulta, porém apenas 40% dos homens portadores desta patologia irão desenvolver complicações, dentre as quais, a infertilidade é a mais comum (15, 16). A varicocele é citada como causa de 35% dos casos de infertilidade masculina primária, de 80% dos casos de infertilidade secundária, sendo a patologia de tratamento cirúrgico mais comum nesses casos (17). Porém estima-se que 80% dos homens com varicocele sejam férteis (18).

A dilatação das veias do plexo pampiniforme ocorre devido à insuficiência ou ausência das suas válvulas, levando a refluxo venoso (**Figura 2**). Cerca de 90% dos homens com

varicocele apresentam dilatação do plexo pampiniforme apenas do lado esquerdo (19). Este predomínio da varicocele no lado esquerdo é explicado 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 esquerda 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. Porém, em alguns homens, a veia gonadal direita pode terminar na veia renal direita, também em ângulo reto, o que explicaria os casos de varicoceles bilaterais (20).

Figura 2 – Anatomia da varicocele

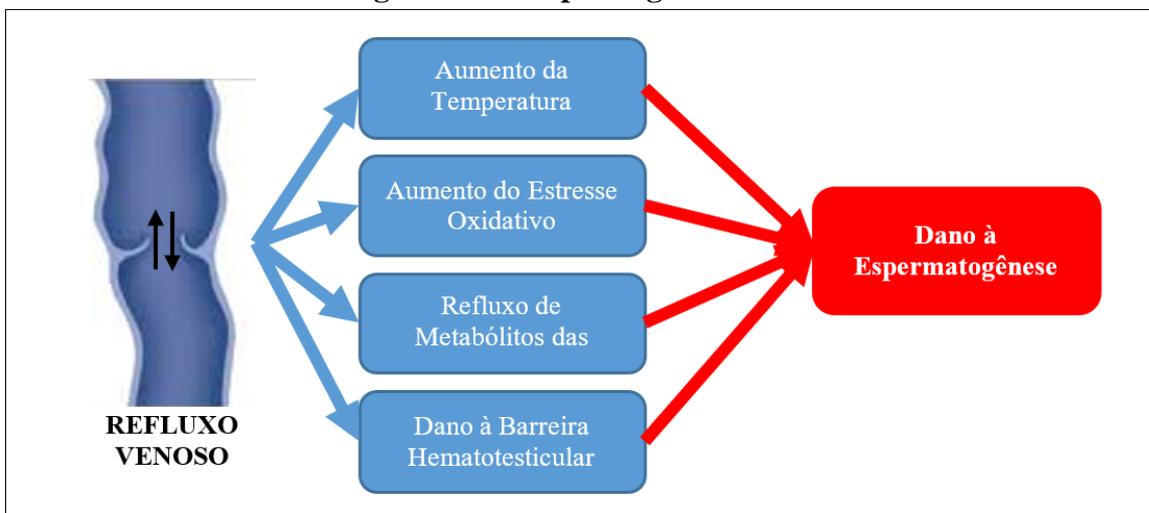


Fonte: Adaptado de Jensen (2017). (23)

Vários mecanismos fisiopatológicos foram propostos para explicar o dano à fertilidade causado pela varicocele (**Figura 3**). Dentre eles, os principais são o aumento da temperatura testicular e o aumento do estresse oxidativo no testículo. A presença de refluxo venoso no plexo pampiniforme aumenta a temperatura testicular pois reduz a eficácia do mecanismo de contracorrente responsável pela manutenção do testículo a uma temperatura de 2° Celsius abaixo da temperatura corporal central. Este controle térmico é imprescindível para a espermatogênese, já que diversas enzimas envolvidas neste processo trabalham com temperatura ótima entre 34 – 35° Celsius (2). Além disso, homens com varicocele apresentam um elevado nível de estresse oxidativo no testículo, decorrente da liberação de espécies reativas

de oxigênio por leucócitos que migram para as paredes das veias com refluxo venoso (21, 22). O excesso de espécies reativas de oxigênio desencadeia apoptose da células germinativas além de induzir dano ao DNA espermático, diminuindo tanto a quantidade quanto a qualidade dos espermatozoides (23). Outros mecanismos propostos incluem o refluxo de metabólitos das glândulas suprarrenais, dano à barreira hematotesticular, e formação de anticorpos antiespermatozoides, no entanto, as vias moleculares desses mecanismos ainda estão por ser esclarecidas (24).

Figura 3 – Fisiopatologia da varicocele



Fonte: O autor

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 (25-28). Mesmo assim, o tratamento cirúrgico das varicoceles de homens inférteis tem sido associado a melhora dos parâmetros do espermograma, da taxa de gravidez e dos níveis de testosterona (29-31).

Um outro ponto de debate envolve o diagnóstico de varicocele, havendo dúvidas sobre qual exame deve ser utilizado na prática clínica para se determinar a presença de varicocele. O exame padrão-ouro para o diagnóstico de varicocele é a venografia, que embora possua uma sensibilidade de aproximadamente 100% é pouco utilizada na prática clínica devido ao seu alto grau de invasividade (32, 33). Os dois métodos de diagnóstico mais utilizados na avaliação da varicocele são o exame físico (EF) e a ultrassonografia de bolsa escrotal com Doppler colorido

(USGD). O EF é realizado com o paciente em pé e deitado, e 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. A varicocele, caso presente, é classificada de acordo com a classificação de Dubin para o EF: grau 1 – palpável apenas com manobra de Valsalva, grau 2 – palpável em repouso, e grau 3 – visível(34). A USGD também deve 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(35). Ambos os métodos possuem uma alta variação intra- e interobservador (32, 36, 37), e embora a acurácia da USGD seja superior à do exame físico quando utiliza-se a venografia com referência (32, 38), vários estudos demonstraram que o tratamento de varicoceles subclínicas, aquelas que são diagnosticadas apenas pela USGD e não pelo EF, não melhora os parâmetros seminais nem aumenta a taxa de gravidez de homens inférteis (39). Deste modo as Associação Americana de Urologia e a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva não recomendam o uso de exames de imagem complementares na ausência de varicoceles palpáveis, colocando o EF como principal método diagnóstico (40).

Tendo em vista a presença de tantos pontos ainda não definidos, fica evidente a necessidade de estudos que venham a desenvolver ferramentas alternativas, rápidas, e minimamente invasivas que ajudem no diagnóstico e prognóstico desta condição. Para este fim, estudos envolvendo genética, epigenética, e proteômica vêm sendo cada vez mais utilizados (41, 42). Em resumo, através do uso de ferramentas específicas para cada estratégia, pesquisadores tentam identificar alterações no genoma, epigenoma e proteoma de pacientes portadores de varicocele, e associá-las aos seus respectivos fenótipos.

Do mesmo modo, vários trabalhos utilizando abordagens de metabonômica têm sido feitos recentemente com o objetivo de identificar biomarcadores para infertilidade masculina (43, 44), porém quando utilizadas as palavras-chave “metabolomics” e “varicocele” na ferramenta de busca digital PubMed, atualmente, não há nenhum trabalho listado.

1.3 METABONÔMICA

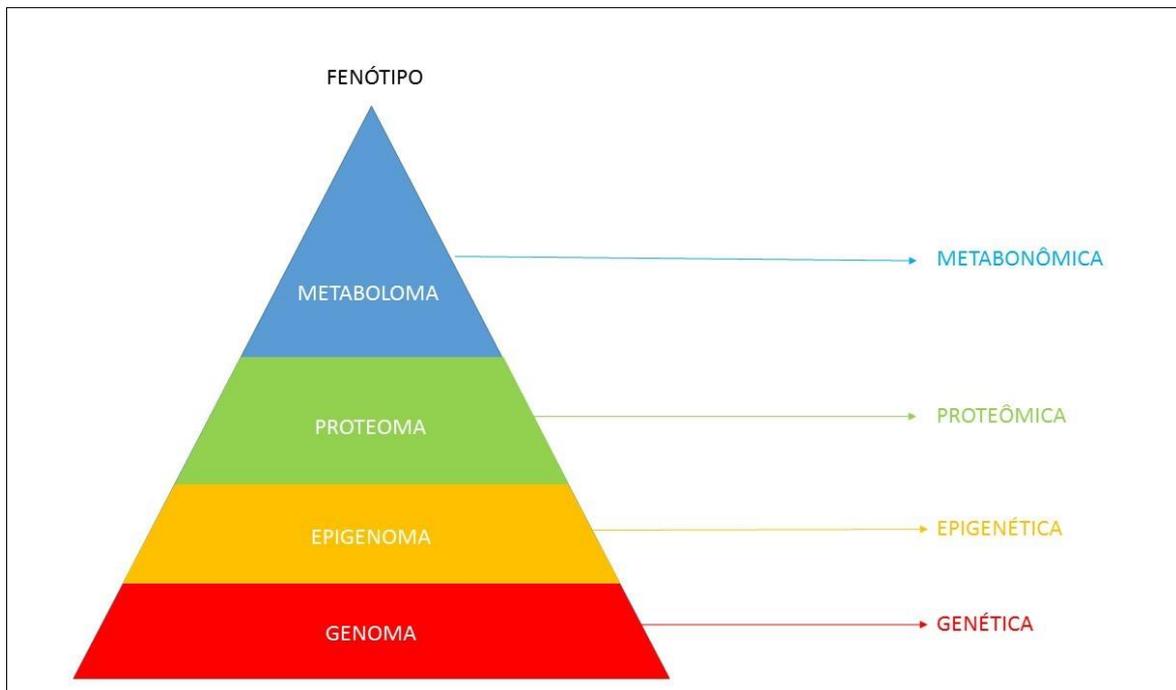
O termo metabólitos refere-se às moléculas de baixo peso molecular, tais como aminoácidos, ácidos graxos, carboidratos, vitaminas, e alguns compostos inorgânicos, cujas concentrações são estimadas numa ordem de magnitude de 7-9 (mM-pM) (45). Por sua vez, o conjunto de metabólitos de uma amostra biológica, o metaboloma, é o produto final da transcrição gênica, e sofre a influência de vários processos fisiológicos e patológicos, tendo

uma relação direta com os fenótipos (46). 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 (44). Atualmente, cerca de 74.000 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 (47).

Existem diversas estratégias para o estudo do metaboloma. A metabolômica é a identificação e quantificação de todos os metabólitos de um determinado sistema biológico, enquanto o perfil metabólico compreende a identificação e quantificação de determinados metabólitos previamente selecionados com o objetivo de estudar uma certa via metabólica. Já a “impressão digital” metabólica (do inglês *fingerprinting*) consiste numa análise global de alto rendimento empregada para classificação de diferentes amostras, neste caso a identificação e quantificação de todos os metabólitos não é necessária. Por outro lado, a análise de metabólito alvo foca no estudo qualitativo e quantitativo de um ou alguns metabólitos relacionados a uma reação metabólica específica (45).

Uma outra ferramenta de análise do metaboloma é a metabonômica, que é definida como o campo da ciência que aplica formalismos de estatística multivariada a dados espectrais obtidos de biofluidos e busca relacioná-los com o status bioquímico do indivíduo, não sendo estritamente necessária a individualização dos metabólitos (45). Uma das estratégias de estudos metabonômicos é o uso de ferramentas de estatística multivariada aplicadas a dados espectrais obtidos de biofluidos. Desde o final dos anos 1990, têm surgido diversos trabalhos que buscam criar modelos capazes de auxiliar o diagnóstico das mais diferentes doenças usando a estratégia metabonômica (48-50). 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 (**Figura 4**) (50). 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 (51, 52). Alternativamente, outros biofluidos, como o fluido cerebrospinal ou sêmen, e fragmentos de tecidos também podem ser utilizados (49).

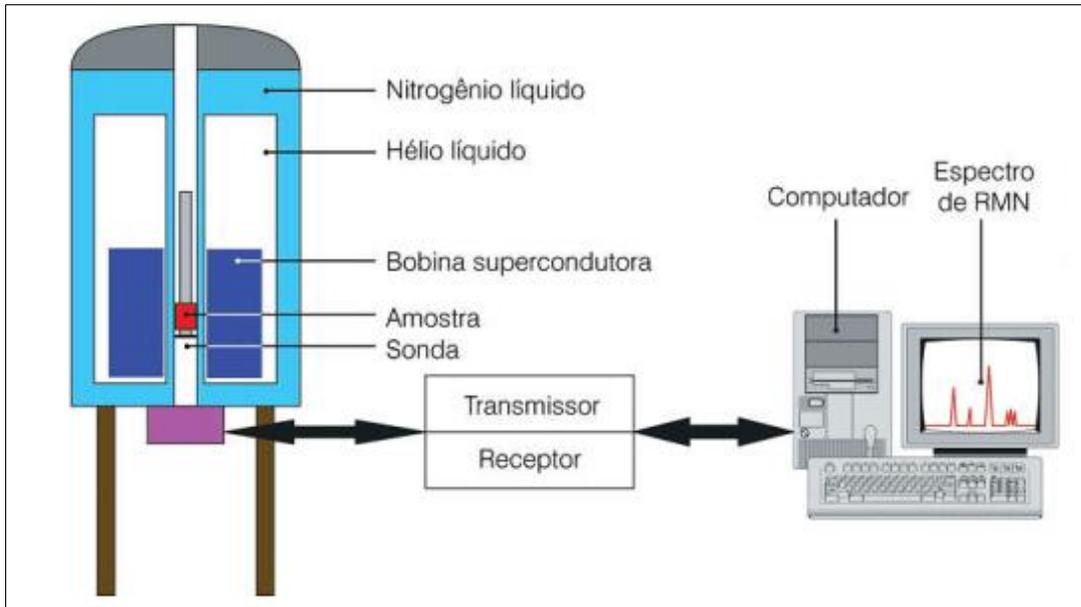
Figura 4 – Modelo de fluxo da informação em organismos vivos



Fonte: O autor

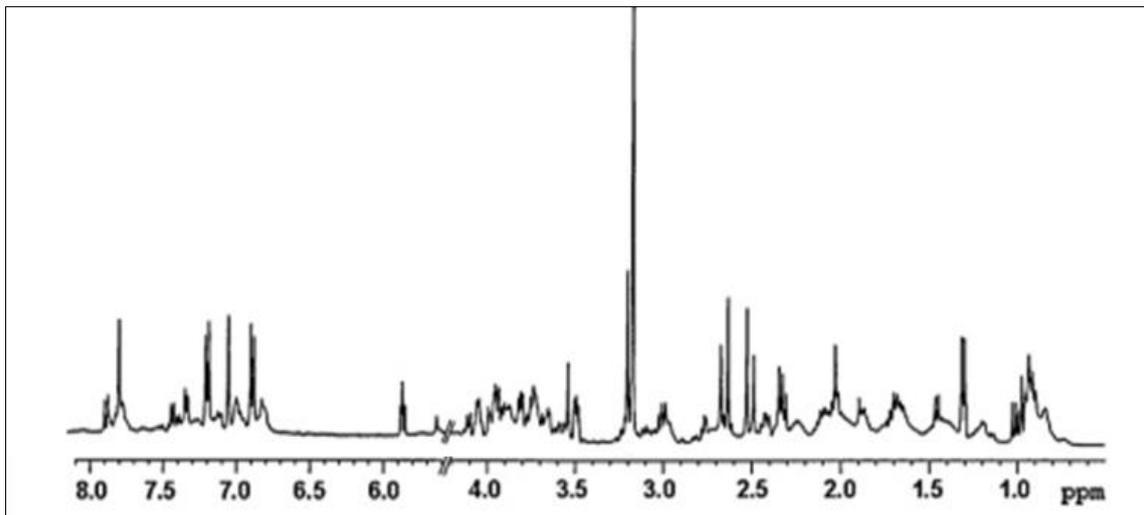
Diversas técnicas têm sido utilizadas para o estudo do metaboloma. A RMN de ^1H é a técnica mais utilizada atualmente, pois necessita de pequenas quantidades de biofluidos, requer apenas uma simples diluição da amostra antes da análise, e mantém a integridade da amostra, permitindo análises repetidas. Esta técnica possui também uma alta resolução, sendo capaz de avaliar diferentes tipos de metabólitos bem como de realizar análises quantitativas e qualitativas (46, 50). 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 contêm 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 (46). A **Figura 5** representa esquematicamente os equipamentos utilizados para obtenção dos espectros de RMN de ^1H , e a **Figura 6** é um exemplo de espectro de soro de sêmen humano.

Figura 5 – Representação esquemática da espectroscopia por RMN de ^1H



Fonte: Adaptado de Araujo (2016) (51).

Figura 6 – Exemplo de espectro de RMN de ^1H de soro de sêmen humano



Fonte: Adaptado de Gupta (2010) (53).

1.4 ANÁLISE 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. A quimiometria consiste no emprego de métodos matemáticos e estatísticos para estudos químicos. Métodos quimiométricos são capazes de aumentar o poder e a velocidade de análise dos perfis espectroscópicos, facilitando a detecção de padrões (54).

A análise de componentes principais (PCA) 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 (54, 55). 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 (56).

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 (57). Para o seu uso, os grupos devem ser conhecidos previamente, portanto, as ferramentas de DA são consideradas métodos supervisionados(56). A grande vantagem da DA é permitir a identificação das variáveis que mais se sobressaem na discriminação das classes (55). 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 é o mais comumente utilizado, pois tem o poder de determinar se há diferença entre as médias de um conjunto de variáveis dependentes, definindo assim quais as variáveis dependentes mais importantes na segregação dos grupos (58). Portanto, os formalismos DA são os mais adequados para a criação de modelos capazes de discriminar os diferentes grupos de participantes.

Atualmente, vários métodos de análise discriminante podem ser empregados para o processamento de problemas que envolvem a identificação de grupos, tais como LDA (do inglês *Linear Discriminants Analysis*), PLS-DA (do inglês *Partial Least Square Discriminants Analysis*) e OPLS-DA (do inglês *Orthogonal Partial Least Square Discriminants Analysis*).

A LDA permite a determinação de uma superfície ou liminar 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 (57). 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).

A PLS-DA é outra metodologia supervisionada comumente utilizada na otimização visando a separação entre duas classes de amostras. O modelo é construído a partir de duas

matrizes: uma matriz X contendo os dados quimiométricos; e uma matriz de classe Y , que contém a classificação das amostras (55). O método visa encontrar uma linha reta que divida o espaço em duas regiões, separando as amostras em 2 grupos (86). Dentre as vantagens fornecidas pela metodologia PLS-DA para dados espectrais, destaca-se a possibilidade de avaliação de dados altamente correlacionados, reduzindo os efeitos dos ruídos, e extração de elementos estatísticos que avaliam: a contribuição de cada variável para a construção dos modelos; dos pesos e dos valores VIP (do inglês, *variance importante on projection*). Finalmente, a PLS-DA permite uma fácil e simples identificação gráfica dos dados, em uma dimensão reduzida, destacando a separação entre classes distintas (86).

A OPLS-DA é uma variante da PLS-DA que usa a informação contida na matriz Y categórica para decompor a matriz de dados X em três partes distintas. A OPLS-DA é frequentemente usado no lugar da PLS-DA para separar variações discriminantes das não-discriminantes relacionadas aos grupos. Deste modo, a OPLS-DA constrói modelos mais facilmente interpretáveis em comparação com o PLS-DA. É importante ressaltar que a PLS e a OPLS forçam a separação entre grupos experimentais, requerendo rigorosa validação para garantir sua confiabilidade (87).

Tendo em vista 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 teste de permutação, onde as classes das amostras são trocadas randomicamente e novos modelos são criados. Os resultados obtidos do conjunto não permutado de amostras devem estar fora dos limites de confiança de 99% da distribuição das classificações permutadas para serem considerados significativos (59). Outro método de validação dos modelos é o LOOCV (do inglês *leave-one-out cross validation*). Neste método, vários grupos são criados a partir do grupo total de amostras, deixando-se apenas 1 amostra de fora por cada vez, e 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 são comparadas visando verificar a confiabilidade do modelo original (60).

1.5 JUSTIFICATIVA DO ESTUDO

Embora a varicocele seja uma condição classicamente relacionada à infertilidade masculina, esta relação entre causa e efeito ainda não foi comprovada conforme explicitado anteriormente. Embora estudos em homens inférteis com varicocele mostrem que a varicocelectomia aumenta as taxas de gravidez, melhora os parâmetros do espermograma, e aumenta os níveis séricos de testosterona, há um subgrupo de pacientes que não se beneficia do tratamento (2). Além disso, há também um grupo de homens com varicocele clínica que não são inférteis (61). No presente momento, nenhum exame complementar é capaz de prever o potencial fértil de um homem com varicocele, bem como sua resposta ao tratamento cirúrgico.

O modelo metabonômico desponta como uma ferramenta com grande potencial de aplicabilidade na avaliação dos pacientes com infertilidade masculina, principalmente nos casos de “infertilidade idiopática”, ou seja, nos casos onde não há um diagnóstico etiológico estabelecido (62). Neste cenário, o soro de sêmen seria o biofluido mais indicado por ser produzido pelos órgãos que fazem parte diretamente da fisiopatologia da infertilidade masculina.

O estudo do perfil metabonômico de pacientes com varicocele pode se tornar no futuro um exame útil no diagnóstico, no prognóstico, e na modificação de protocolos de tratamento e acompanhamento destes pacientes. O método metabonômico possui caráter não-invasivo, de simples coleta, além utiliza biofluidos que já são colhidos durante a avaliação rotineira do paciente com varicocele, o que facilita sua implementação clínica. Outra vantagem é a ausência de variação intra e interobservador, em contraste com o EF e a USGD, que são métodos operador dependentes (35).

No momento, este método possui caráter experimental, e, embora o custo do equipamento e de sua instalação ainda sejam altos, o custo por análise é baixo, podendo ser uma alternativa no futuro em caso de grande volume de exames.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

A partir de dados espectrais de RMN de ^1H obtidos de soro de sêmen, construir modelos metabonômicos, para o diagnóstico de homens inférteis com varicocele.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) A partir de dados espectrais de RMN de ^1H obtidos de soro de sêmen, construir modelos metabonômicos para o diagnóstico de homens com varicocele.
- b) A partir de dados espectrais de RMN de ^1H obtidos de soro de sêmen, construir modelos metabonômicos capazes de diferenciar homens férteis com varicocele de homens inférteis com varicocele.
- c) Identificar os metabólitos ou classes de metabólitos com a maior importância para a discriminação dos grupos.

3 REVISÃO DA LITERATURA

Ainda não há na literatura pesquisas utilizando a metabonômica como ferramenta de estudo da varicocele. Porém, trabalhos com genômica, epigenômica e proteômica aplicados à varicocele nos dão alguns dados de interesse para o entendimento dos mecanismos fisiopatológicos desta condição.

Trabalhos explorando como a varicocele influencia a expressão gênica em homens têm demonstrado que o gene da proteína de choque térmico A2 é subexpresso em pacientes oligospermicos com varicocele (63). Esta proteína possui uma função protetora contra o dano causado pelo excesso de calor, e, caso seus níveis estejam diminuídos, as células germinativas podem sofrer danos devido à elevação da temperatura causada pela varicocele, levando a um aumento da apoptose, e consequente oligospermia (64). 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 (65, 66).

A expressão do gene do receptor de andrógenos também é diminuída em pacientes inférteis com varicocele. Este mecanismo tem um efeito negativo direto na espermatogênese, pois a ação da testosterona é condição *sine qua non* para a produção de espermatozoides (67). Outro gene que tem sua expressão alterada pela varicocelectomia é o gene da roporina. Esta proteína faz parte da capa fibrosa do flagelo espermático e está associada à motilidade dos espermatozoides. Sua expressão encontra-se diminuída em homens portadores de varicocele, porém, após o tratamento cirúrgico, os níveis do RNA mensageiro da roporina aumentam paralelamente à melhora da motilidade dos espermatozoides (68).

Outro aspecto interessante é a maneira como diferentes polimorfismos genéticos interferem na fisiopatologia da varicocele e na resposta dos pacientes à varicocelectomia. Polimorfismos dos genes da família de proteínas Glutathione S Transferases, proteínas que atuam depurando produtos resultantes do estresse oxidativo, estão relacionados à melhora dos parâmetros seminais após a varicocelectomia. Homens homozigóticos para os alelos normais destes genes possuem uma chance maior de melhora do espermograma com a correção cirúrgica quando comparados com homens portadores de outros genótipos (69). 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 (70).

Aumento da fragmentação do DNA espermático devido à presença de “quebras” na cadeia de dupla-hélice tem sido observado em homens inférteis portadores de varicocele (23). Este dano está associado ao alto nível de estresse oxidativo encontrado nestes homens (42). O excesso de peroxinitrito, substância altamente oxidativa advém da liberação exagerada de óxido nítrico e do radical superóxido pelas células endoteliais e leucócitos presentes nas paredes das veias dilatadas (21, 22, 71). Este mecanismo também explica a melhora da fragmentação do DNA espermático após o tratamento cirúrgico da varicocele (72).

O genoma mitocondrial, mais especificamente o número de cópias do DNA mitocondrial dos espermatozoides também tem impacto na fertilidade masculina. Homens inférteis portadores de varicocele apresentam um número maior de cópias do DNA mitocondrial do que controles férteis, e a cirurgia de varicocelectomia causa uma diminuição deste número (73). A hipótese admitida é a de que um número maior de mitocôndrias por espermatozoide seria sugestivo de uma espermatogênese defeituosa, ou de um mecanismo de compensação para uma baixa atividade da cadeia respiratória (73). 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 (74, 75). É importante ressaltar que danos ao genoma mitocondrial podem ser resultados do ambiente estresse oxidativo gerado pela varicocele, já que o DNA mitocondrial é extremamente susceptível à ação dos radicais livres, e possui uma capacidade limitada de reparo quando comparado ao DNA celular. Deste modo é criado um ciclo vicioso no qual estresse oxidativo leva a mais estresse oxidativo, impactando negativamente a espermatogênese (75).

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 presente no espermatozoide maduro possui uma hipermetilação fisiológica e vários estudos associam a presença de hipometilação do DNA espermático à infertilidade masculina (76). Similarmente, uma diminuição geral da metilação do DNA espermático foi descrita em pacientes com varicocele e associada ao aumento da fragmentação do DNA espermático (77). O gene MTHFR, que codifica a enzima metilenotetrahidrofolato redutase, possui polimorfismos que apresentam associação com a presença de varicocele. A sua variante 1298AA possui uma incidência maior portadores de varicocele e está associada a uma baixa qualidade dos espermatozoides (78). A metilenotetrahidrofolato redutase é essencial na regulação da metilação do DNA, e este pode ser um dos mecanismos que explicariam a

hipometilação do DNA espermático presente em homens portadores de varicocele (79). Esta hipometilação geral do DNA parece não ser revertida pela varicocelectomia, o que explicaria a ausência de melhora em alguns pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico (80). Por outro lado, este mesmo trabalho apontou que a varicocelectomia melhorou parâmetros associados a outros fatores epigenéticos, tais como a fragmentação e o conteúdo de protamina do DNA espermático.

O conteúdo espermático de microRNAs também se modifica com a presença de varicocele, ressaltando-se a diminuição dos níveis do miR-15a, um microRNA que possui papel protetor frente ao estresse oxidativo (81, 82). Porém a implicação clínica deste achado ainda não está clara.

Com relação às modificações estruturais da cromatina espermática, outro fator associado à infertilidade, observou-se que homens inférteis portadores de varicocele apresentam uma maior percentagem de espermatozoides com desorganização da cromatina quando comparados com controles férteis, e que a cirurgia de varicocelectomia pode reverter tal desorganização (83). Novamente, ainda não se sabe quais os mecanismos envolvidos nestas modificações.

Em consonância com as alterações genéticas e epigenéticas causadas pela varicocele, o conjunto de proteínas expressas por estes pacientes também sofre alterações, conforme demonstrado por vários trabalhos utilizando diversas técnicas para a análise do proteoma seminal (84). Um grupo de pesquisa utilizou duas técnicas para análise comparativa do proteoma do soro de sêmen de 3 grupos de adolescentes (controle normospermicos, varicocele normospermicos, e varicocele e oligospermicos), e demonstrou que os grupos apresentavam diferentes composições do proteoma (15, 85). Um outro estudo comparou homens inférteis portadores de varicocele com controles férteis e também detectou mudanças no perfil de proteínas do sêmen, envolvendo principalmente a diminuição de proteínas relacionadas ao metabolismo de ácido nucleicos, aos transporte molecular, e ao metabolismo lipídico (86). Da mesma forma, uma pesquisa utilizando eletroforese de proteínas bidimensional associada à espectroscopia de massa foi capaz de identificar 15 proteínas seminais expressas de forma diferente entre homens oligospermicos portadores de varicocele e homens normospermicos sem varicocele (87). Dentre os achados, destacam-se a baixa concentração de proteínas de choque térmico, que têm papel protetor contra os efeitos de altas temperaturas, e também a relativa escassez de proteínas relacionadas ao metabolismo energético e à mecanismos antioxidantes (87).

O impacto da varicocelectomia no proteoma humano também tem sido investigado. O perfil proteômico seminal de homens inférteis submetidos à varicocelectomia mudou em direção à “homeostase”, ou seja, à condição inicial de normalidade, quando comparado com o perfil proteômico seminal antes da cirurgia, o qual exibia um estado de resposta ao estresse (88). Ademais, proteínas que conferem proteção contra os danos do estresse oxidativo e do excesso de calor retornaram aos seus níveis normais após a varicocelectomia, confirmando o benefício da cirurgia (89).

Análise proteômica através do uso de cromatografia líquida / espectroscopia de massa também foi utilizada na investigação da lateralidade da varicocele. Uma pesquisa utilizando esta metodologia revelou perfis proteômicos seminais diferentes de acordo com a lateralidade da varicocele, unilateral versus bilateral (19). Importante notar que, novamente, várias proteínas ligadas ao metabolismo mitocondrial e ao estresse oxidativo encontravam-se diferentemente expressas entre os grupos, 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. Por outro lado, existem vários trabalhos sobre alterações do metaboloma precipitadas por outras causas de infertilidade masculina.

Um dos primeiros estudos utilizando RMN de ^1H para análise do soro de sêmen analisou 4 grupos de homens com diferentes concentrações de espermatozoides (azoospermicos, oligospermicos, vasectomizados, e normospermicos) (90). Os autores identificaram 3 biomarcadores para infertilidade masculina: lactato, citrato e glicerilfosforilcolina. Um outro grupo também utilizou RMN de ^1H do soro de sêmen para comparar homens diagnosticados com infertilidade idiopática, homens oligospermicos, e controles férteis, e demonstrou 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 (44). Em um estudo com homens inférteis devido a lesões medulares, a RMN de ^1H revelou que estes homens, quando comparados com controles férteis, possuíam níveis extremamente baixos de uridina, um metabólito importante para o metabolismo energético dos espermatozoides (91).

Uma pesquisa utilizando RMN de ^1H para comparar homens férteis normospermicos com homens inférteis portadores de astenozoospermia identificou 19 metabólitos cujas concentrações seminais eram diferentes entre os dois grupos (92). Dentre os principais metabólitos alterados destacaram-se aminoácidos, produtos do metabolismo lipídico, e

produtos intermediários do ciclo de Krebs. O modelo metabonômico criado a partir destes dados obteve uma acurácia de 87,5% na diferenciação em sujeitos normospérmicos e astenozoospermiáticos.

Outros biofluidos e tecidos também podem ser utilizados para a investigação da infertilidade masculina através da metabonômica. A análise de amostras de urina de homens inférteis foi capaz de identificar 37 marcadores urinários que poderiam ser usados no diagnóstico de homens com infertilidade idiopática (93). Outra pesquisa utilizando fragmentos de biópsia testicular foi capaz de elaborar perfis metabonômicos específicos para cada tipo de achado histológico, e, com isso, diferenciar amostras que continham espermatozoides viáveis de amostras com padrão de Síndrome Sertoli-Only, onde não há espermatozoides maduros (94). O principal metabólito utilizado na diferenciação dos grupos foi a fosfatidilcolina, substância relacionada a estados de alta proliferação celular. Neste estudo, pacientes com espermatogênese normal apresentaram níveis elevados de fosfatidilcolina, quando comparados à homens com Síndrome Sertoli-Only.

Estima-se que existam pelo menos 2000 metabólitos no sêmen humano, porém, atualmente, menos de 50 destes metabólitos foram estudados (62). 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.

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 (grupo VI), e pacientes com filhos que procuraram o serviço para a realização de vasectomia que tenham varicocele (grupo VF) ou não (grupo C).

4.2 TIPO DE ESTUDO

Observacional

Analítico

Clínico

Transversal

Prospectivo

4.3 SELEÇÃO

4.3.1 Critérios de inclusão

a) para o grupo VI:

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.

b) para o grupo VF:

Adultos, com até 50 anos de idade, que tiveram filhos nos últimos 12 meses, que apresentem varicocele clínica, independente do grau da varicocele.

c) para o grupo controle C:

Adultos, com até 50 anos de idade, que tiveram filhos nos últimos 12 meses, que não apresentem varicocele clínica.

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

a) para o grupo VI:

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.

b) para o grupo VF:

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

c) para o grupo C:

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

4.4 PROCEDIMENTOS

4.4.1 Procedimentos técnicos

a) Anamnese e Exame Físico:

Após assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (APÊNDICE A), 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 (34). O peso e altura foram medidos utilizando a mesma balança mecânica com estadiômetro.

b) 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.

c) 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 (95), 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.

Perfil hormonal: Todas as análises dos níveis dos hormônios sexuais foram realizadas no laboratório de análises clínicas do IMIP. Para a análise dos níveis séricos de testosterona, estradiol, hormônio folículo-estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH), e proteína carreadora de hormônios sexuais (SHBG) foi utilizado o método de quimioluminescência, e para a dosagem do nível sérico de albumina foi utilizado o método colorimétrico. A testosterona livre foi calculada a partir dos níveis da testosterona total, albumina e SHBG utilizando-se uma fórmula de cálculo disponível em <http://www.issam.ch/freetesuit.htm>.

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 : Após o descongelamento, foram adicionados 400 μL da amostra de soro do sêmen em tubos de RMN de ^1H , com 5 mm de diâmetro interno, em seguida, foram acrescentados 200 μL de água deuterada (D_2O) ao tubo e a mistura foi homogeneizada. O sinal do grupo metileno do citrato (δ 2.65 ppm) foi utilizado como deslocamento químico de referência. Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos utilizando uma sequência de pulsos modificada de Carr-Purcell-Meiboom-Gill (CPMG) com pressaturação (presat) do sinal da água, no equipamento VARIAN VNMRS 400, operando a 400 MHz e a temperatura de 298 K.

Os parâmetros experimentais utilizados foram os seguintes: tempo de aquisição de 1,704 s, tempo de pressaturação igual a 2,0 s, pw90 igual a 13,2 μs , janela espectral de 4,8 kHz, número de ciclos de 88, tempo de espera do “*spin eco*” de 0,365 s e 128 transientes. Os espectros foram processados utilizando o “*line broadening*” de 0,3 Hz, a linha de base e distorções de fase foram ajustadas manualmente. Um segundo processamento foi efetuado com a assistência do software MestreNova 9.0, onde a linha de base foi novamente reavaliada e ajustada automaticamente pelo método de polinômios de Bernstein, e a fase dos espectros ajustada manualmente. Para a construção da matriz de dados foi utilizada apenas a região do espectro entre δ 0,00 e 8,50 ppm, que foi dividida em regiões (bins) de 0,04 ppm. A região entre os δ 4,5 – 5,5 ppm foi excluída do espectro visto que é entre tais deslocamentos onde se encontra o sinal da água, que mesmo após a etapa de pressaturação ainda dificultava a análise. Dessa forma foi obtida uma matriz com 43 linhas (amostras) e 189 variáveis (bins do espectro de RMN de ^1H mais a variável de classe) que posteriormente foi submetida a análise estatística multivariada.

4.4.2 Procedimentos analíticos

Considerando a margem de erro aceitável (5%), o nível de confiança (95%), a acurácia e a precisão esperadas para determinação dos resultados considerados como verdadeiros para investigação por via metabonômica, e com base em estudo anterior cujo valor predito positivo foi de 94%, o tamanho calculado da amostra para o estudo completo foi de 105 pacientes, sendo 35 no grupo VI, 35 no grupo VF, e 35 no grupo C (52, 96). O cálculo foi baseado em uma distribuição normal conforme a fórmula abaixo descrita:

$$N=Z*Z(P(1-P))/(D*D)$$

Esta primeira etapa trata-se de um “Estudo Piloto”, utilizando 40% do total da amostra para novos cálculos e definição do tamanho definitivo. Com o objetivo de avaliar os modelos criados para o diagnóstico de varicocele, em um primeiro momento, os grupos VF e VI foram unificados para criar um grupo composto de homens com varicocele independentemente do status de fertilidade, denominado grupo V. Não houve mascaramento na fase de seleção dos participantes do estudo, coleta das amostras, e construção dos modelos metabonômicos. Sendo assim, tanto os participantes quanto os pesquisadores conheciam seus respectivos grupos.

Os dados foram descritos em números absolutos ou frequências, a medida de tendência central utilizada foi a Média e a medida de dispersão foi o Desvio Padrão para variáveis com distribuição normal, e Mediana e Intervalo Interquartil para variáveis com distribuição não-normal. 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). As variáveis foram testadas para normalidade com o teste de Shapiro-Wilk. De acordo com o tipo de distribuição da variável estudada, foram utilizados os testes não pareados de análise de variância (ANOVA), Kruskal-Wallis, t de Student, e Mann-Whitney para comparação de médias, e teste exato de Fisher ou χ^2 para comparação de proporções. Um valor de $p < 0,05$ foi definido como o nível de significância estatística.

O modelos de PCA, PLS-DA, e OPLS-DA foram gerados utilizando-se uma plataforma *on-line* disponibilizada para estudos metabonômicos, denominada de MetaboAnalyst 4.0 (97), enquanto os modelos determinados pela LDA foram obtidos com a assistência do Statistica software 10.0.

Neste estudo foi utilizada uma abordagem por etapas para a elaboração dos modelos metabonômicos. Primeiramente, realizou-se uma comparação do grupo C com os grupos VF e VI combinados (grupo V) com a finalidade de criar modelos capazes de discriminar homens férteis sem varicocele de homens com varicocele independente do seu status de fertilidade. A seguir, os grupos VF e VI foram comparados com o intuito de gerar modelos que discriminassem homens férteis com varicocele de homens inférteis com varicocele.

Quanto ao pré-processamento, as amostras foram individualmente normalizadas pela soma, e cada variável foi normalizada usando autoescalamento. Isto foi realizado para comparar os dados espectrais, evitando problemas com diluições de amostras (98). Os modelos desenvolvidos pela LDA foram construídos usando 5 variáveis, que foram selecionadas usando o lambda de Wilks. Em relação à etapa de validação, o modelo LDA para o diagnóstico da varicocele foi validado por *leave-one-out-cross validation* (LOOCV). O teste-F para a função discriminante foi realizado usando 37 e 5 graus de liberdade. No caso da OPLS-DA foi

determinado o número ideal de variáveis latentes para o modelo, usando LOOCV, que forneceu a base para o cálculo da capacidade preditiva (Q^2), coeficiente de determinação (R^2) e precisão de classificação do modelo.

O modelo da LDA para o diagnóstico da infertilidade foi validado pelo LOOCV e o teste-F para a função discriminante foi feito usando 25 e 5 graus de liberdade. Após a etapa de validação, calculou-se as seguintes figuras de mérito: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e acurácia dos modelos. Para a validação dos modelos OPLS-DA foi utilizado o teste de permutação, o qual fez 2000 permutações na identificação da classe e foi verificado a acurácia do modelo OPLS-DA. O LOOCV foi usado para determinar os valores de Q^2 , R^2 e a acurácia de classificação do modelo. O modelo OPLS-DA fornece medidas quantitativas sobre a capacidade de discriminação de cada bin espectral. Esta informação foi extraída a partir do gráfico da importância da variável na projeção VIP.

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.

5 RESULTADOS

5.1 DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

5.1.1 Varicocele Fértil x Varicocele Infértil x Controle

Os grupos C, VF e VI foram compostos por 12, 15 e 16 participantes respectivamente. Conforme exposto na **Tabela 1**, os participantes do grupo VI eram mais jovens do que os dos demais grupos, bem como exibiam testículos de menor volume ao EF. Com relação aos parâmetros seminais, quando se avalia na sequência o grupo C, o grupo VF e em seguida o grupo VI, nota-se uma diminuição progressiva da concentração espermática, da contagem total de espermatozoides, e do total de espermatozoides móveis progressivos. O grupo VI teve níveis mais elevados de FSH e LH quando comparado com os outros grupos.

Tabela 1 – Características demográficas e clínicas grupos VF, VI e C

	VF (n=15)	VI (n=16)	C (n=12)	Valor P
Idade, anos (média ± DP)	33.0 ± 5.0	29.1 ± 4.7	33.5 ± 3.1	0.02*
Idade parceira, anos (média ± DP)	31.4 ± 2.8	28.6 ± 4.5	29.2 ± 3.1	0.11*
Idade da puberdade, anos (média ± DP)	14.9 ± 1.7	13.4 ± 1.3	14.1 ± 1.9	0.04*
Volume testículo direito exame físico, mL (média ± DP)	19.0 ± 4.0	14.8 ± 4.5	21.6 ± 5.9	<0.01*
Volume testículo esquerdo exame físico, mL (média ± DP)	17.0 ± 5.1	11.5 ± 3.6	21.0 ± 6.8	<0.01*
IMC, kg/m ² (média ± DP)	26.10 ± 4.1	25.7 ± 5.2	28.0 ± 4.7	0.43*
Concentração milhões/ml (mediana ± IIQ)	50.0 ± 70.0	6.5 ± 14.7	34.0 ± 111.2	<0.01[§]
Contagem Total, milhões (média ± DP)	185 ± 172	23 ± 25	348 ± 450	<0.01*
Motilidade progressiva, % (média ± DP)	65.4 ± 18.8	28.4 ± 19.3	64.2 ± 19.7	<0.01*
Total de espermat. progressivos, milhões (mediana ± IIQ)	131 ± 148	9 ± 10	258 ± 361	0.01*
Morfologia, % (mediana ± IIQ)	9.5 ± 3.8.	8.8 ± 4.6	8.8 0 ± 4.6	0.69*
Volume do semen, mL (média ± DP)	3.4 ± 1.6	3.2 ± 1.7	4.5 ± 1.2	0.12*
pH do semen (média ± DP)	7.5 ± 0.4	7.4 ± 0.5	7.9 ± 0.3	<0.01*
Testosterona, ng/dL (média ± DP)	412 ± 184	446 ± 146	343 ± 135	0.24*
Testosterona livre, ng/dL (média ± DP)	8.0 ± 2.6	8.6 ± 3.6	7.1 ± 2.1	0.51*
Estradiol, pg/mL (média ± DP)	38.7 ± 18.47	32.34 ± 14.2	38.2 ± 14.1	0.47*
FSH, mUI/mL (mediana ± IIQ)	3.5 ± 2.3	9.7 ± 10.8	3.8 ± 2.3	<0.01[§]
LH, mUI/mL (média ± DP)	3.4 ± 1.3	5.1 ± 2.6	2.8 ± 0.7	<0.01*
Volume testículo direito ultrassom, mL (média ± DP)	14.8 ± 4.9	13.0 ± 5.8	15.4 ± 3.6	0.42*
Volume testículo esquerdo ultrassom, mL (média ± DP)	11.8 ± 4.3	11.8 ± 5.3	13.9 ± 3.7	0.42*
Diâmetro veia testículo direito ultrassom, mm (média ± DP)	1.8 ± 0.5	2.7 ± 0.8		<0.01[¶]
Diâmetro veia testículo esquerdo ultrassom, mm (média ± DP)	3.2 ± 0.6	3.6 ± 0.9		0.29[¶]

FSH = hormônio foliculo estimulante; IMC = índice de massa corpórea LH = hormônio luteinizante.

*ANOVA; † Teste exato de Fischer; §Teste de Kruskal-Wallis; ¶ Teste t de Student.

Fonte: O autor

5.1.2 Controle x Varicocele

Para esta análise os grupos VF e VI foram unificados para criar um grupo composto de homens com varicocele independente do status de fertilidade, denominado grupo V. As

características demográficas e clínicas dos grupos C e V são mostradas na **Tabela 2**. Não houve diferença entre os grupos com relação à idade dos participantes, idade das parceiras, idade da puberdade e do índice de massa corpórea (IMC). Os homens do grupo V apresentaram um menor volume testicular esquerdo medido pelo EF do que os do grupo C, com volume médio de 14.2 ± 5.1 e 21.0 ± 6.8 mL respectivamente ($P=0.01$), e também houve uma tendência de menor volume testicular direito para o grupo V (16.8 ± 4.7 versus 21.6 ± 5.9 mL; $P=0.053$). Todavia, não houve diferença estatisticamente significativa quando o volume testicular foi avaliado pela USGD, tanto para o lado esquerdo quanto para o lado direito (volume médio de 15.4 ± 3.6 versus 13.9 ± 5.4 mL para o testículo direito $P=0.38$, e de 13.9 ± 3.7 versus 11.8 ± 4.7 mL para o testículo esquerdo $P=0.18$). Com relação ao diâmetro da maior veia do plexo pampiniforme avaliado pela USGD, como era de se esperar devido à presença das varicoceles, o grupo V apresentou um diâmetro das veias marcadamente maior bilateralmente do que o do grupo C, sendo de 2.3 ± 0.8 mm versus 1.6 ± 0.2 mm para o lado direito ($P<0.01$) e de 3.4 ± 0.8 e 1.9 ± 0.4 mm para o lado esquerdo ($P<0.01$).

Quanto aos parâmetros de análise seminal, o grupo V apresentou menores contagem total de espermatozoides, motilidade espermática, contagem total de espermatozoides móveis progressivos, volumem seminal e pH quando comparado ao grupo C (**Tabela 2**). Além disso, o grupo V apresentou maiores níveis de LH do que os grupos C (4.3 ± 2.2 versus 2.8 ± 0.7 mUI/mL; $P=0.02$). Os níveis séricos de testosterona total, testosterona livre, e estradiol não apresentaram diferenças estatísticas entre os grupos (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Características demográficas e clínicas grupos C e V

	C (n=12)	V (n=31)	Valor P
Idade, anos (média ± DP)	33.5 ± 3.1	31.0 ± 5.2	0.12*
Idade parceira, anos (média ± DP)	29.2 ± 3.1	30.0 ± 4.0	0.67*
Idade da puberdade, anos (média ± DP)	14.1 ± 1.6	14.1 ± 1.7	0.99*
Volume testículo direito exame físico, mL (média ± DP)	21.6 ± 5.9	16.8 ± 4.7	0.0*
Volume testículo esquerdo exame físico, mL (média ± DP)	21.0 ± 6.8	14.2 ± 5.1	0.01*
Grau 1 varicocele esquerda, %	NA	6%	
Grau 2 varicocele esquerda, %	NA	44%	
Grau 3 varicocele esquerda, %	NA	50%	
Grau 1 varicocele direita, %	NA	55%	
Grau 2 varicocele direita, %	NA	45%	
Grau 3 varicocele direita, %	NA	0%	
IMC, kg/m ² (média ± DP)	28.0 ± 4.7	25.9 ± 4.7	0.19*
Concentração milhões/ml (mediana ± IIQ)	34.0 ± 111.2	15.9 ± 44.0	0.054§
Contagem Total, milhões (média ± DP)	348 ± 450	102 ± 144	<0.01*
Motilidade progressiva, % (média ± DP)	64.2 ± 19.7	46.3 ± 26.6	0.04*
Total de espermat. progressivos, milhões (mediana ± IIQ)	77 ± 305	17 ± 84	0.01§
Morfologia, % (mediana ± IIQ)	8.0 ± 5.5	10.0 ± 3.0	0.18*
Volume do semen, mL (média ± DP)	4.5 ± 1.2	3.3 ± 1.7	0.04*
pH do semen (média ± DP)	7.9 ± 0.3	7.4 ± 0.4	<0.01*
Testosterona, ng/dL (média ± DP)	343 ± 135	429 ± 164	0.11*
Testosterona livre, ng/dL (média ± DP)	7.1 ± 2.1	8.3 ± 3.1	0.25*
Estradiol, pg/mL (média ± DP)	38.2 ± 14.1	35.4 ± 16.4	0.60*
FSH, mUI/mL (mediana ± IIQ)	3.3 ± 1.5	3.6 ± 5.1	0.25§
LH, mUI/mL (média ± DP)	2.8 ± 0.7	4.3 ± 2.2	0.02*
Volume testículo direito ultrassom, mL (média ± DP)	15.4 ± 3.6	13.9 ± 5.4	0.38*
Volume testículo esquerdo ultrassom, mL (média ± DP)	13.9 ± 3.7	11.8 ± 4.7	0.18*
Diâmetro veia testículo direito ultrassom, mm (média ± DP)	1.6 ± 0.2	2.3 ± 0.8	<0.01*
Diâmetro veia testículo esquerdo ultrassom, mm (média ± DP)	1.9 ± 0.4	3.4 ± 0.8	<0.01*

FSH = hormônio folículo estimulante; IMC = índice de massa corpórea LH = hormônio luteinizante.

* Teste t de Student; § Teste U de Mann-Whitney

Fonte: O autor

5.1.3 Varicocele Fértil x Varicocele Infértil

A **Tabela 3** resume as características demográficas e clínicas dos grupos VF e VI. Os homens do grupo VI eram mais jovens que os do grupo VF, com idade média de 29.1 ± 4.7 e 33.0 ± 5.0 anos respectivamente (P=0.03), bem como tiveram um puberdade em idade um pouco mais precoce (idade média 13.4 ± 1.3 e 14.9 ± 1.7 anos respectivamente; P=0.01), e tinham parceiras mais jovens, porém este último dado não atingiu significância estatística (28.6 ± 4.5 e 31.4 ± 2.8 anos respectivamente; P=0.06). O tempo médio de infertilidade, ou seja, o tempo desde o início das relações sexuais regulares e sem métodos contraceptivos, do grupo VI foi de 56 ± 62 meses.

O grupo VI apresentou testículos de menor volume quando comparados com o grupo VF, sendo 14.8 ± 4.5 e 19.0 ± 4.0 mL respectivamente para o lado direito (P=0.01), e 11.5 ±

3.6 e 17.0 ± 5.1 mL respectivamente para o lado esquerdo ($P < 0.01$). Com relação ao tamanho da varicocele, não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição do grau de varicocele entre os grupos VF e VI, porém o grupo VI apresentou diâmetro venoso maior bilateralmente no exame de USGD, sendo a média de tamanho da maior veia do lado direito de 1.8 ± 0.5 mm no grupo VF *versus* 2.7 ± 0.8 cm no grupo VI ($P < 0.01$), e de 3.2 ± 0.6 cm e 3.6 ± 0.9 no lado esquerdo para os grupos VF e VI respectivamente, porém não houve significância estatística para este último dado ($P = 0.29$).

Quanto aos parâmetros de análise seminal, o grupo VI apresentou menores concentração de espermatozoides, contagem total de espermatozoides, motilidade espermática e contagem total de espermatozoides móveis progressivos quando comparados ao grupo VF (**Tabela 3**). Além disso, o grupo VI apresentou maiores níveis de LH e FSH do que o grupo VF (**Tabela 3**). Os níveis séricos de testosterona total, testosterona livre, e estradiol não apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre os grupos.

Tabela 3 – Características demográficas e clínicas grupos VF e VI

	VF (n=15)	VI (n=16)	Valor P
Idade, anos (média ± DP)	33.0 ± 5.0	29.1 ± 4.7	0.03*
Idade parceira, anos (média ± DP)	31.4 ± 2.8	28.6 ± 4.5	0.06*
Idade da puberdade, anos (média ± DP)	14.9 ± 1.7	13.4 ± 1.3	0.01*
Volume testículo direito exame físico, mL (média ± DP)	19.0 ± 4.0	14.8 ± 4.5	0.01*
Volume testículo esquerdo exame físico, mL (média ± DP)	17.0 ± 5.1	11.5 ± 3.6	<0.01*
Grau 1 varicocele esquerda, %	20%	6%	
Grau 2 varicocele esquerda, %	40%	44%	
Grau 3 varicocele esquerda, %	40%	50%	0.62†
Grau 1 varicocele direita, %	50%	55%	
Grau 2 varicocele direita, %	50%	45%	
Grau 3 varicocele direita, %	0%	0%	1†
IMC, kg/m ² (média ± DP)	26.1 ± 4.1	25.7 ± 5.2	0.83*
Concentração milhões/ml (média ± DP)	68 ± 92	8.2 ± 8.0	0.01*
Contagem Total, milhões (média ± DP)	185 ± 172	23 ± 25	<0.01*
Motilidade progressiva, % (média ± DP)	65.4 ± 18.8	28.4 ± 19.3	<0.01*
Total de espermat. progressivos, milhões (média ± DP)	131 ± 148	9 ± 10	<0.01*
Morfologia, % (média ± DP)	9.5 ± 3.8	8.8 ± 4.6	0.64*
Volume do sêmen, mL (média ± DP)	3.4 ± 1.6	3.2 ± 1.7	0.81*
pH do sêmen (média ± DP)	7.5 ± 0.4	7.4 ± 0.5	0.06*
Testosterona, ng/dL (média ± DP)	412 ± 184	446 ± 146	0.57*
Testosterona livre, ng/dL (média ± DP)	8.0 ± 2.6	8.6 ± 3.6	0.59*
Estradiol, pg/mL (média ± DP)	38.7 ± 18.4	32.3 ± 14.2	0.28*
FSH, mUI/mL (mediana ± IIQ)	3.4 ± 1.2	7.3 ± 5.1	<0.01§
LH, mUI/mL (média ± DP)	3.4 ± 1.3	5.1 ± 2.6	0.03*
Volume testículo direito ultrassom, mL (média ± DP)	14.8 ± 4.9	13.0 ± 5.8	0.37*
Volume testículo esquerdo ultrassom, mL (média ± DP)	11.8 ± 4.3	11.8 ± 5.3	0.99*
Diâmetro veia testículo direito ultrassom, mm (média ± DP)	1.8 ± 0.5	2.7 ± 0.8	<0.01*
Diâmetro veia testículo esquerdo ultrassom, mm (média ± DP)	3.2 ± 0.6	3.6 ± 0.9	0.29*

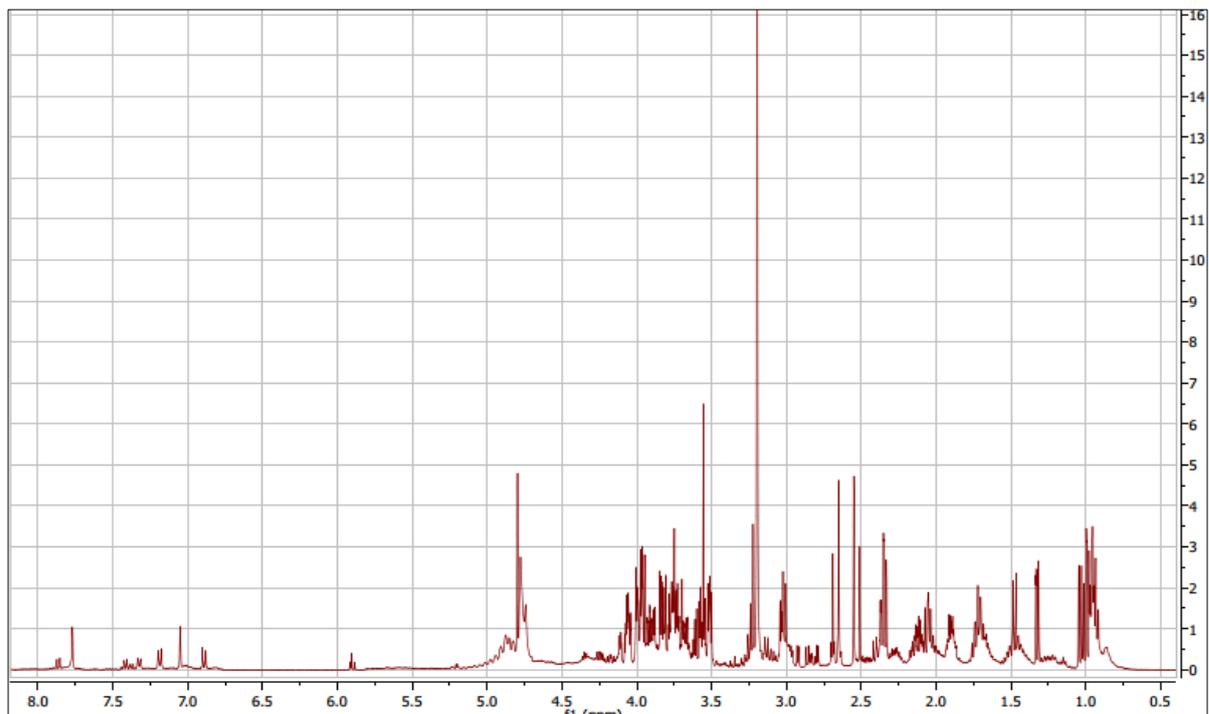
Fonte: O autor.

5.2 DADOS ESPECTRAIS E ANÁLISES MULTIVARIADAS

5.2.1 Controle x Varicocele

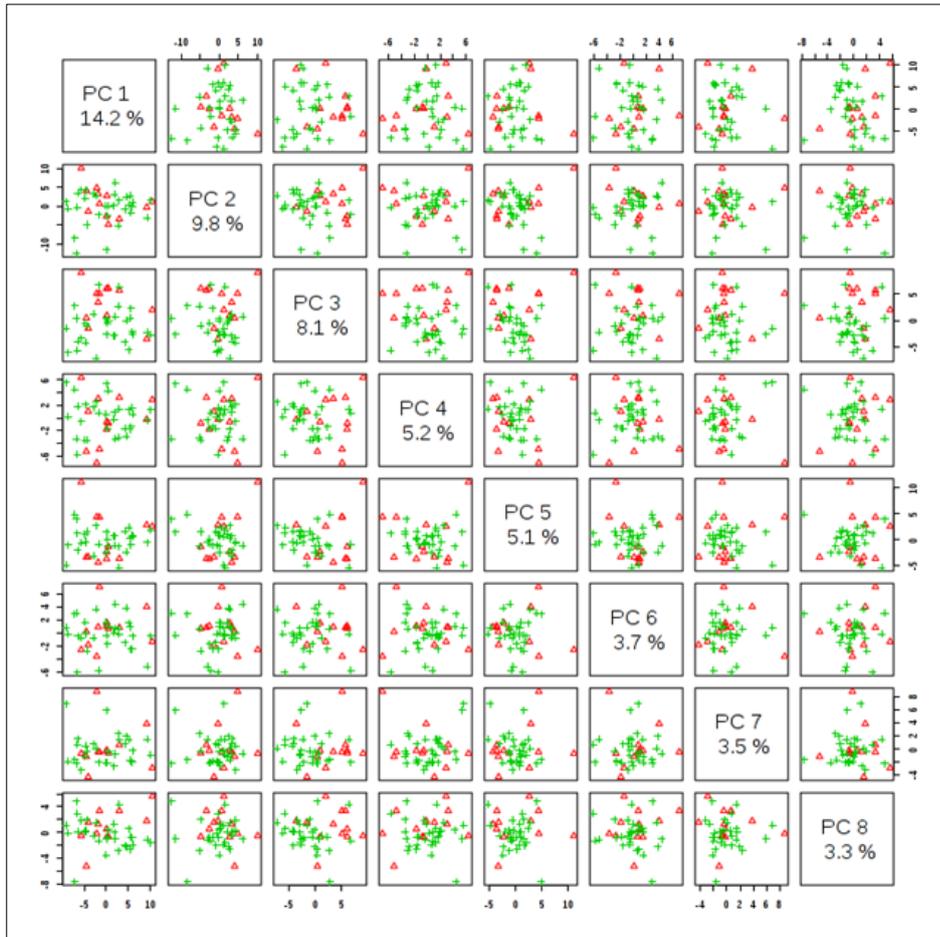
Após obtenção dos espectros de RMN de ^1H do soro de sêmen (**Figura 7**), foi inicialmente empregado o método de PCA para uma análise exploratória do nosso conjunto de dados com o objetivo de observar se eles naturalmente agrupavam no espaço multidimensional. Porém não foi observada uma aglomeração natural das amostras em função da presença ou não de varicocele (**Figura 8**).

Figura 7 – Exemplo de espectro de RMN de ^1H de soro de sêmen



Fonte: O autor

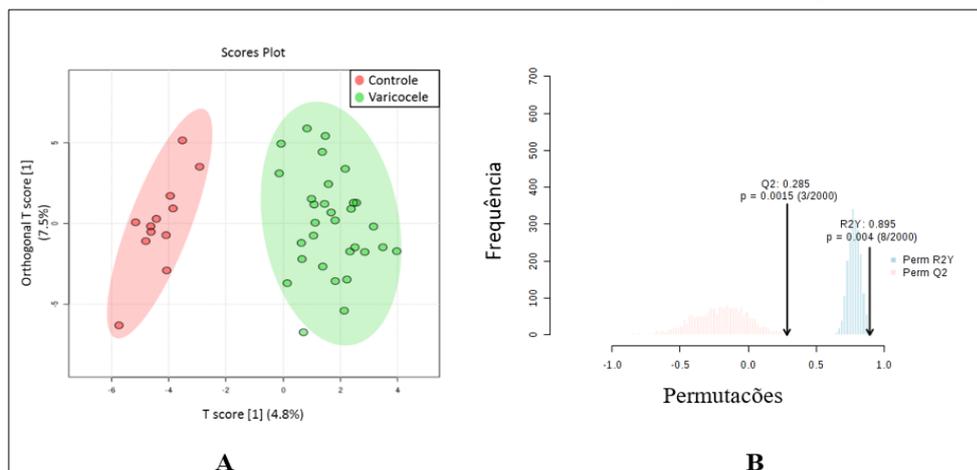
Figura 8 – Análise exploratória utilizando PCA



Fonte: O autor

Dois modelos supervisionados foram construídos, usando os formalismos OPLS-DA e LDA, respectivamente. O modelo OPLS-DA conseguiu discriminar os dois grupos com uma acurácia de aproximadamente 90% e $P < 0,004$ (Figuras 9a e 9b).

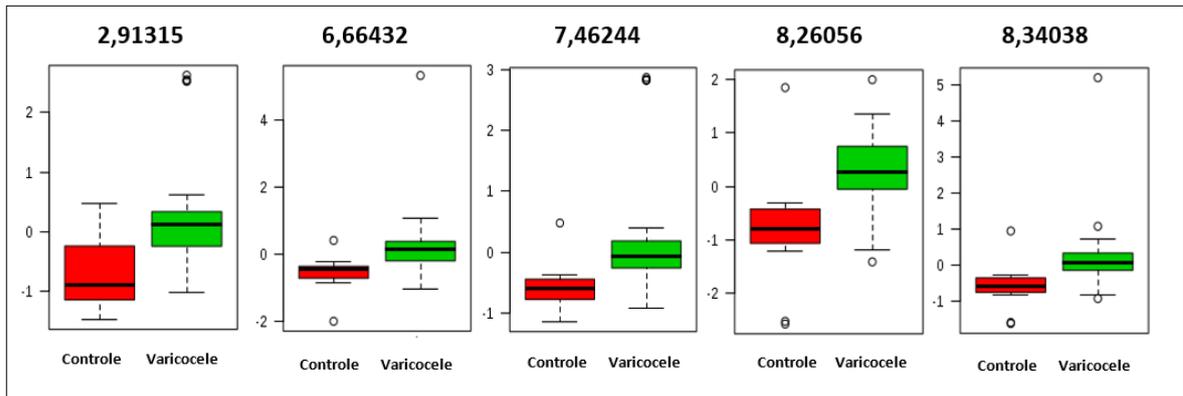
Figura 9 – OPLS-DA controle x varicocele. A- score plot. B- Figuras de mérito



Fonte: O autor

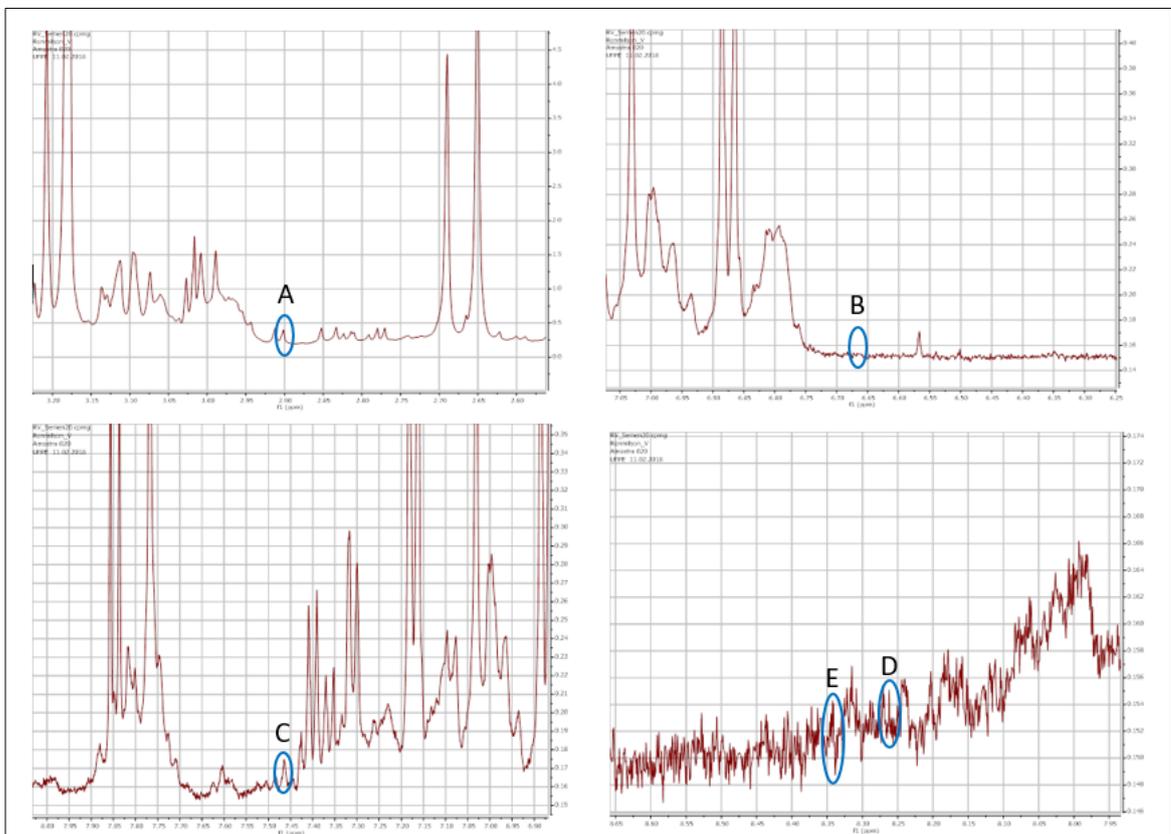
O modelo OPLSDA apresenta as variáveis mais importantes para a discriminação observada. Elas são apresentadas na figura na **Figura 10**, e seus deslocamentos químicos mostrados em detalhes na **Figura 11**.

Figura 10 – Variáveis que melhor discriminaram os grupos C e V no modelo OPLS-DA identificadas pelos respectivos deslocamentos químicos



Fonte: O autor

Figura 11 – Detalhe dos deslocamentos químicos associados às variáveis que melhor discriminaram os grupos C e V no modelo OPLS-DA. A – 2,91 ppm. B – 6,66 ppm. C 7,46 ppm. D 8,26 ppm. E 8,34 ppm

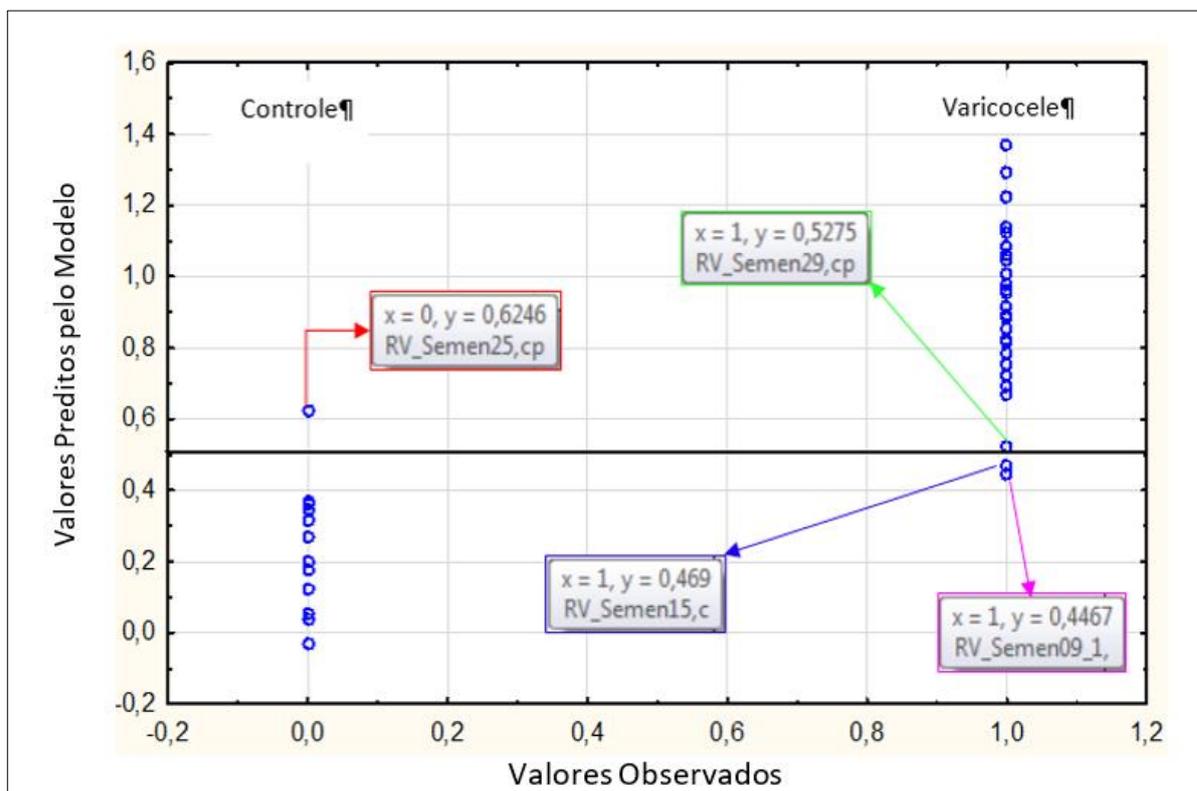


Fonte: O autor

Buscando otimizar os resultados, a matriz de dados previamente pré-processada foi submetida à LDA. O modelo LDA foi construído utilizando 5 variáveis selecionadas utilizando-se o lambda de Wilks. As variáveis selecionadas para o modelo LDA apresentaram os seguintes deslocamentos químicos δ (ppm) 2.91, 4.15, 4.27, 7.38 e 8.06 .

O modelo foi avaliado pelo teste Fischer com 5 e 37 graus de liberdade e apresentou significância estatística ($F_{37,5} = 15,02$; $p < 0,001$). A validação foi realizada utilizando-se o método de LOOCV. O resultado dessa validação apresentou uma acurácia de 93,0%, que é um pouco melhor que a observada para o modelo OPLSDA (89,5%). O modelo LDA classificou erroneamente as amostras 09, 15 e 25, conforme **Figura 12**.

Figura 12 – Resultado da LDA para a comparação entre os grupos C e V



Fonte: O autor

Após a validação LOOCV, o modelo apresentou sensibilidade de 93,5% e especificidade de 91,7%. Valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo iguais a 96,6% e 84,5%, respectivamente. A **Tabela 4** apresenta de forma resumida os resultados para o modelo LDA.

Tabela 4 – Resultados do Modelo da LDA (depois da validação cruzada) usando os dados espectrais de RMN de ^1H para discriminação entre os grupos C e V

Modelo	Grupos		Total
	Varicocele	Controle	
Varicocele	29	1	30
Controle	2	11	13
Sensibilidade = 93.5%		Valor preditivo positivo = 96.6%	
Especificidade = 91.7%		Valor preditivo negativo = 84.5%	
Acurácia= 93.0%		$F_{37,5} = 15.02$ (P<0.001)	

Fonte: O autor

5.2.2 Varicocele Fértil x Varicocele Infértil

Para a análise comparativa entre os grupos VF e VI utilizamos inicialmente os modelos PLS-DA e OPLS-DA, que não tiveram significância estatística. As figuras de mérito, após LOOCV para os dois formalismos, revelam que os modelos não apresentam condições para a discriminação das classes envolvidas. A **Tabela 5** descreve os atributos de mérito dos dois formalismos para esse conjunto de dados.

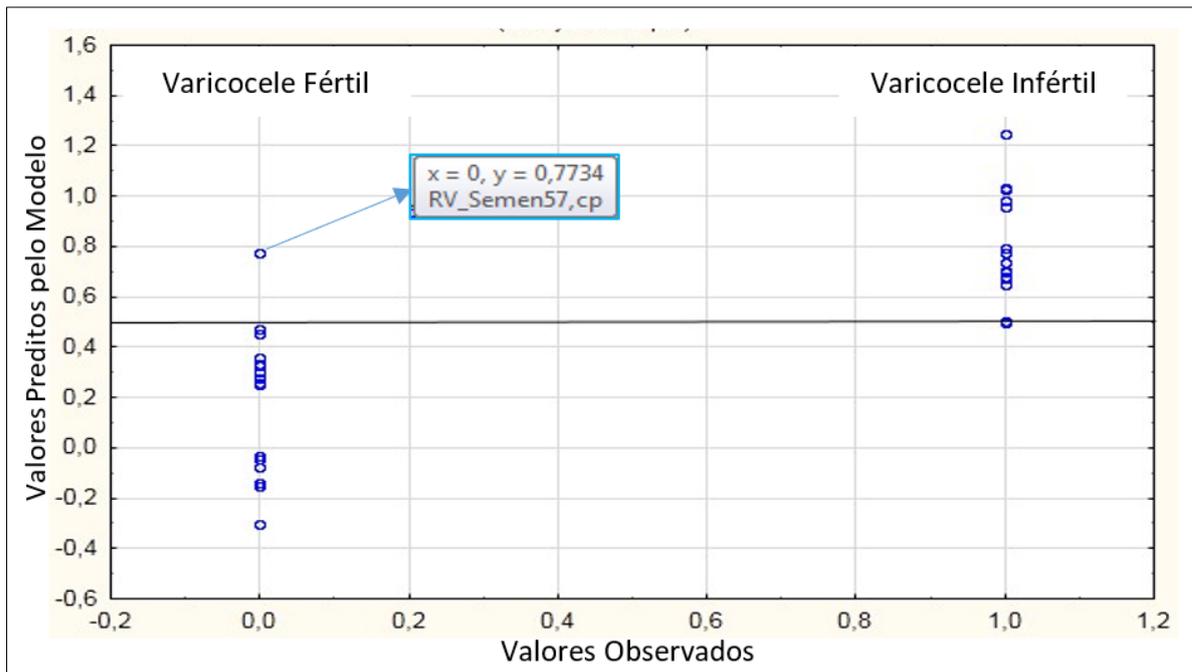
Tabela 5 – Resultados da PLS-DA e OPLS-DA (após a validação cruzada) usando os dados espectrais de RMN de ^1H para a discriminação entre os grupos VF e VI

	Acurácia	R^2Y	Q^2	P
<i>PLS-DA</i>	58%	0,4666	-0,1074	0,968
<i>OPLS-DA</i>	85%	0,924	-0,27	0,6425

Fonte: O autor

A **Figura 13** apresenta o gráfico de valores preditos pelo modelo versus o diagnóstico para cada amostra, que aqui foi arbitrariamente definida como 0 (zero), para os pacientes inférteis, e 1 (um) para os férteis.

Figura 13 – Resultado da LDA para a comparação entre os grupos VF e VI



Fonte: O autor

O modelo LDA obtido após LOOCV apresentou uma acurácia de 96,77%. Na **Tabela 6**, é apresentada a Matriz de Classificação para o modelo LDA e são expressos os resultados das outras figuras de mérito alcançadas na análise. É digno de nota que a amostra 57, que foi classificada erroneamente pela LDA, é proveniente de um participante azoospermico com varicocele que não melhorou após a cirurgia de varicocelectomia, sugerindo uma outra causa de infertilidade que não a varicocele e explicando o comportamento aberrante da amostra no modelo. Ressalta-se ainda que uma outra amostra (amostra 53) também de um paciente azoospermico, porém que melhorou os parâmetros seminais após a varicocelectomia, foi classificada de maneira correta pelo modelo.

Tabela 6 – Resultados da LDA (após a validação cruzada) usando os dados espectrais de RMN de ^1H para a discriminação entre os grupos VF e VI

Modelo	Grupos		Total
	Varicocele Fértil	Varicocele Infértil	
Varicocele Fértil	15	0	15
Varicocele Infértil	1	15	16
Sensibilidade = 93.7%		Valor preditivo positivo = 100%	
Especificidade = 100%		Valor preditivo negativo = 93.7%	
Acurácia= 96.7%		$F_{26,5} = 7.70$ ($P < 0.001$)	

Fonte: O autor

6 DISCUSSÃO

Mesmo diante de tantos pontos controversos sobre sua fisiopatologia, diagnóstico, e tratamento, a varicocele é considerada uma das principais condições associadas à infertilidade masculina. Recentemente, diferentes técnicas “ômicas” têm sido utilizadas para melhor compreender os mecanismos que levam a varicocele a causar infertilidade masculina, auxiliando no desenvolvimento de novas ferramentas diagnósticas, terapêuticas e prognósticas (19, 41, 84, 99). Os métodos “ômicos” utilizam técnicas de alto rendimento para estudar vários sistemas biológicos passo-a-passo, progredindo desde as informações mais básicas contidas no genoma, passando por mecanismos que 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 fenoma (100).

A presente pesquisa trata-se do primeiro trabalho a utilizar a metabonômica para a criação de modelos para o diagnóstico da varicocele bem como para a discriminação entre homens com varicocele férteis e inférteis.

Utilizando as ferramentas OPLS-DA e LDA, conseguimos criar modelos capazes de diferenciar homens saudáveis de homens com varicocele independentemente do status de fertilidade, mesmo com um número reduzido de amostras disponíveis para este estudo piloto (**Figuras 9 e 13**). Tendo como referência dados do EF e de USGD, estes modelos tiveram uma alta acurácia, sendo 89,5% para a OPLS-DA e 93% para a LDA (**Figura 9b e Tabela 4**). A capacidade destes modelos em discriminar os participantes do grupo C daqueles do grupo V com valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN significativos corrobora 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.

É importante notar que esses achados estão em congruência com os resultados de trabalhos utilizando a proteômica para estudar alterações no sêmen de adolescentes e homens com e sem varicocele (85, 101). Quando comparados com um grupo controle de adolescentes sem varicocele, adolescentes com varicocele apresentaram uma maior expressão de proteínas relacionadas a resposta inflamatória e imune, mesmo quando não exibiam alterações dos parâmetros seminais (85, 101). A presença de alterações dos metabólitos e proteínas do sêmen de indivíduos portadores de varicocele mas que não possuem espermograma alterado sugere que a varicocele é uma condição heterogênea com implicações que vão além do impacto nos parâmetros seminais clássicos.

Além disso, os modelos criados, se validados externamente com um número maior de amostras, permitirão a criação de um dado analítico para o diagnóstico de varicocele, o que é importante tendo em vista que até o presente momento este diagnóstico é feito na prática clínica através do EF e/ou USGD, que, conforme exposto anteriormente, têm um caráter operador-dependente com grande variação intra e interobservador (32, 36, 37).

Nosso trabalho também conseguiu criar um modelo de LDA capaz de diferenciar homens férteis com varicocele de homens inférteis com varicocele com uma acurácia de 96,7% após validação cruzada (**Figura 14**). 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 (25). 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. Além disso, o fato do modelo ter classificado erroneamente um paciente azoóspermico que não obteve melhora do espermograma após a cirurgia, enquanto classificou corretamente um outro paciente azoóspermico que melhorou com o procedimento, sugere que a metabonômica pode ser usada para discriminar pacientes que melhorarão ou não após o tratamento cirúrgico, evitando assim tratamentos invasivos desnecessários. Destaca-se ainda que não há na literatura estudos utilizando outras técnicas “ômicas” que compararam estes dois grupos de homens com varicocele.

Outros grupos têm demonstrado que é possível utilizar a metabonômica para criar modelos capazes de diagnosticar com alta acurácia certos fenótipos ligados à infertilidade masculina. Um estudo utilizando RMN de ^1H de soro de sêmen foi capaz de gerar 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 (53). Outro estudo similar construiu modelos de OPLS-DA capazes de discriminar homens com infertilidade idiopática (com espermograma normal) de homens inférteis com oligospermia com acurácia de 89% (44). Também utilizando RMN de ^1H de soro de sêmen e OPLS-DA, Zhang et al geraram um modelo que segregou homens férteis de homens com astenozoospermia com uma acurácia de 85.7% (92).

Um dos pontos fortes do nosso estudo foi a utilização do critério diagnóstico de infertilidade sugerido pela Sociedade Americana de Reprodução Humana, considerado atualmente o melhor critério a ser utilizado em pesquisas (4). Além disso todos os participantes foram avaliados pelo mesmo especialista em infertilidade masculina, bem como tiveram todas

as USGD realizadas com o mesmo radiologista especialista em patologia do trato geniturinário e todos os exames laboratoriais realizados em um laboratório central, aspectos estes que diminuem a chance de viés de seleção. Deve-se ressaltar mais uma vez que não houve mudança na rotina de atendimento dos participantes, e que todas as amostras colhidas e exames clínicos realizados já fazem parte da avaliação inicial do paciente infértil, fatores que facilitam uma possível incorporação da espectroscopia de RMN de ^1H neste contexto clínico.

Por outro lado, o estudo não é isento de limitações. A principal limitação foi o número reduzido de amostras utilizadas devido ao presente estudo se tratar de um estudo piloto, o qual tem como objetivo principal testar, avaliar, revisar e aprimorar os instrumentos e procedimento de pesquisa e é limitado quanto a capacidade de atingir os objetivos finais da mesma. Outra limitação foi a não utilização de pareamento por idade. Deste modo, embora a diferença de idade entre os grupos tenha sido pequena e só atingiu diferença estatística entre os grupos VF e VI, não podemos excluir a possibilidade de que alterações nos metabólitos do sêmen causadas pelo envelhecimento tenham agido com fator de confusão das análises. Além disso, a avaliação das parceiras dos homens inférteis foi feita apenas através da anamnese, não sendo realizados exames complementares adicionais para descartar possíveis causas de infertilidade feminina não diagnosticada.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

O presente estudo demonstrou a espectroscopia por RMN de ^1H do soro de sêmen pode ser utilizada em conjunto com ferramentas de estatística multivariada para a criação de modelos metabonômicos úteis na discriminação entre homens com varicocele e sem varicocele, e entre homens com varicocele férteis e inférteis. Futuros estudos são necessários para validar externamente os modelos criados e para aprofundar a investigação dos metabólitos importantes para a segregação dos grupos.

REFERÊNCIAS

1. TUREK, P. Male reproductive physiology. In: WEIN, A.J. et al. **Campbell-Walsh Urology**. 11 ed. Philadelphia: Elsevier Saunders, 2016. p. 516-37.
2. NETO F.T. et al. Spermatogenesis in humans and its affecting factors. **Semin. Cell. Dev. Biol.** v. 59, p.10-26, 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 **Fertil. Steril.** v.92, n.5, p.1520-4, 2009
4. ASRM. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. **Fertil. Steril.** v. 99, n.1, p. 15-282, 2013
5. BOIVIN, J. et al. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. **Hum. Reprod.** v.22, n.6, p. 1506-12, 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. **Fertil. Steril.** v. 99, n.5, ed.1, p. 1324-31, 2013
7. RUTSTEIN, S.O., IQBAL, H. S. Infecundity, Infertility, and Childlessness in Developing Countries. In: WHO. **DHS Comparative Reports**. 4 ed. Calverton: ORC Macro, 2004.
8. ASRM. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. **Fertil. Steril.** v. 103, n.3, ed.1, p. 18-25, 2015
9. COOPER, T.G. et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. **Hum Reprod Update.** v.16, n.3, p.231-245, 2010
10. ESTEVES S.C. Clinical relevance of routine semen analysis and controversies surrounding the 2010 World Health Organization criteria for semen examination. **Int Braz J Urol.** v.40, n4, p. 443-453, 2014
11. BORGHT, M. V., WYNS, C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. **Clin Biochem.** v. 62, p.2-10, 2018
12. BARRATT, C.L.R. et al. The diagnosis of male infertility: an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. **Hum Reprod Update.** v.23, n.6, p.660-680, 2017
13. 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. **Hum Reprod.** v.22, n.2, p.536-542, 2007

14. SIGMAN, M.; LIPSHULTZ, L.I.; HOWARDS, S.S. Office evaluation of the subfertile male. In: Niederberger CS, Lipshultz LI, Howards SS, editors. **Infertility in the Male**. 4 ed. Cambridge: Cambridge University Press, 2009. p. 153-76.
15. BAAZEEM, A. et al. Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. **Eur Urol**. v.60, n.4, p.796-808, 2011
16. CLARKE, B.G. Incidence of varicocele in normal men and among men of different ages. **Jama**. v.198, n.10, p.1121-2, 1966
17. GORELICK, J.I.; GOLDSTEIN, M. Loss of fertility in men with varicocele. **Fertil. Steril**. v. 59, n.3, p. 613-6, 1993
18. SIGMAN, M. There is more than meets the eye with varicoceles: current and emerging concepts in pathophysiology, management, and study design. **Fertil. Steril**. v. 96, n.6, p. 1281-2, 2011
19. AGARWAL, A. et al. Differential proteomic profiling of spermatozoal proteins of infertile men with unilateral or bilateral varicocele. **Urol**. v.85, n.3, p. 580-8, 2015
20. BROWN, J.S., DUBIN, L., HOTCHKISS, R.S. The varicocele as related to fertility. **Fertil. Steril**. v. 18, n.1, p. 46-56, 1967
21. AGARWAL, A.; PRABAKARAN, S.; ALLAMANENI, S.S. Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. **Reprod. Biomed. Online**. v. 12, n. 5, p. 630-3, 2006.
22. KRZYSCIĄK, W.; KOZKA, M. Generation of reactive oxygen species by a sufficient, insufficient and varicose vein wall. **Acta Bioch. Polon**. v. 58, n. 1, p. 89-94, 2011
23. JENSEN, C.F.S et al. Varicocele and male infertility. **Nat. Rev. Urol**. v. 14, n.9, p.523-33, 2017
24. KANTARTZI, P.D. et al. Male infertility and varicocele: myths and reality. **Hippokratia**. v.11, n.3, p. 99-104, 2007
25. CHEN, S.S. Significant predictive factors for subfertility in patients with subclinical varicocele. **Androl**. v.49, n.10, 2017
26. ZARGOOSHI, J. Sperm count and sperm motility in incidental high-grade varicocele. **Fertil. Steril**. v. 88, n.5, p. 1470-3, 2007
27. 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. **Fertil. Steril**. v. 83, n.1, p. 74-7, 2005
28. WHO. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. World Health Organization. **Fertil. Steril**. v. 57, n.6, p. 1289-1293,1992

29. TISEO, B.C., ESTEVES, S.C., COCUZZA, M.S. Summary evidence on the effects of varicocele treatment to improve natural fertility in subfertile men. **Asian J. Androl.** v.18, n.2, p.239-245, 2016.
30. MARMAR, J.L. et al. Reassessing the value of varicocelectomy as a treatment for male subfertility with a new meta-analysis. **Fertil. Steril.** v.88, n.3, p. 639-648, 2007
31. SU, L.M.; GOLDSTEIN, M.; SCHLEGEL, P.N. The effect of varicocelectomy on serum testosterone levels in infertile men with varicoceles. **J. Urol.** v. 154, n.5, p. 1752-5, 1995
32. GAT, Y. et al. Physical examination may miss the diagnosis of bilateral varicocele: a comparative study of 4 diagnostic modalities. **J Urol.** v.172, n.4, p. 1414-7, 2004
33. MORAG, B. et al. The role of spermatic venography after surgical high ligation of the left spermatic veins: diagnosis and percutaneous occlusion. **Urol. Radiol.** v. 7, n.1, p. 32-34, 1985
34. DUBIN L.; AMELAR, R.D. Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. **Fertil. Steril.** v. 21, n. 8, p. 606-609, 1970
35. BELAY, R.E. et al. Diagnosis of clinical and subclinical varicocele: how has it evolved? **Asian J. Androl.** v.18, n.2, p.182-5, 2016
36. SHAKERI, S. et al. Inter-observer agreement on varicoceles diagnosis among patients referred to Shiraz Namazi Hospital. **Int. J. Reprod. Biomed.** v. 16, n.10, p. 649-52, 2018
37. SOROKIN, I et al. Interinstitutional variability in testicular volumes and varicocele presence by ultrasound: surprising discrepancies and implications for clinical decision making. **Urol.** v. 85, n.5, p. 1079-89, 2015
38. TRUM, J.W. et al The value of palpation, varicoscreen contact thermography and colour Doppler ultrasound in the diagnosis of varicocele. **Hum. Reprod.** v. 11, n.6, p. 1232-5, 1996
39. 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
40. AUA, ASRM. Report on optimal evaluation of the infertile male. **Fertil. Steril.** v.86, n.5, S202-S209, 2006
41. SANTANA, V.P. et al. Genetics and epigenetics of varicocele pathophysiology: an overview. **J. Assist. Reprod. Genet.** v.34, n. 7, p. 839-847, 2017
42. AGARWAL, A. Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. **Urol.** v.74, n. 3, p. 461-9, 2009
43. KOVAC, J.R.; PASTUSZAK, A.W.; LAMB, D.J. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. **Fertil. Steril.** v. 99, n.4, p. 998-1007, 2013

44. JAYARAMAN, V. et al. Identification of biochemical differences between different forms of male infertility by nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy. **J. Assist. Reprod. Genet.** v. 31, n.9, p. 1195-204, 2014
45. DUNN, W.B., ELLIS, D.I. Metabolomics: Current analytical platforms and methodologies. **TrAC.** v.24, n.4, p.285-94, 2005
46. MAYR, M. Metabolomics: ready for the prime time? **Circ. Cardiovasc. Genet.** v. 1, n.1, p. 58-65, 2008
47. WISHART, D.S. et al. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. **Nucleic Acids Res.** v.41, D801-7, 2013
48. NICHOLSON, J.K. et al. Metabonomics: a platform for studying drug toxicity and gene function. **Nat. Ver. Drug. Discov.** v.1, n.2, p. 153-61,2002
49. 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.1181-9, 1999
50. LINDON, J.C.; HOLMES, E.; NICHOLSON, J.K. So what's the deal with metabonomics? **Anal Chem.** v.75, n.17, p. 384A-391, 2003
51. ARAUJO, L. C. N. Estudo piloto: diagnóstico do câncer urológico por via metabonômica. 2016. 85 f. Tese (Doutorado em Cirurgia) – Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco, Recife. 2016
52. GODOY, M.M. et al. Hepatitis C virus infection diagnosis using metabonomics. **J. Viral Hepat.** v.17, n.12, p.854-8, 2010
53. GUPTA, A et al. ¹H NMR spectroscopic studies on human seminal plasma: a probative discriminant function analysis classification model. **J. Pharm. Biom. Analysis.** v.54, n. 1, p. 106-13, 2011
54. ROBERTSON, D. G. Metabonomics in toxicology: a review. **Toxicol. Sci.** v. 85, n. 2, p.809-22, 2005
55. TRYGG, J.; LUNDSTEDT, T. Chemometrics Techniques for Metabonomics. In: LINDON JC, NICHOLSON JK, HOLMES E. **The Handbook of Metabonomics and Metabolomics.** 1 ed. London: Elsevier Science, 2007. p. 172-199
56. WORLEY, B.; POWERS, R. Multivariate Analysis in Metabolomics. **Curr. Metabolom.** v.1, n.1, p. 92-107, 2013
57. BRERETON, R. B. **Chemometrics for Pattern Recognition.** 1 ed. West Sussex: John Wiley & Sons, Ltd, 2009.
58. 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 Informatic**, 3., 2007, Agadir. p. 51-55

59. WESTERHUIS, J.A. et al. Assessment of PLSDA cross validation. **Metabolomics**. v.4, n.1, p.81-9, 2008
60. RUBINGH, C. et al. Assessing the Performance of Statistical Validation Tools for Megavariate. **Metabolomics**. v.2, n.2, p. 53-61, 2006
61. YAMAMOTO, M. et al. Effect of varicocelectomy on sperm parameters and pregnancy rate in patients with subclinical varicocele: a randomized prospective controlled study. **J. Urol.** v. 155, n.5, p.1636-1638, 1996
62. 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
63. LIMA, S.B. et al. Expression of the HSPA2 gene in ejaculated spermatozoa from adolescents with and without varicocele. **Fertil. Steril.** v.86, n.6, p.1659-63, 2006
64. TU, L.H. et al. Potential role of prokineticin 2 in experimental varicocele-induced rat testes. **Urology**. v.80, n.4, p. 952.e15-952.e9.52E19, 2012
65. DEL GIUDICE, P.T. et al. Expression of the Fas-ligand gene in ejaculated sperm from adolescents with and without varicocele. **J. Assist. Reprod. Genet.** v.27, n.2-3, p. 103-109, 2010
66. 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
67. ZALATA, A. A. et al. Androgen receptor expression relationship with semen variables in infertile men with varicocele. **J. Urol.** v.189, n.6, p. 2243-7, 2013
68. 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
69. ICHIOKA, K. et al. Genetic polymorphisms in glutathione S-transferase T1 affect the surgical outcome of varicocelectomies in infertile patients. **Asian J. Androl.** v.11, n.3, p.333-41, 2009
70. CHEN, S.S. et al. Polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and male infertility in Taiwanese patients with varicocele. **Hum. Reprod.** v.17, n.3, p. 718-25, 2002
71. MITROPOULOS, D. et al. Nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities in the spermatic vein of patients with varicocele: a potential role for nitric oxide and peroxynitrite in sperm dysfunction. **J. Urol.** v.6, p.1952-8, 1996
72. ZINI, A. et al. Effect of microsurgical varicocelectomy on human sperm chromatin and DNA integrity: a prospective trial. **Int. J. Androl.** v. 34, n.1, p. 14-19, 2011
73. GABRIEL, M. S. Influence of microsurgical varicocelectomy on human sperm mitochondrial DNA copy number: a pilot study. **J. Assist. Reprod. Genet.** v.29, n.8, p. 759-64, 2012

74. HEIDARI, M.M. et al. Mitochondrial Genetic Variation in Iranian Infertile Men with Varicocele. **Int. J. Fertil. Steril.** v.10, n.3, p. 303-9, 2016
75. GASHTI, N.G. et al. 4977-bp mitochondrial DNA deletion in infertile patients with varicocele. **Andrologia.** v.46, n.3, p.258-62, 2014
76. KOBAYASHI, H. et al. Aberrant DNA methylation of imprinted loci in sperm from oligospermic patients. **Hum. Mol. Genet.** v.16, n. 21, p. 2542-2551, 2007
77. BAHREINIAN, M. et al. DNA hypomethylation predisposes sperm to DNA damage in individuals with varicocele. **Syst. Biol. Reprod. Med.** v. 61, n.4, p.179-86, 2015
78. 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
79. LA SALLE, S. et al. Loss of spermatogonia and wide-spread DNA methylation defects in newborn male mice deficient in DNMT3L. **BMC Dev Biol.** v.7, n. 104, 2007
80. TAVALAEE, M. et al. Effect of varicocelectomy on sperm functional characteristics and DNA methylation. **Andrologia.** v.47, n.8, p. 904-9, 2015
81. MOSTAFA, T. Seminal miRNA Relationship with Apoptotic Markers and Oxidative Stress in Infertile Men with Varicocele. **Biomed Res Int.** n. 2314-6141, 2016
82. 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
83. SADEK, A. et al. Sperm chromatin condensation in infertile men with varicocele before and after surgical repair. **Fertil. Steril.** v.95, n. 5, p. 1705-8, 2011
84. CAMARGO, M., INTASQUI, P., BERTOLLA, R.P. Proteomic profile of seminal plasma in adolescents and adults with treated and untreated varicocele. **Asian J. Androl.** v.18, n. 2, p.194-201, 2016.
85. 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
86. AGARWAL, A. et al. Proteomic signatures of infertile men with clinical varicocele and their validation studies reveal mitochondrial dysfunction leading to infertility. **Asian J. Androl.** v.18, n. 2, p. 282-91, 2016
87. 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
88. CAMARGO, M et al. Unbiased label-free quantitative proteomic profiling and enriched proteomic pathways in seminal plasma of adult men before and after varicocelectomy. **Hum. Reprod.** v. 28, n. 1, p. 33-46, 2013

89. HOSSEINIFAR, H. et al. Study of the effect of varicocele on sperm proteins expression in patients with varicocele and poor sperm quality by using two-dimensional gel electrophoresis. **J. Assist. Reprod. Genet.** v. 31, n. 6, p. 725-9, 2014
90. HAMAMAH, S. et al. ¹H nuclear magnetic resonance studies of seminal plasma from fertile and infertile men. **J. Reprod. Fertil.** v. 97, n. 1, p.51-5, 1993
91. MAHER, A. D. et al. Seminal oligouridinoses: low uridine secretion as a biomarker for infertility in spinal neurotrauma. **Clin. Chem.** v.54, n.12, p. 2063-6, 2008
92. ZHANG, X. et al. Metabolic characterization of asthenozoospermia using nontargeted seminal plasma metabolomics. **Clin. Chim. Acta.** v.50, p.254-61, 2015
93. ZHANG, J. et al. Metabolomic analysis reveals a unique urinary pattern in normozoospermic infertile men. **J. Proteome Res.** v.13, n.6, p.3088-99, 2014
94. AARONSON, D.S. et al. A novel application of ¹H magnetic resonance spectroscopy: non-invasive identification of spermatogenesis in men with non-obstructive azoospermia. **Hum Reprod.** v.25, n. 4, p.847-52, 2010
95. WHO. **Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen.** 5 ed, 2010.
96. BUJANG, M.A.; ADNAN, T. H. Requirements for Minimum Sample Size for Sensitivity and Specificity Analysis. **J. Clin. Diagn. Res.** v.10, n.10, p.Ye01-Ye6, 2016
97. CHONG, J. et al. MetaboAnalyst 4.0: towards more transparent and integrative metabolomics analysis. **Nucleic Acids Res.** v. 46, n.1, p.W486-W94, 2018
98. SUMNER, L.W. et al. Proposed minimum reporting standards for chemical analysis Chemical Analysis Working Group (CAWG) Metabolomics Standards Initiative (MSI). **Metabolomics.** v.3, n.3, p. 211-21, 2007
99. LYNCH, M.J. et al. Ultra high field NMR spectroscopic studies on human seminal fluid, seminal vesicle and prostatic secretions. **J. Pharm. Biomed Anal.** v.12, n.1, p.5-19, 1994
100. KARCZEWSKI, K. J; SNYDER, M.P. Integrative omics for health and disease. **Nat. Rev. Genet.** v.19, n. 5, p. 299-310, 2018
101. ZYLBERSZTEJN, D.S. et al. Proteomic analysis of seminal plasma in adolescents with and without varicocele. **Fertil. Steril.** v.99, n.1, p.92-8, 2013

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 Gilherme 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 Guilherme 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) _____



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):

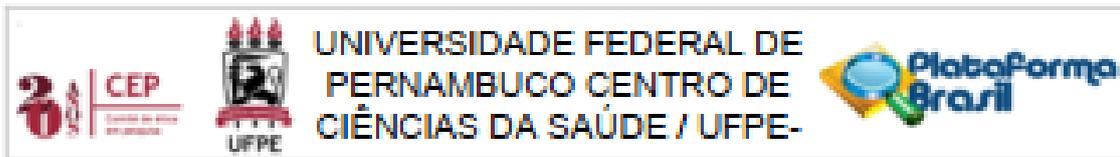
Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

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

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

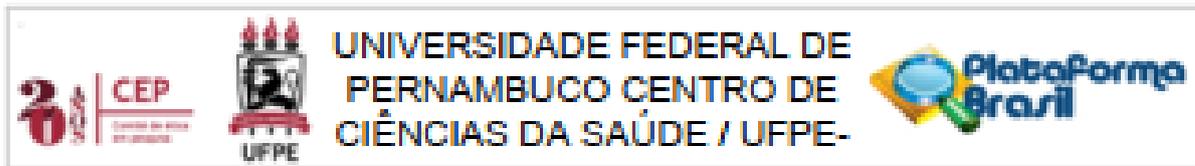
Apresentação do Projeto:

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 Correia 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 a 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 - 1º andar, sala 4, Prédio do Centro de Ciências da Saúde
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.748-000
 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.

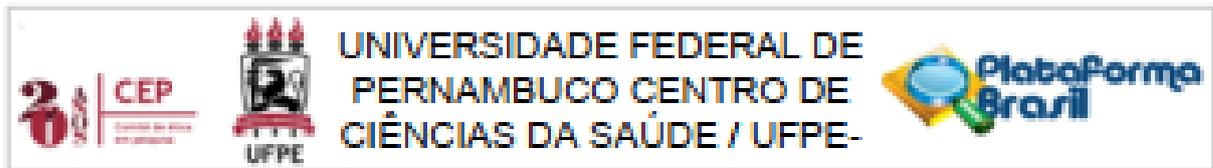
O grupo I fornecerá amostras biológicas antes e 3 meses após o tratamento, a fim de serem realizadas análises pareadas e comparativas com grupos II e III.

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: 1.076.735

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

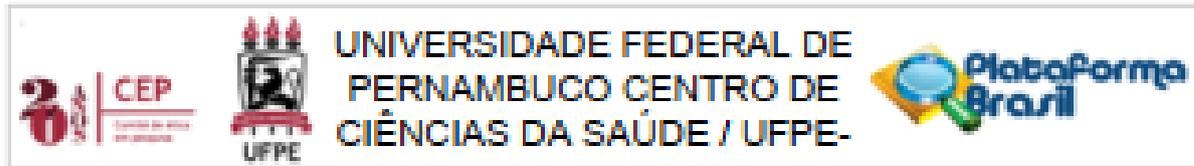
- 1) Diferenciar pacientes férteis com varicocele (grupo 1), de pacientes inférteis com varicocele (grupo 2), e de pacientes férteis sem varicocele (grupo 3), a partir do modelo proposto.
- 2) Analisar se o modelo metabonômico de pacientes inférteis com varicocele se aproxima do modelo metabonômico dos 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: 50.740-000
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2120-8288 E-mail: cepcca@ufpe.br



Continuação do Protocolo: 1.876.725

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.

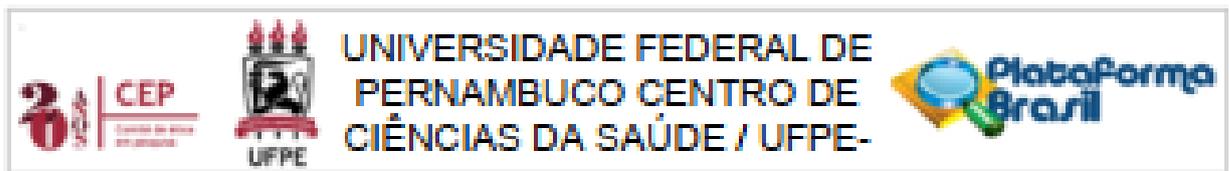
Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

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-TGLE 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: 50.748-900
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2126-4588 E-mail: cepcca@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1376/2016

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 a critério 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.

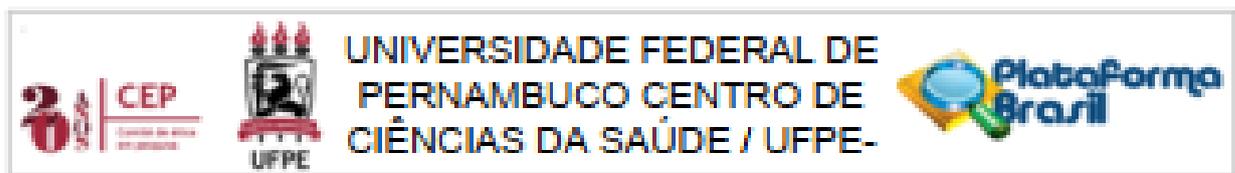
Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (Item X.1.3.b, da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

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_P ROJETO_799297.pdf	10/03/2017 13:12:08		Acerto

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º 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: 1378/2017

Outros	CARTADERESPOSTAASPENDENCIAS.pdf	10/03/2017 13:11:44	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
Outros	CartaAnuendaUrologiaHC.pdf	09/03/2017 21:24:12	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	31/01/2017 10:41:55	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
Outros	termodecompromisso.jpg	31/01/2017 10:38:24	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	31/01/2017 10:38:29	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
Outros	ANEXO2FichaColetaDados.docx	30/01/2017 17:55:33	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	VaricoceleMetabonomicaHBNT2.docx	28/01/2017 16:24:10	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
Outros	comprovantemestrado.pdf	28/01/2017 16:23:27	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
Outros	anuendadqf.pdf	28/01/2017 16:22:57	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
Outros	anuendalimp.pdf	28/01/2017 16:21:51	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
Outros	termodecompromissoassinado.pdf	28/01/2017 16:21:13	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
Outros	CurriculoLattesFlaviaCristinaMoronePinto.pdf	22/01/2017 16:38:03	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
Outros	CurriculoLattesRicardoOliveiradaSilva.pdf	22/01/2017 16:38:07	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
Outros	CurriculoLattesLeslieCliffordNoronhaFraluto.pdf	22/01/2017 16:37:06	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
Outros	CurriculoLattesRionnilsonAlvesMarques.pdf	22/01/2017 16:36:11	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
Outros	CurriculoLattesSalvadorVilarCorreiaLima.pdf	22/01/2017 16:34:38	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
Outros	CurriculoLattesBerafficoPerceiraGabralJunior.pdf	22/01/2017 16:33:51	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
Outros	CurriculoLattesFilipeTenorioLiraNeto.pdf	22/01/2017 16:32:47	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito

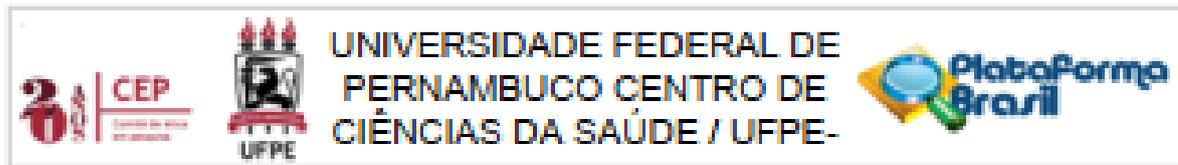
Situação do Parecer:

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: 50.746-600
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)3136-8588 E-mail: cepcca@ufpe.br



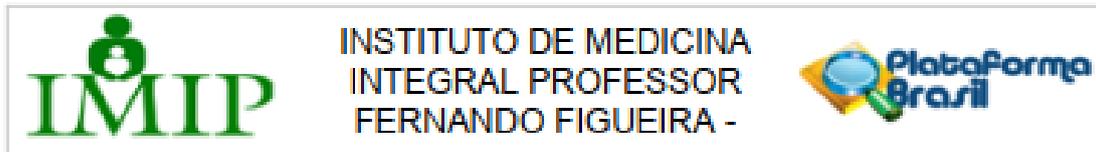
Continuação do Parecer: 1.578.735

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: 50.070-550

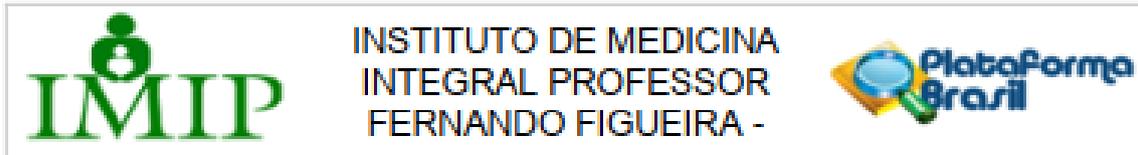
UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2122-4758

Fax: (81)2122-4782

E-mail: comitedeetica@imip.org.br



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		Aceito
Outros	CARTADERESPOSTAASPENDENCIAS .pdf	10/03/2017 13:11:44	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_799297.pdf	09/03/2017 21:24:31		Aceito
Outros	CartaAnuenciaUrologiaHC.pdf	09/03/2017 21:24:12	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_799297.pdf	31/01/2017 10:42:16		Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	31/01/2017 10:41:55	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
Outros	termodecompromisso.jpg	31/01/2017 10:39:24	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	31/01/2017 10:38:29	Filipe Tenório Lira Neto	Aceito
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_799297.pdf	30/01/2017 17:56:50		Aceito
Outros	ANEXO2FichaColetaDados.docx	30/01/2017	Filipe Tenório Lira	Aceito

Endereço: Rua das Costas, 300

Bairro: Boa Vista

CEP: 56.070-550

UF: PE Município: RECIFE

Telefone: (81)2122-4756

Fax: (81)2122-4782

E-mail: comitedetica@imip.org.br



INSTITUTO DE MEDICINA
INTEGRAL PROFESSOR
FERNANDO FIGUEIRA -



Continuação do Parecer: 2.075.008

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 22 de Maio de 2017

Assinado por:
Gláucia Virginia de Quelroz 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: comitadestica@imip.org.br