



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO - UFPE
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA - CCEN
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA – DQF

ESTEFANE CUNHA SANTOS SALLES

**ENSAIOS METABONÔMICOS PARA AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DE
PACIENTES SUBMETIDOS À VARICOCELECTOMIA VISANDO MELHORA DOS
PARÂMETROS SEMINAIS**

Recife
2023

ESTEFANE CUNHA SANTOS SALLES

**ENSAIOS METABONÔMICOS PARA AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DE
PACIENTES SUBMETIDOS À VARICOCELECTOMIA VISANDO MELHORA DOS
PARÂMETROS SEMINAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Química do Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como parte dos requisitos exigidos para obtenção do título de Mestre em Química.

Área de Concentração: Química Analítica

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva

Coorientadora: Dra. Tássia Brena Barroso Carneiro da Costa

Recife

2023

Catálogo na fonte
Bibliotecário Josias Machado da Silva Junior, CRB4-1690

- S168e Salles, Estefane Cunha Santos
Ensaio metabonômico para avaliação prognóstica de pacientes submetidos à varicocelectomia visando melhora dos parâmetros seminais / Estefane Cunha Santos Salles. – 2023.
81 f.: il., fig., tab., abrev. e siglas.
- Orientador: Ricardo Oliveira da Silva.
Coorientador: Tássia Brena Barroso Carneiro da Costa
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. CCEN, Química, Recife, 2023.
Inclui referências e apêndices.
1. RMN de ¹H. 2. Metabonômica. 3. Infertilidade. 4. Varicocelectomia. 5. Sangue. I. Silva, Ricardo Oliveira da (orientador). II. Costa, Tássia Brena Barroso Carneiro da. III. Título.

543

CDD (23. ed.)

UFPE-CCEN 2024 - 41

ESTEFANE CUNHA SANTOS SALLES

**ENSAIOS METABONÔMICOS PARA AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA DE
PACIENTES SUBMETIDOS À VARICOCELECTOMIA VISANDO MELHORA DOS
PARÂMETROS SEMINAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação no Departamento de Química Fundamental da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Química.
Área de Concentração: Química Analítica.

Aprovada em: 23/10/2023

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Ricardo Oliveira da Silva (Orientador)
Universidade Federal de Pernambuco

Prof.^a Dr.^a. Giovana Araújo de Lima Pereira
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Jorge Luiz Neves
Universidade Federal de Pernambuco

Prof. Dr. Fernando Hallwass
Universidade Federal de Pernambuco

Dedico este trabalho primeiramente ao meu Deus, que em nenhum momento me deixou fraquejar ou desistir e sempre me permitiu realizar os meus sonhos. Aos meus pais, Antônio e Edna, que sempre acreditaram no meu potencial e investiram em mim. Ao meu esposo, Sammuel, por todo suporte, sendo uma âncora quando eu pensava que não iria conseguir e contribuiu muito com essa conquista. À minha irmã, Estela, por sempre estar ao meu lado. Aos meus amigos, por todo apoio, que foi muito importante para conseguir vencer os desafios.

AGRADECIMENTOS

Para a concretização deste trabalho primeiramente quero render graças ao meu Deus, pois sem Ele, não poderia fazer nada na minha vida. *Para que todos vejam, e saibam, e considerem, e juntamente entendam que a mão do Senhor fez isto* (Is. 41:20).

Agradeço ao meu querido esposo, Sammuel Salles, pois sempre acreditou em mim quando eu mesma não acreditava que seria capaz de realizar. Seu apoio foi fundamental, sendo meu amparo nos momentos mais difíceis, me ajudando a prosseguir e realizar meus sonhos que também se tornaram seus sonhos. Eu te agradeço de todo meu coração!

Agradeço aos meus pais, Antônio e Edna, por sempre ter investido na minha educação, ensinando princípios e valores para que eu me tornasse quem hoje sou. Sei que essa realização também é de vocês. Meu muito obrigada! Agradeço a minha querida irmã, Estela, por sempre me ajudar e apoiar.

Agradeço aos meus pastores pelo incentivo nos meus estudos, pois desde o início da pós-graduação sempre estiveram por perto se preocupando, torcendo pela minha conquista e agradeço aos meus irmãos em Cristo que se alegraram comigo e sempre estavam com uma palavra de encorajamento.

Ao meu orientador Prof. Dr. Ricardo Oliveira, uma pessoa ímpar, profissional incrível, incentivador, que domina metabonômica de uma forma surreal, e que tem na sua vida o prazer em ensinar e compartilhar. Muito obrigada, professor, suas orientações e discussões foram e são de grande importância na minha formação.

À minha coorientadora Profa. Dra. Tássia Brena Costa não tenho palavras para lhe agradecer toda sua dedicação, acolhimento, sempre me ajudando, tirando minhas dúvidas com a maior paciência do mundo e que contribuiu muito no desenvolvimento do trabalho. Obrigada por ter aceitado o desafio!

Aos meus companheiros do LabMeQ, gratidão por todas as contribuições e ajuda com meu trabalho, Antonia, Ronmilson, Marcio, mas em especial, as meninas Milena e Tatiane por todo treinamento, paciência, e que por muitas vezes saindo do laboratório muito tarde, final de semana, só para me ajudar a aprender a técnica e

manusear o equipamento. Minha gratidão a todos por deixarem esse período mais leve!

Ao Laboratório da Central Analítica do Departamento de Química Fundamental, especificamente o RMN com Eliete, por proporcionar a efetivação da pesquisa.

Ao Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP) e ao Dr. Filipe Tenório pela disponibilização das amostras.

Às minhas queridas professoras da graduação Dra. Priscyla Andrade e Dra. Ana Rosa Galdino (*in memoriam*) por toda contribuição no decorrer da minha vida acadêmica e no processo da seleção do mestrado, na qual, fizeram a ponte entre mim e o grupo de pesquisa do professor Dr. Ricardo Oliveira. Deixo a minha eterna gratidão e admiração.

À Capes pela bolsa do Mestrado para que eu conseguisse realizar a pesquisa e aos órgãos de fomento FACEPE e CNPQ pelo apoio financeiro ao projeto.

RESUMO

A infertilidade é uma patologia congruente ao sistema reprodutor e estudos apontam que cerca de 1/5 dos casais apresentam este tipo de disfunção. No estudo em questão, o foco está relacionado ao sexo masculino, uma vez que pesquisas correlacionam a infertilidade masculina à varicocele, pois, sabe-se que esta pode causar danos ao bom funcionamento do testículo e à espermatogênese, alterando os parâmetros espermáticos do indivíduo. Todavia, não é possível concluir que a infertilidade, na presença de varicocele, tenha esta última como causa. Mas, a varicocelectomia é uma alternativa para melhorar os parâmetros seminais e aumentar a probabilidade de gravidez do casal. No entanto, há um número expressivo de casos em que a melhora dos parâmetros seminais pós-varicocelectomia não é observada e, portanto, prever o desfecho da cirurgia, no tocante aos parâmetros seminais, é um desafio. Neste estudo, usamos a metabonômica baseada em RMN como ferramenta de avaliação para prever os efeitos da varicocelectomia nos parâmetros seminais de pacientes diagnosticados com infertilidade masculina. Este estudo visa construir modelos metabonômicos capazes de prever a melhora dos parâmetros seminais, a partir dos espectros de RMN de ^1H do soro sanguíneo de pacientes submetidos à varicocelectomia. Foram incluídos no estudo, trinta e dois voluntários diagnosticados com varicocele e infertilidade, sendo que dezessete apresentaram melhora dos parâmetros seminais pós-cirurgia. Todos os voluntários foram submetidos à microcirurgia de varicocelectomia e tiveram uma análise padrão de sêmen e determinação dos níveis séricos de hormônios sexuais. Os espectros de RMN de ^1H do soro sanguíneo coletado antes da intervenção cirúrgica foram adquiridos usando o espectrômetro VNMR400 operando a 400 MHz. Os dados espectrais foram processados usando o MetaboAnalyst para construção dos modelos da análise exploratória através da Análise de Componentes Principais (PCA) e análise classificatória como a Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais (PLS-DA) e Análise Discriminante por Projeções Ortogonais à estrutura latente (OPLS-DA) e utilizando software Statistica 12.0 para construção do modelo metabonômico a partir da Análise Discriminante Linear (LDA). Como resposta ao estudo, o modelo LDA apresentou os melhores resultados e foram construídas funções discriminantes a partir da seleção de cinco variáveis espectrais – δ (ppm) 0,85; 1,25; 2,09; 2,57 e

2,61. O modelo metabonômico apresentou 84,4% de exatidão, 88,2% de sensibilidade e 80,0% de especificidade, após validação cruzada total (LOOCV). Esses resultados indicam que a metabonômica baseada em RMN tem potencial para ser usada como ferramenta prognóstica para alterações dos parâmetros seminais após varicocelectomia.

Palavras-chave: RMN de ^1H ; metabonômica; infertilidade; varicocelectomia; sangue.

ABSTRACT

Infertility is a clinical condition that affects 1/5 of couples and about 40% these cases are due men. Varicocele is an inflammatory disease which affects testicle veins and can cause damage to spermatogenesis, having repercussion on male fertility. However, varicocele is not responsible by all cases of male infertility. Then, it is necessary to investigate this relationship. Varicocelectomy is surgical intervention that can be an alternative to promote seminal parameters improvement and increase pregnancy probability. Therefore, seminal parameters improvements are not always observed. This demands the development of analytical methods for predicting the outcome varicocelectomy. In this study, we used NMR-based metabonomics as evaluate tool to predict the effects of varicocelectomy on seminal parameters of patients diagnosed with male infertility. Study was developed at Urological Service of IMIP Hospital and Fundamental Chemistry Department of Universidade Federal de Pernambuco, Brazil. Thirty-two volunteers simultaneously diagnosed with varicocele and infertility were included in the study, being that seventeen presented seminal parameters improvement after varicocelectomy. All volunteers were undergoing to varicocelectomy microsurgery. Seminal analysis and sex hormonal serum level were performed. ^1H NMR spectra of blood serum were acquired using VNMRs400 spectrometer operating to 400 MHz. The spectral data were processed using MetaboAnalyst for the construction of exploratory analysis models through Principal Components Analysis (PCA) and classification analysis such as Partial Least Squares Discriminant Analysis (PLS-DA) and Orthogonal Projection Discriminant Analysis to the latent structure (OPLS-DA) and using Statistica 12.0 software to build the metabonomic model from the Linear Discriminant Analysis (LDA). As a response to the study, the LDA formalism showed better results, being build a discriminant function after selection of five spectral variables – δ (in ppm) 0.85, 1.25, 2.09, 2.57, and 2.61. This metabonomic model presented 84.4% accuracy, 88.2% sensitivity and 80.0% specificity after leave-one-out cross validation (LOOCV). These results suggest that NMR-based metabonomics has potential to be used for prediction of varicocelectomy surgery outcomes in male infertility cases.

Keywords: ^1H NMR; metabonomics; infertility; varicocelectomy; blood.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1-	Equipamento de Ressonância Magnética Nuclear e seus componentes	24
Figura 2-	Vetor magnetização M após o pulso de $(\pi/2)_x$	26
Figura 3-	Vetor magnetização transversal	27
Figura 4-	Relaxação longitudinal (T1) da componente Mz para M0	28
Figura 5-	Relaxação transversal (T2) com a magnetização no plano xy	28
Figura 6-	Transformada de Fourier para conversão do FID em espectro	29
Figura 7-	Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D2O, 27 °C) de uma amostra de soro de paciente	31
Figura 8-	Ilustração da sequência de pulsos de RF utilizada para supressão do sinal da água	32
Figura 9-	Espectro de RMN de ^1H (400MHz, D2O, 27°C) de uma amostra de soro adquirida a partir da sequência de pulsos PRESAT	32
Figura 10-	Sequência de pulsos PRESAT e CPMG	33
Figura 11-	Magnetização no plano xy durante a refocagem	33
Figura 12-	Espectro de RMN de ^1H (400MHz, D2O, 27°C, PRESAT-CPMG) de uma amostra de soro	33
Figura 13-	Rotação das variáveis originais para obtenção das componentes principais. PC 1 e 2 são as componentes principais	38
Figura 14-	Representação gráfica da PCA. O gráfico à esquerda representa o score plot com a distribuição dos escores em função das componentes principais PC1 e PC2; à direita temos o gráfico dos pesos	39
Figura 15-	Ilustração da matriz X e Y para um conjunto de amostras classificadas como A e B	40
Figura 16-	Representação gráfica da PLS-DA. À esquerda, o gráfico de escores; à direita, o VIP score	41

Figura 17-	Representação gráfico dos escores na OPLS-DA	42
Figura 18-	Imagem testículo normal versus testículo com varicocele	45
Figura 19-	Diferença da estrutura anatômica na passagem venosa do testículo esquerdo e direito	46
Figura 20-	Efeitos da varicocele	47
Figura 21-	Distribuição dos grupos investigados para o estudo desenvolvido	53
Figura 22-	Gráfico boxplot dos níveis séricos dos hormônios sexuais. M – Melhora / NM – Não-Melhora	58
Figura 23-	Gráfico bloxpot dos níveis séricos dos parâmetros seminais. M – Melhora / NM – Não- Melhora	59
Figura 24-	Espectros de RMN de 1H (400 MHz, D2O, Presat-CPMG) de amostras de soro dos grupos Melhora (acima) e Não-Melhora (abaixo)	61
Figura 25-	Gráficos dos escores das amostras do modelo PCA obtido a partir da matriz CPMG com os pré-processamentos da normalização por soma e centralização na média, realizada usando a matriz de covariância. Em vermelho, amostras do grupo não-melhora; em verde, amostras do grupo melhora	62
Figura 26-	Gráficos dos escores das amostras do modelo PCA obtido a partir da matriz CPMG com os pré-processamentos da normalização por soma e autoescalamamento, realizada usando a matriz de covariância. Em vermelho, amostras do grupo não-melhora; em verde, amostras do grupo melhora	62
Figura 27-	Scree plot da PCA. Em azul, a variância explicada por cada PC; e em verde, a variância acumulada	63
Figura 28-	Gráfico de escores (esquerda) e figuras de mérito (direita) do modelo PLS-DA	64
Figura 29-	Teste de permutação da PLS-DA com 2000 permutações	64
Figura 30-	Gráfico de escores (esquerda) e de permutações (direita) do modelo OPLS-DA	65

Figura 31- Espectro de RMN e ^1H (PRESAT-CPMG, 400 MHz) do 66
soro, com atribuição dos sinais selecionados no formalismo
LDA

Figura 32- Gráfico de escores da LDA. Elipse verde – Melhora. Elipse 69
vermelha – Não-Melhora

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Propriedades espectroscópicas de alguns núcleos importantes para a RMN	26
Tabela 2-	Matriz de confusão dos resultados de uma classificação	43
Tabela 3-	Classificação de Dubin e Amelar para grau de varicocele no exame físico	48
Tabela 4-	Dados demográficos e clínicos dos 32 voluntários participantes do estudo	57
Tabela 5-	Identificação dos principais metabólitos discriminantes, bins correspondentes e níveis de concentração relativos em cada grupo	66
Tabela 6-	Matriz de Confusão do Modelo LDA após Validação Cruzada	68

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BMRB –	<i>Biological Magnetic Resonance Bank</i>
CPMG –	Carr-Purcell-Meiboom-Gill
FSH –	Hormônio Folículo Estimulante
HMDB –	<i>Human Metabolome Database</i>
LDA –	Análise Discriminante Linear
LH –	Hormônio Luteinizante
LOOCV –	Validação Cruzada Total, do inglês, <i>Leave-One-out-Cross Validation</i>
OMS –	Organização Mundial de Saúde
OPLS-DA	Projeções ortogonais para análise discriminante de estruturas latentes, tradução livre do inglês, <i>Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis</i>
PCA –	Análise de Componente principal, do inglês, <i>Principal Component Analysis</i>
PLS-DA –	Análise discriminante por mínimos quadrados parciais, do inglês, <i>Partial Least Squares Discriminant Analysis</i>
RMN de ¹ H –	Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1
SNV –	<i>Standard Normal Variate</i>
TCLE –	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
VF –	Varicocele Fértil
VI –	Varicocele Infértil
VIP –	<i>Variable Importance in the Projection</i>
VPP –	Valor Preditivo Positivo
VPN –	Valor Preditivo Negativo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	21
2.1	METABONÔMICA	21
2.2	ESPECTROSCOPIA DE RESSONÂNCIA MAGNÉTICA NUCLEAR	24
2.2.1	Princípios Básicos	24
2.2.2	Relaxação Longitudinal (T_1)	27
2.2.3	Relaxação Transversal (T_2)	28
2.2.4	FID	29
2.3	SEQUÊNCIAS DE PULSOS: PRESAT E CPMG	31
2.4	QUIMIOMETRIA	36
2.4.1	Análise de Componentes Principais (PCA)	37
2.4.2	Análise Discriminante por Mínimos Quadrados Parciais	39
2.4.3	Projeções Ortogonais para Análise Discriminante de Estruturas Latentes (OPLS-DA)	41
2.4.4	Análise Discriminante Linear (LDA)	42
2.4.5	Figuras de Mérito	43
2.5	VARICOCELE	44
3	HIPÓTESE	50
4	JUSTIFICATIVA	51
5	OBJETIVOS	52
5.1	OBJETIVO GERAL	52
5.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
6	MATERIAIS E MÉTODOS	53
6.1	SELEÇÃO DOS PACIENTES E GRUPO DE ESTUDO	53
6.2	APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	53
6.3	PROTEÇÃO DOS PACIENTES ENVOLVIDOS	53
6.4	EXAMES CLÍNICOS-LABORATORIAIS DOS PACIENTES	54
6.5	PREPARAÇÃO DAS AMOSTRAS DE SORO SANGUÍNEO E ANÁLISE POR RMN DE ^1H	54

6.6	TRATAMENTO ESTATÍSTICO PARA ANÁLISES MULTIVARIADAS	55
7	RESULTADOS E DISCUSSÃO	57
7.1	RESULTADOS DEMOGRÁFICOS CLÍNICO-LABORATORIAIS	57
7.2	ESPECTRO DE RMN DE 1H DOS GRUPOS NÃO-MELHORA E MELHORA	61
7.3	ANÁLISE EXPLORATÓRIA - PCA	62
7.4	ANÁLISE CLASSIFICATÓRIA – PLS-DA	63
7.5	ANÁLISE CLASSIFICATÓRIA – OPLS-DA	65
7.6	ANÁLISE CLASSIFICATÓRIA - LDA	65
8	CONCLUSÃO	70
9	PERSPECTIVAS	71
	REFERÊNCIAS	72
	APÊNDICE A – PLANILHA MATRIZ DOS DADOS PROCESSADOS NO METABOANALYST	78
	APÊNDICE B- PLANILHA MATRIZ DOS DADOS PROCESSADOS NO STATISTICA	79
	ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFPE	80
	ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA DO IMIP	81

1 INTRODUÇÃO

A reprodução é uma etapa do desenvolvimento humano, na qual os indivíduos buscam perpetuar a espécie e deixar seu legado no mundo. Faz parte da vida nascer, desenvolver, reproduzir e morrer. Porém, na tentativa de reprodução, pode acontecer insucessos. Muitos fatores estão envolvidos e podem ser a causa do que conhecemos por infertilidade. A infertilidade é uma patologia congruente ao sistema reprodutor humano que atinge cerca de 1/5 dos casais. Segundo os dados da Organização Mundial de Saúde, 15% da população é infértil (Ferlin; Foresta, 2020).

Na avaliação diagnóstica, ambos os parceiros precisam ser investigados, daí ser importante o acompanhamento por profissionais especializados em ginecologia e andrologia. Vivemos em uma sociedade que ainda ocorre o preconceito sobre se ter um acompanhamento médico. As mulheres foram ensinadas a anualmente realizarem seus exames preventivos, porém, os homens, em sua maioria, se baseiam em um ditado popularmente dito: “Quem procura, acha”, pensando que são fortes ou saudáveis suficientes ao ponto de não realizarem seu *check up*. (Martins, 2020). O sinal de alerta surge quando o casal está na tentativa da concepção durante um ano sem nenhum método contraceptivo e com vida sexual ativa regularmente, mas não conseguem engravidar (OMS, 2010).

Ao ser realizado o acompanhamento do casal através do profissional de saúde habilitado, a investigação da doença precisa ser feita nos dois, uma vez que a infertilidade pode ser causa de fator apenas masculino ou feminino e, em certos casos, a causa está no casal. Por isso, a importância da investigação mútua. Um dos principais estigmas é que a infertilidade é relacionada ao sexo feminino, mas estudos indicam que as mulheres são responsáveis por 50% a 60% dos casos, enquanto os homens correspondem cerca de 40% a 50% e ainda tem cerca de 10% dos casos de infertilidade que são por condições inexplicáveis, sem causa determinada, chamada de infertilidade idiopática. Com isso, observando os percentuais não há tanta diferença entre os sexos, e o risco pode estar relacionado aos dois (Ferlin; Foresta, 2020).

A infertilidade masculina, objeto desse estudo, pode ser causada por diversas condições como: fatores genéticos, fatores hormonais, infecções (prostatites, uretrites, infecções urinárias), obstrução do canal por onde passam os

espermatozoides e a varicocele, na qual, as veias do testículo possuem uma dilatação anormal (BVS, 2014). Neste estudo, a problemática está direcionada aos casos de infertilidade associada à presença de Varicocele.

Há relatos que correlacionam a infertilidade masculina à varicocele, visto que grande parte dos pacientes diagnosticados com infertilidade apresentam um quadro de varicocele. Porém, não é possível afirmar que quem possui esta patologia necessariamente seja infértil, pois existem duas classificações: Varicocele Infértil (VI) e Varicocele Fértil (VF). Dados na literatura afirmam que 12% da população masculina tem prevalência da varicocele clínica, no entanto, em pacientes com incidência de infertilidade primária (não tem filho e não consegue sucesso gestacional) é entre 30% a 50%, e em pacientes com infertilidade secundária (já teve filho, mas apresenta dificuldade para conseguir uma nova gestação) em até 80%, razão pela qual é pressuposto que os efeitos da varicocele na fertilidade pode ocorrer de forma gradativa (Lindgren, 2018; Krausz, 2018; Macedo e Fonseca, 2015).

Em princípio, investigar a origem ou causa da doença é fundamental para se ter um tratamento assertivo. Isso é feito através de análises clínicas, exame físico e anamnese. Os resultados desses exames são primordiais para o diagnóstico, prognóstico e profilaxia, tendo como principal objetivo fornecer ao médico e ao paciente, todas as informações necessárias, precisas e confiáveis, a fim de possibilitar o procedimento a ser feito, pois, os resultados clínicos auxiliam ao médico na tomada de decisões acerca da terapia a ser realizada (Lima-Oliveira, 2017).

O diagnóstico de varicocele é realizado através do exame físico, quando é necessário atestar que de fato está ocorrendo uma dilatação anormal dos vasos. Quando a varicocele é subclínica, ou seja, quando não apresenta sintomas ou não é possível detectar através dos exames físicos regulares, o paciente é encaminhado para realização da ultrassonografia da bolsa escrotal com doppler para observação da circulação sanguínea na região escrotal e/ou possível alteração. Para o diagnóstico de infertilidade masculina, a propedêutica básica inclui anamnese e exame físico completo, como também a avaliação hormonal e espermograma, sendo este último o exame complementar de maior importância nestes casos. Além disto, podem ser utilizados testes de função do espermatozoide e testes genéticos (ASRM, 2015).

Os exames específicos para avaliação de varicocele associada à infertilidade, devido a sua forma de realização, como no caso do espermograma, é considerado um exame invasivo e que causa constrangimento para quem precisa realizar. Os pacientes diagnosticados com varicocele, geralmente, apresentam alterações clínicas dos padrões hormonais e seminais, que podem afetar a fertilidade. A única alternativa para correção da dilatação anormal das varizes do testículo é através do procedimento cirúrgico chamado Varicocelectomia, que pode ter repercussão (ou não) nos parâmetros seminais do paciente (Neto, 2020).

Surge então uma questão: Como seria possível uma análise rápida e capaz de fornecer uma predição para indicação da cirurgia (ou não) de pacientes que almejam a melhora dos seus padrões seminais com o objetivo de repercutir no fator fertilidade? A Metabonômica é uma estratégia multivariada, rápida, minimamente invasiva (ou não-invasiva) e acurada, capaz de auxiliar os profissionais de saúde na definição de um diagnóstico precoce a partir de estratégias de rotina, como coleta de sangue e/ou urina, visando identificação de perfis metabólicos (Neto, 2022).

Os metabólitos são definidos como pequenas moléculas de baixo peso molecular que são produzidas no decorrer de diferentes processos metabólicos, que podem dispor evidências do estado celular momentâneo, uma vez que indicam a atividade bioquímica atual e direta do organismo. Baseado nisso, sua convergência com os desarranjos celulares pode ser utilizada para fins de diagnóstico (Patti; Yanis; Siuzdak, 2012).

Os biofluidos apresentam um conjunto de metabólitos denominados metaboloma. No estudo dessa natureza, a composição bioquímica dos fluidos demonstra a condição dos metabólitos do indivíduo. Por isso, a percepção acurada da composição e das concentrações dos mesmos pode fornecer aos profissionais de saúde informações importantes quanto à conduta a ser aplicada em relação ao tratamento e/ou acompanhamento das doenças (Silva, 2017).

A estratégia metabonômica pode ser realizada usando a espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN de ^1H), observando as diferenças espectrais e identificando um perfil de metabólitos endógenos associados à doença. Estas estratégias são implementadas processando os dados espectrais com ferramentas de estatística multivariada. Ou seja, associando espectroscopia de

Ressonância Magnética Nuclear de Hidrogênio-1 (RMN de ^1H) com Análise de Componentes Principais (PCA), Análise discriminante por mínimos quadrados parciais (PLS-DA), Projeções Ortogonais para Análise Discriminante de Estruturas Latentes (OPLS-DA), Análise Discriminante Linear (LDA), entre outras.

Trabalhos anteriores desenvolvidos por nosso grupo de pesquisa conseguiram identificar um perfil de metabólitos endógenos presentes no fluido seminal, associando-o à infertilidade masculina, bem como ao prognóstico de melhora dos padrões seminais pós-varicocelectomia. Em ambos, os dados espectrais foram adquiridos a partir do fluido seminal obtidos após centrifugação do sêmen fornecido pelo paciente. Os trabalhos realizados, abordaram sobre diagnóstico de infertilidade em homens com varicocele (Neto *et al.*, 2020) e predição da melhora dos parâmetros seminais (Neto *et al.*, 2022), baseados na metabonômica. Considerando que a forma de coleta de sêmen é invasiva e traz constrangimentos para o paciente, nós nos propomos a fazer estudo semelhante usando amostra de soro sanguíneo.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Metabonômica

As ciências ômicas estão em ascensão nos últimos anos e através delas é possível quantificar e caracterizar espécies em processos bioquímicos, uma vez que são responsáveis por reproduzir um conjunto de dados de qual área esteja sendo estudado, por exemplo: a genômica em relação ao estudo do genoma; a transcriptômica relacionada ao estudo da transcriptoma; a proteômica estuda a proteoma e a metabolômica associada ao estudo do metaboloma. No estudo em questão, está sendo abordada a metabolômica, especificamente, metabonômica (Xu, 2023).

Metabolômica e Metabonômica são termos utilizados frequentemente como sinônimos, e isso pode gerar dúvida entre aqueles que intencionam se aprofundar nestes estudos, por isso, é necessário pontuar que apresentam diferenças filosóficas com impacto metodológico. A metabonômica foi proposta em 1999 pelos pesquisadores da Faculdade de Medicina da Imperial College London, Jeremy Nicholson, Elaine Holmes e John Lindon, sendo definida como: “A medição quantitativa da resposta metabólica multiparamétrica dinâmica de sistemas vivos a estímulos fisiopatológicos ou modificação genética” (Nicholson *et al.* 1999). A referência da palavra surgiu do termo grego: “meta” que significa alteração e “nomos” que representa regras ou leis em alusão aos modelos quimiométricos eficientes na classificação das mudanças no metabolismo (Lindon, *et al.* 2004).

A metabolômica é um termo utilizado como parte da teoria do controle metabólico e análise de fluxo. Em 2001, Fiehn definiu-a com o objetivo de identificar e quantificar todos os metabólitos envolvidos no sistema biológico, que diferenciem processos ou condições características das alterações em níveis metabólicos com relação ao fenótipo, ou seja, que as quantificações dos mesmos poderiam ser aplicadas com a finalidade de padronização do sistema biológico. Uma vez que tal análise revela o metaboloma do sistema biológico em estudo, essa abordagem seria chamada de metabolômica (Fiehn, 2001; 2002).

De forma geral, a metabonômica visa a identificação de uma impressão digital associada a uma perturbação por agentes externos no sistema vivo e, através disso,

investiga-se quais metabólitos endógenos estão envolvidos; enquanto a metabolômica está relacionada com a identificação e quantificação de todos os metabólitos de um sistema, investigando mudanças que sejam associadas a uma perturbação externa.

Na abordagem metabolômica, por se tratar de uma técnica que envolve a quantificação absoluta de metabólitos, é necessário a utilização dos procedimentos analíticos de separação de misturas e de técnicas espectrométricas sensíveis, como a espectrometria de massas. Assim, é comum o uso de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência acoplada à Espectrometria de Massas (CLAE-EM) e Cromatografia em fase Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (CG-EM) em estudos metabolômicos. Por outro lado, para a estratégia metabonômica, não há esta necessidade de separação prévia, podendo ser descartada as ferramentas de separação de misturas, sendo empregada a Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear (RMN), que é uma ferramenta espectrométrica de forma direta e com alta reprodutibilidade (Canuto, 2018).

No contexto histórico, a técnica analítica utilizada ficou atribuída em relação aos trabalhos executados na época, por exemplo: a Espectroscopia de Massas era muito utilizada por pesquisadores da metabolômica que trabalhavam com plantas, enquanto na metabonômica os pesquisadores utilizavam Ressonância Magnética Nuclear em seus estudos. Então, ficou comum esta correlação. Todavia, frequentemente os termos são usados como sinônimos (Da Costa, 2020).

A utilização da espectroscopia de RMN ficou muito bem estruturada na metabonômica e isso tornou uma técnica considerada importante em estudos de diagnósticos clínicos por se tratar de uma técnica versátil, reprodutível e capaz de extrair informações importante para a investigação de interesse. Na extração das informações, muitos dados são obtidos, sendo necessária a aplicação de técnicas quimiométricas para o tratamento desses dados, pois são capazes de identificar padrões e classificar as amostras (Batista, 2017).

Foram definidas as etapas para um projeto metabonômico devidamente planejado e executado, desde as etapas prévias dos experimentos até os resultados. Distribuídas como: Obtenção de amostras de materiais de humanos, animais ou plantas, de testes clínicos, e microrganismos; preparação de amostras, através do

procedimento de diluição do biofluido em solvente deuterado, como também através da precipitação de proteínas, extração de tecidos, esta etapa depende da amostra utilizada; análise de RMN, ou seja, a aquisição experimentais dos espectros de RMN; processamento e tratamento dos espectros obtidos, em seguida a transformação dos espectros em matriz de dados; pré-processamento da matriz de dados através da normalização das amostras e variáveis, de acordo com a necessidade de cada conjunto de dados. Em seguida, são realizadas as análises estatísticas multivariadas para identificar os padrões relacionados aos metabólitos, classificar de acordo com os grupos estudados e identificar as regiões dos espectros responsáveis pelas diferenças. A identificação de metabólitos é obtida por meio dos sinais (variáveis) importantes indicados pela análise estatística para a discriminação dos grupos estudados (Dona, *et al.*, 2016).

A estratégia metabonômica por RMN pode ser aplicada em diversas condições clínicas, utilizando diferentes biofluidos. Por exemplo: diagnóstico de carcinoma em células renais (Zira, 2010); diagnóstico de Mal de Parkinson (Ohman, 2015); doenças hepáticas (Yu, 2017); infertilidade masculina (Neto, 2022). Para além das aplicações clínicas, podemos citar estudos na Agricultura: avaliação metabonômica baseada em RMN de ^1H dos pesticidas camptotecina e matriona contra larvas de *Spodoptera litura* (Dai, 2021); Isoflavonas preniladas relacionadas à defesa potencial em soja induzida por lactofen (Cheng, 2011). Diferentes amostras podem ser utilizadas, como urina, plasma, soro, extratos de tecidos e fezes, por exemplo (Beckonert *et al.*, 2007; Santiago *et al.*, 2019)

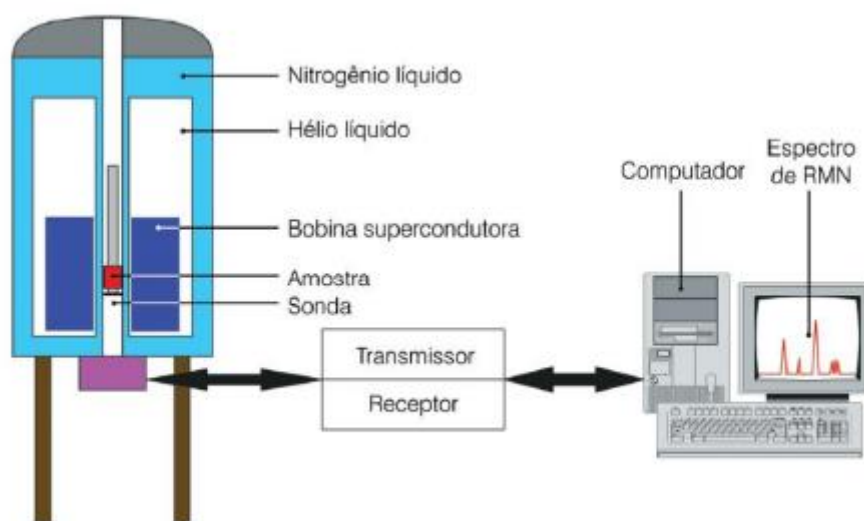
Para compreensão da estratégia metabonômica e do estudo aqui desenvolvido, nas próximas sessões serão descritos os princípios da espectroscopia de ressonância magnética nuclear, o tratamento de dados espectrais através da Quimiometria, assim como, a patologia envolvida neste estudo.

2.2 Espectroscopia de Ressonância Magnética Nuclear

2.2.1 Princípios Básicos da RMN

Esta técnica foi descoberta em 1946 por Purcell e Bloch e é considerada uma técnica espectroscópica, pois baseia-se na interação entre a radiação eletromagnética e a matéria (Emwas, 2015) que propicia, na presença de um campo magnético, a distribuição dos spins nucleares em níveis de energia distintos. Nesta interação, quando um pulso de radiofrequência (RF) é aplicado, ocorre a promoção de spins nucleares que estão no estado de menor energia para o estado de maior de energia (Silverstein *et al.*, 2005). Na Figura 1 está representada a composição de um espectrômetro de RMN. O material a ser analisado é colocado dentro de uma sonda do equipamento, que está localizada no centro da bobina supercondutora. Os sinais de RMN são captados e processados em um computador central, ligado ao equipamento.

Figura 1- Equipamento de Ressonância Magnética Nuclear e seus componentes.



Fonte: COLNAGO (2002).

Quando o pulso de radiofrequência é desligado, o sistema retorna à condição inicial, com emissão de energia cuja frequência depende da diferença de energia entre os estados de spin nuclear. Esses sinais são detectados pelo espectrômetro de RMN e são apresentados como um registro da frequência do sinal *versus* a intensidade do sinal (Batista *et al.*, 2018; Kokova; Mayboroda, 2019).

A espectroscopia de ressonância magnética nuclear tem como definição um fenômeno físico, no qual os núcleos atômicos emitem sinais que são captados e

processados quando eles estão sujeitos a um campo magnético externo B_0 e um campo magnético oscilante B_1 . Os núcleos atômicos possuem um momento angular e um momento magnético, a razão entre o momento magnético e o momento angular resulta numa constante característica de cada núcleo, denominada de constante magnetogírica (γ). Na presença de um campo magnético, a interação entre o momento magnético do núcleo e campo magnético externo, promove a quebra da degenerescência dos estados de spins. (Levitt, 2010). Matematicamente, podemos relacionar o momento magnético (μ) do núcleo com seu momento angular, denominado de spin nuclear (I), conforme equação 1 (Oliveira; Abiko; Salinas, 2017; Mlynárik, 2017).

$$\mu = \frac{h\gamma I}{2\pi} \quad (1)$$

sendo h a contante de Planck.

A equação 1 indica que o momento magnético nuclear (μ) é proporcional ao momento angular de spin (I). A constante de proporcionalidade (γ) entre o momento magnético nuclear e o momento angular de spin é chamado de razão magnetogírica que é considerada uma das grandezas elementares em RMN, pois quanto maior for a razão magnetogírica de um núcleo, maior será o seu momento magnético (Oliveira; Abiko; Salinas, 2017).

Existem $(2I+1)$ estados de spin possíveis com diferenças inteiras que acontece de $+I$ até $-I$. Neste caso, quando I for igual a zero, apenas um estado é permitido, então não é possível tratar como espectroscopia. Quando $I = \frac{1}{2}$, há dois estados possíveis, denominados por α e β , sendo que um desses estados está paralelo ao campo magnético B_0 e o outro tem uma orientação antiparalela em relação ao campo magnético B_0 . Esses estados possuem energias distintas, sendo que o de menor energia é o que está paralelo ao campo magnético externo B_0 (Mlynárik, 2017). Na Tabela 1, são apresentados alguns núcleos importantes que estudados por RMN, com suas propriedades espectroscópicas relevantes.

Núcleo	^1H	^2H	^{13}C	^{14}N	^{15}N	^{19}F	^{31}P	^{23}Na
I	1/2	1	1/2	1	1/2	1/2	1/2	3/2
Abundância Isotópica	99,9%	0,015%	1,108%	99,73	0,37%	100%	100%	100%
$\gamma(\text{rad.T}^{-1})$	267,53	41,1	67,28	19,3	-27,126	251,7	108,3	70,808

Fonte: Adaptado de Pavia; Lampman; Kriz (2001); Veeman (1997).

De modo geral, a diferença de energia entre os estados de spin depende do campo magnético externo aplicado (B_0), conforme a equação 2.

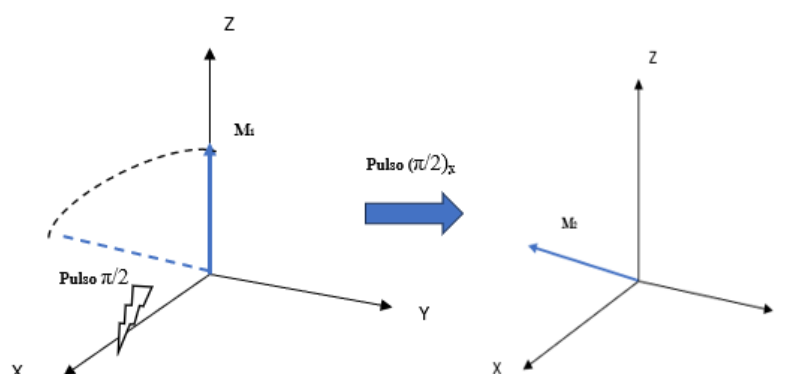
$$\Delta E = f(B_0) \quad (2)$$

Quanto mais forte for o campo magnético aplicado, maior será a diferença de energia entre os estados de spin possíveis. Quando relacionamos a diferença de energia e a constante magnetogírica, temos a equação fundamental da RMN (equação 3), onde ν é a frequência de Larmor.

$$\Delta E = \gamma \frac{h}{2\pi} B_0 = h\nu \quad \nu = \frac{\gamma}{2\pi} B_0 \quad (3)$$

No experimento de RMN, os pulsos de radiofrequência são aplicados no plano xy, fazendo com que o vetor magnetização no eixo z rotacione para o plano xy (Figura 2) (Mlynárik, 2017).

Figura 2- Vetor magnetização M após o pulso de $(\pi/2)_x$

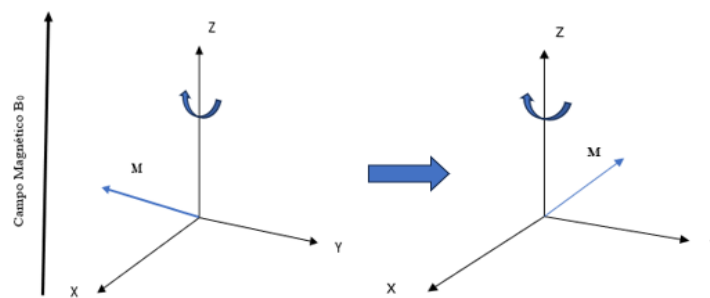


Fonte: Adaptado de Costa (2020).

O vetor magnetização M pode ser decomposto numa componente no plano xy e outra componente no eixo z. A componente no plano xy é chamada de magnetização transversal. Esta magnetização rotaciona no plano xy com a frequência de Larmor (Figura 3). Na aquisição do sinal, o campo magnético oscilante, B_1 , com a frequência ω_0 , é aplicado perpendicularmente a B_0 e na forma de um pulso faz com que a

magnetização M_0 , que estava originalmente na direção do campo B_0 (eixo z), rotacione um ângulo θ , equivalente à duração do pulso (pw) e à intensidade do campo B_1 . Este pulso aplicado proporciona a magnetização no plano xy (Silverstein, 2005; Colnago, 2017).

Figura 3- Vetor magnetização transversal



Fonte: Adaptado de Costa (2020).

Após a aplicação do pulso, a magnetização no plano xy precessiona gerando o sinal elétrico. No entanto, com o tempo, a intensidade do vetor no plano xy vai diminuindo e a indução acompanha esse decaimento, denominado de decaimento livre de indução (do inglês, *free induction decay*). Quando o pulso de RF é desligado, os spins retornam à condição de equilíbrio no eixo z com o passar do tempo, que é a condição antes de sofrer o impacto do pulso aplicado. Esse processo é chamado de relaxação. Considerando um pulso de RF de 90° , o tempo que a componente no eixo z retorna à condição inicial é chamado de tempo de relaxação longitudinal (T_1), enquanto o tempo necessário para a componente no plano xy voltar a 0 (zero) é chamado de tempo de relaxação transversal (T_2) (Levitt, 2013; Colnago, 2017).

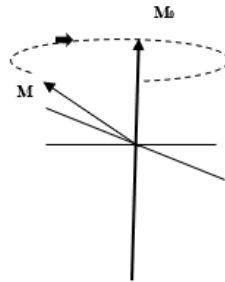
2.2.2 Relaxação Longitudinal (T_1)

O período em que o vetor magnetização da componente z é restaurado para que tenha a mesma condição de antes de sofrer a perturbação do pulso de RF de 90° , ou seja, o tempo necessário para que os spins se distribuam nos dois estados de energia, retornando à condição de equilíbrio, fazendo com que o vetor na direção do campo tenha a mesma intensidade, é chamado de tempo de relaxação longitudinal (T_1) (Colnago, 2017).

A relaxação longitudinal envolve a troca de energia entre os spins nucleares “excitados” e o meio circundante (rede), os que estão com a frequência apropriada, por isso é chamado também spin-rede ou T_1 . O retorno dos spins ao equilíbrio inicial

é através da perda de energia absorvida durante a excitação (De Almeida, 2014). Na Figura 4, é apresentado o aumento da intensidade da componente z, retornando à condição inicial, pelo processo de relaxação longitudinal.

Figura 4- Relaxação longitudinal (T_1) da componente M_z para M_0

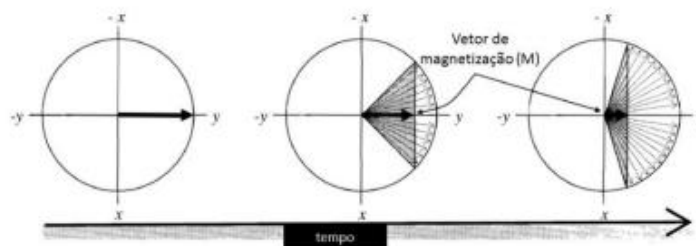


Fonte: Autoria própria.

2.2.3 Relaxação Transversal (T_2)

O decaimento da intensidade do vetor magnetização no plano xy está relacionada à perda de coerência dos componentes x e y, pois os spins não conseguem se manter em sincronismo e a posição relativa entre eles vai se movendo. Esse processo é chamado de relaxação transversal. O vetor magnetização em x e y oscila como uma função senoide com a frequência de Larmor e intensidade decai em função do tempo (Figura 5) (Colnago, 2017).

Figura 5- Relaxação transversal (T_2) com a magnetização no plano xy



Fonte: Gouveia (2017).

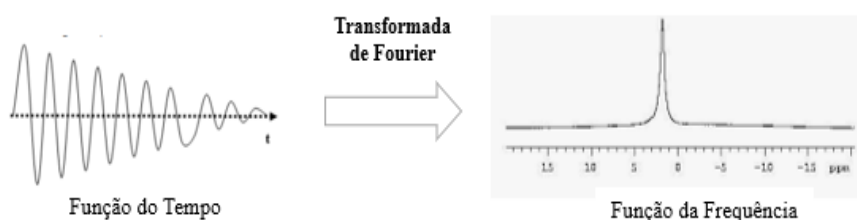
A relaxação transversal é a responsável pelo decaimento da componente M_0 no plano xy. Esta ocorre paralelamente à relaxação longitudinal e gera o processo de perda de coerência entre os núcleos que estão precessando, causando defasagem, alargamento dos picos e perda de sinal (De Almeida, 2014). De modo geral, a soma vetorial dos componentes x e y diminuem até atingir o zero, enquanto a componente

z está aumentando até retornar à intensidade inicial, sendo que ambos em tempos distintos. Para espécies de baixa massa, T_1 e T_2 tendem a valores similares. Entretanto, para espécies mais volumosas ou em sistemas mais viscosos, a relaxação transversal (T_2) tende a ter valores menores que aqueles observados para a relaxação longitudinal (T_1) (Silverstein, 2005).

2.2.4 FID

Após aplicação de um pulso de RF, o vetor magnetização passa a ter uma componente diferente de zero, no plano xy, produzindo uma corrente elétrica oscilante, por indução, em uma bobina. Os spins nucleares em uma amostra são detectados utilizando o decaimento livre da indução (FID). Esta corrente, induzida pela precessão da magnetização transversal, é detectada por um sensor de radiofrequência (Vinhai, 2019). O decaimento da indução é apresentado em uma escala em função do tempo. Para a visualização dos componentes individuais do sinal é necessário aplicar a transformada de Fourier que faz a conversão do sinal em função dependente do tempo (FID), para o sinal em função dependente da frequência (Figura 6). Ou seja, o sinal é decomposto em diferentes frequências que o constitui, sendo obtido o espectro (Forezi, 2017).

Figura 6- Transformada de Fourier para conversão do FID em espectro



Fonte: Adaptado de Gouveia (2017).

No espectro obtido, a frequência de cada núcleo é diferente da frequência de Larmor, pois os núcleos sentem o campo magnético diferente devido a presença da nuvem eletrônica. Isto acontece porque cada núcleo apresenta uma frequência relacionado ao seu ambiente químico, que fornecem informações sobre as estruturas químicas. Assim sendo, os núcleos inseridos em ambientes químicos diferentes apresentam deslocamento químico diferente, da mesma forma ocorre com os núcleos que apresentam o mesmo ambiente químico, consequentemente tem o mesmo deslocamento químico (Silverstein, 2005; Colnago, 2017).

A frequência depende do campo aplicado, então para ser indicado a posição do núcleo no espectro, teria a necessidade de informar o campo magnético em que o espectro foi adquirido. Como forma de resolução, foi criada uma escala de referência que não depende do campo, chamada de deslocamento químico (δ). Esta escala é determinada através da razão entre a diferença das frequências do núcleo ν_A e de um sinal de referência ν_R , pela frequência do sinal de referência. (equação 4) (Da Costa, 2020).

$$\delta = \frac{\nu - \nu_{Ref}}{\nu_{Ref}} \times 10^6 \quad (4)$$

Portanto, o deslocamento químico (δ) é adimensional. O fator 10^6 observado na equação 4 é utilizado porque a diferença entre as frequências ($\nu_A - \nu_{Ref}$) é da ordem de hertz (Hz), enquanto a frequência de ressonância é da ordem de megahertz (MHz). Assim, o deslocamento químico (δ) é expresso em ppm (partes por milhão). (Gouveia, 2017).

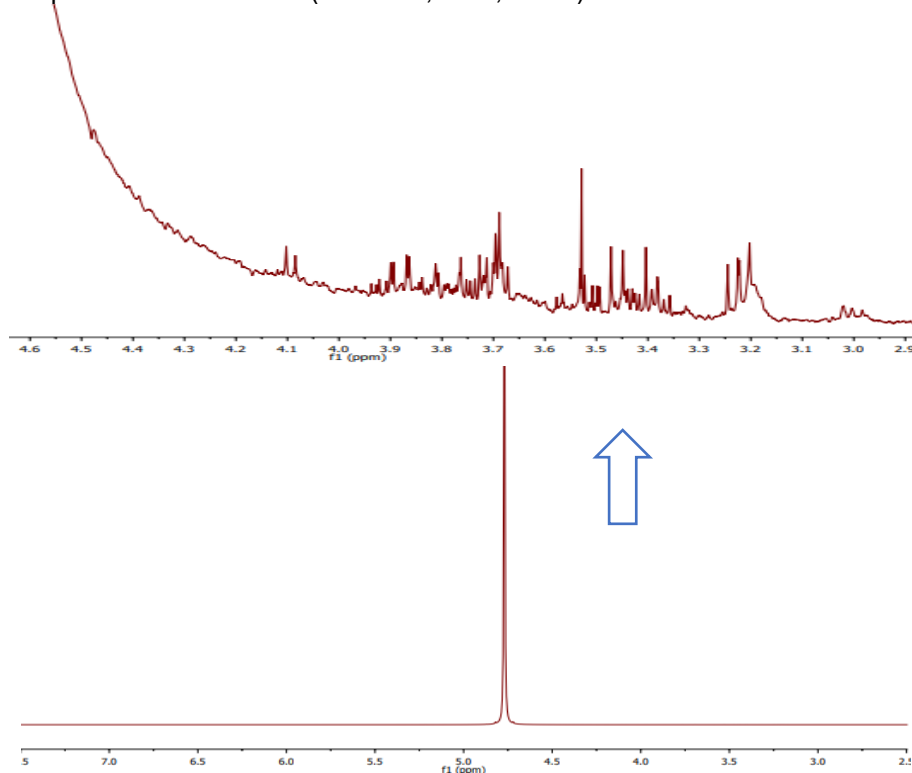
O sinal de referência comumente utilizado na espectroscopia de RMN de ^1H , é o das metilas do tetrametilsilano (TMS), que é um simpleto mais blindado que os sinais da maioria dos compostos orgânicos, sendo atribuído δ 0 ppm. A escala do deslocamento químico aumenta da direita para esquerda, no espectro (De Almeida, 2014).

A utilização da espectroscopia de RMN de ^1H em estudos metabonômicos está bem consolidada, por ser um procedimento rápido, não-destrutivo e que necessita de intervenções mínimas em relação ao preparo da amostra (Canuto, 2018). Os primeiros estudos com aplicação biológica da espectroscopia de RMN, ocorreu na década de 1950, com o objetivo de estudar as propriedades de hidratação do ácido desoxirribonucleico (DNA) (Jacobson; Anderson; Arnold, 1954). Com os avanços metabonômicos, já se utilizam associadas de técnicas analíticas modernas, capazes de detectar concomitantemente variados compostos, e fornecer uma modelagem multivariada que surge como uma fonte alternativa à experimentação bioquímica convencional (Kostidis *et al.*, 2017).

Nas amostras de biofluidos, a água é o constituinte mais abundante e, portanto, é o sinal mais intenso e sobressai, dificultando a visualização dos sinais menores e

na expansão do espectro é visto alguns sinais de baixa intensidade. A Figura 7 mostra um espectro de RMN de ^1H de um biofluido (soro), mostrando apenas o sinal. A ampliação mostra os outros sinais com intensidades reduzidas.

Figura 7- Espectro de RMN de ^1H (400 MHz, D $_2\text{O}$, 27 °C) de uma amostra de soro de paciente



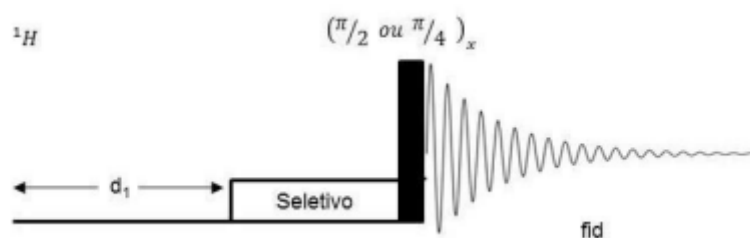
Fonte: Autoria própria.

Para que possamos observar os demais componentes do biofluido, é necessário realizar experimentos para suprimir o sinal da água. Para este fim, neste trabalho, nós utilizamos a sequência de pulsos PRESAT.

2.3 Sequências de pulsos: PRESAT e CPMG

O PRESAT é utilizado em amostras aquosas ou aquelas que possuem o sinal do solvente intenso, que dificulte a observação dos sinais de interesse. Consiste na aplicação de um pulso de baixa potência para saturar seletivamente uma frequência pré-determinada, normalmente a frequência atribuída ao sinal da água, e outro pulso não seletivo de 45° ou 90° , promovendo a transição entre os estados de spin. Por consequência, a intensidade do sinal da água é reduzida, possibilitando a visualização dos sinais de interesse (Gouveia, 2017). Antes da aplicação dos pulsos de RF, o equilíbrio precisa ser reestabelecido. Para tal, utiliza-se um tempo de espera (delay), chamado d1 (Figura 8).

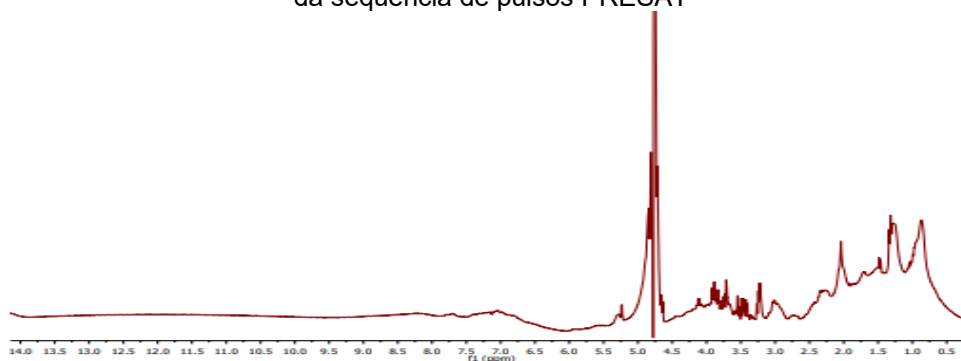
Figura 8- Ilustração da sequência de pulsos de RF utilizada para supressão do sinal da água



Fonte: Gouveia (2017).

Com a pré-saturação do sinal da água, é possível observar os sinais de metabólitos, que não são observados com a sequência de pulsos convencional. A Figura 9 apresenta um espectro de RMN de ^1H de soro, usando a sequência Presat, onde os sinais atribuídos aos metabólitos presentes no biofluidos são observados.

Figura 9- Espectro de RMN de ^1H (400MHz, D $_2$ O, 27°C) de uma amostra de soro adquirida a partir da sequência de pulsos PRESAT



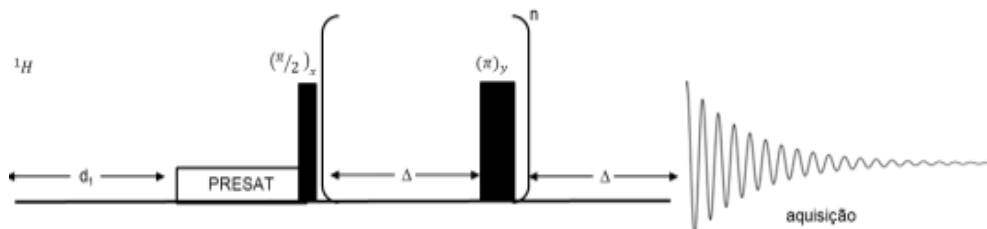
Fonte: Autoria Própria.

No espectro obtido usando PRESAT, é visto sinais largos provenientes de espécies com alta massa molar, como por exemplo, proteínas e lipídios. Os sinais alargados, que apresentam o T_2 curto, sobrepõem sinais de baixa intensidade dificultando a visualização desses sinais. Para solucionar este problema, realizamos um experimento utilizando o filtro de T_2 , denominado CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-Gill).

A sequência de pulsos CPMG tem o propósito de eliminar os sinais alargados provenientes de moléculas mais pesadas que apresentam o tempo de relaxação transversal (T_2) curto. É utilizada como filtro T_2 , consistindo na aplicação de um pulso de 90° no plano xy e consecutivos pulsos de 180° entre intervalos de tempo τ , até que os spins com valores menores de T_2 tenham relaxado, e consequentemente ocorra a aquisição do espectro envolvendo apenas as ressonâncias de interesse. O tempo τ deve ser maior que o T_2 das espécies que se pretende eliminar (filtrar) e menor que o

T_2 das espécies que se pretende observar, no espectro (Crook, 2020). Na Figura 10, é apresentada a sequência de pulsos PRESAT e CPMG.

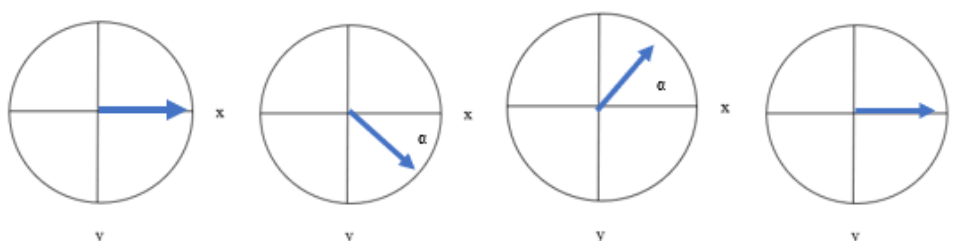
Figura 10- Sequência de pulsos PRESAT e CPMG



Fonte: Costa (2016).

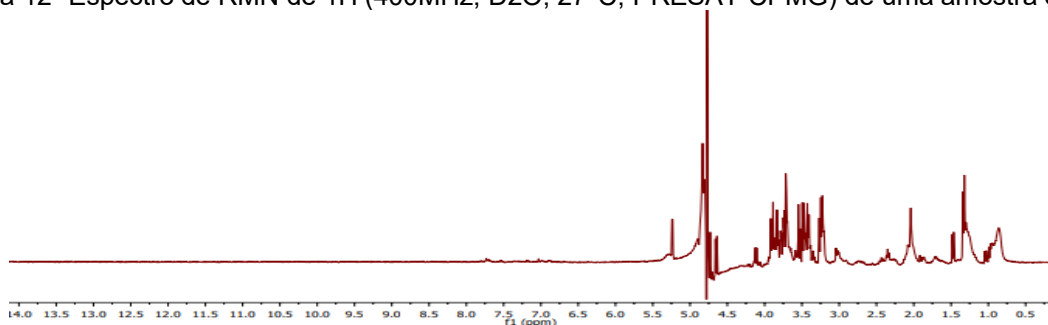
Nesta sequência de pulso, é produzido um FID após o primeiro pulso de 90° , cujo decaimento é determinado pelo tempo de relaxação transversal (T_2). O pulso de 180° , após o tempo τ , refocaliza a magnetização (Figura 11), pois durante o tempo τ os spins precessam e a magnetização rotaciona no ângulo α e com o pulso, a magnetização inverte em relação ao eixo e no segundo tempo τ , a magnetização gira no mesmo ângulo e sentido, voltando a posição inicial, gerando um sinal (eco) a um tempo τ do segundo pulso (Figura 12). O eco nessa sequência está defasado de 180° do FID. Normalmente se usa o sinal no modo magnitude, e o decaimento do eco em função de T_2 . (Colnago, 2017).

Figura 11- Magnetização no plano xy durante a refocagem



Fonte: Adaptado de Costa (2016).

Figura 12- Espectro de RMN de 1H (400MHz, D₂O, 27°C, PRESAT-CPMG) de uma amostra de soro



Fonte: Autoria Própria.

Outras sequências de pulsos podem ser utilizadas para supressão do sinal da água, como WATERGATE (*Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR*); e para minimizar a presença de sinais alargados no espectro de ressonância devido ao baixo T_2 e difusão rotacional limitada de macromoléculas, como a *1D nuclear Overhauser effect spectroscopy com pré-saturação* (1D NOESY-presat) (Pilon, 2020).

2.3.1 Processamento dos espectros, construção da matriz e pré-processamentos dos dados

Após as aquisições espectrais para construção da matriz, algumas etapas são muito importantes de serem realizadas, como o processamento dos espectros, que realizamos através do *software* MestRenova e o pré-processamento desses dados na matriz.

No processamento dos espectros, utiliza-se o *line broadening*, que é da ordem de 0,3 Hz, para minimizar o ruído; e o *binning*, que consiste em dividir o espectro em janelas/regiões de mesma largura (em ppm), considerando as áreas de integração abaixo do espectro, que são denominadas de bins. Desta forma, outras informações sistemáticas indesejáveis podem ser corrigidas com ajustes de linha de base e normalização das variáveis no espectro, por exemplo (Ferreira, 2015; Engelsen *et al.*, 2013).

Por fim, uma matriz de dados é construída, de tal forma que cada linha corresponde a uma amostra, os casos clínicos, enquanto as colunas são as variáveis, as áreas de integração de cada bin. Nas modelagens quimiométricas, é necessária a etapa de pré-processamento dos dados, a fim de reduzir as variações indesejadas que podem influenciar no resultado (Blaise, 2021; Ferreira, 2015).

No pré-processamento dos dados, são aplicadas equações para normalizar os dados nas amostras e nas variáveis. A escolha de qual pré-processamento aplicar depende da técnica de análise e amostra. Esta etapa contribui para minimizar interferências que possam ocorrer na análise. Além disso, também pode estar presentes informações sistemáticas que não estejam correlacionadas ao objeto de estudo e que devem ser eliminadas.

No estudo em questão, as amostras utilizadas foram soro de sangue, sendo provável que tenha diferenças de diluição entre as amostras. Há alguns tipos de pré-

processamentos para permitir a comparação dos dados, impedindo que as amostras mais concentradas sejam mais importantes do que outras. Os pré-processamentos utilizados nas amostras (casos) que foram aplicadas neste trabalho são: normalização por soma e *Standard Normal Variate* (SNV).

A normalização pela soma ocorre quando cada bin é dividido pela soma de todos os bins da amostra, conforme mostra a equação 5.

$$X'_{IJ} = \frac{x_{ij}}{\sum_{j=1}^J |x_{ij}|} \quad (5)$$

Temos que x'_{ij} é o valor obtido após a normalização, x_{ij} é o valor da amostra i na variável j , e $|x_{ij}|$ é o módulo do valor da amostra i na variável j (Ferreira, 2015).

A aplicação dessa normalização permite que seja retirada a informação da distância de cada amostra a origem dos dados, preservando a direção, ou seja, igualando a magnitude de cada amostra. O objetivo é manter a informação que diferencie qualitativamente uma amostra da outra e remover toda a informação que poderia discriminar duas amostras de composição idêntica, mas com concentrações diferentes (Ferreira, 2015).

No caso do pré-processamento SNV, é subtraído do valor da amostra em cada variável ao valor da média de todos os valores da amostra em todas as variáveis, dividindo pelo desvio-padrão, conforme a Equação 6.

$$X_{ij \text{ snv}} = \frac{X_{ij} - \bar{x}_i}{s_i} \quad (6)$$

Temos, $x_{ij \text{ snv}}$ é o valor obtido após o SNV, $\bar{x}_i$ é o valor médio dos bins de cada amostra e s_i é o desvio padrão dos bins de cada amostra, conforme as Equações 7 e 8 (Ferreira, 2015).

$$X = \frac{1}{J} \sum_{j=1}^J X_{ij} \quad (7)$$

$$s_i = \sqrt{\sum_{j=1}^J (X_{ij} - \bar{X}_i)^2} \quad (8)$$

Em relação ao pré-processamento nas variáveis, foram utilizadas a centralização na média e o autoescalamento, para que as diferenças entre as amostras não influenciem na construção do modelo.

Para centralização dos dados na média, é calculado o valor médio de cada coluna da matriz de dados e, a seguir, esse valor é subtraído de cada um dos valores da coluna (Equação 9).

$$X_{ij(cm)} = X_{ij} - \overline{X}_j \quad (9)$$

Temos: $x_{ij(cm)}$ é o valor obtido após a centralização dos dados na média, e $\overline{x}_j$ é o valor médio dos bins de cada coluna, conforme Equação 10 (Ferreira, 2015).

$$\overline{X}_j = \frac{1}{I} \sum_{i=1}^I X_{ij} \quad (10)$$

O autoescalamento está relacionado na subtração de cada valor de uma coluna ao valor médio da coluna e dividir o resultado pelo desvio-padrão dessa respectiva coluna (Equação 11).

$$X_{ij(a)} = \frac{X_{ij} - \overline{X}_j}{s_j} \quad (11)$$

Temos: $x_{ij(a)}$ é o valor obtido após o autoescalamento, e s_j é o desvio padrão dos bins de cada coluna (Ferreira 2015).

Neste trabalho, como as informações que são obtidas através do espectro de RMN são dados multivariados, requer a utilização de tratamentos quimiométricos para extrair elementos acerca da perturbação sofrida no estudo, fornecendo a impressão digital do *status* bioquímico. Após esses pré-processamentos, a planilha matriz dos dados é direcionada para a construção dos modelos metabonômicos. A seguir, serão apresentadas as análises utilizadas na construção deste estudo.

2.4 Quimiometria

A Quimiometria é uma área relacionada com a aplicação de métodos estatísticos e matemáticos a dados químicos. Esse campo surgiu para suprir a necessidade dos métodos convencionais em relação aos desenvolvimentos dos dados químicos analíticos, através dos processos e instrumentação química. Utiliza-se das ferramentas matemáticas e estatísticas para planejar e selecionar condições experimentais ou extrair o máximo de informações significativas através dos dados analíticos (Lavine; Workman, 2012). De modo geral, é uma área de conhecimento que, utilizando dados estatísticos, possibilita a extração de informações químicas, sendo dividida em três subáreas: Planejamento de experimentos; calibração multivariada; e

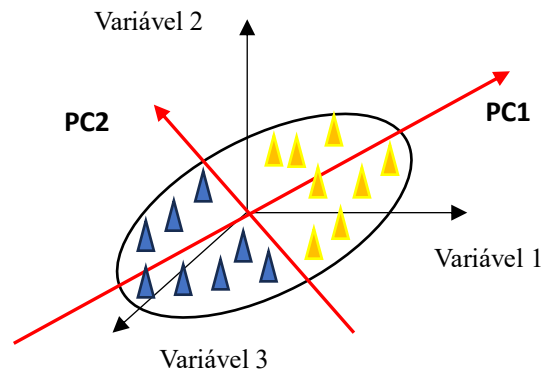
reconhecimento de padrões (Ferreira, 2015). No estudo em questão, foram elaborados dados quimiométricos através dos reconhecimentos de padrões.

O reconhecimento de padrões é utilizado em estudos metabonômicos com o objetivo de obter informações de dados complexos, como em casos de RMN, permitindo a identificação de padrões, o que não seria possível apenas com a inspeção visual do espectro. Ou seja, identificar os padrões associados ao *status* bioquímico da amostra analisada (Ferreira, 2015). Esses métodos são classificados como *não-supervisionados*, que não utilizam a informação dos grupos das amostras na construção do modelo, pois tem como objetivo alcançar padrões naturais de agrupamento; e *supervisionados*, que utilizam a informação de classe das amostras para construção dos modelos, visando prever a classe de uma amostra desconhecida.

2.4.1 Análise de Componentes Principais (PCA)

A análise de componentes principais (do inglês, *Principal Component Analysis*) consiste em uma análise exploratória, não supervisionada, sendo normalmente a primeira etapa na análise dos dados e a base para outros métodos de reconhecimento de padrões e classificação, pois através dela é possível observar se há agrupamento natural nas classes de interesse (Chanana, 2020). O propósito da PCA é reduzir a dimensionalidade do conjunto de dados, investigar a existência de *outliers* (amostras anômalas) e transformar as variáveis originais em um novo grupo de variáveis não correlacionadas, conhecidas como Componente Principal (PC). Essas novas variáveis são eixos ortogonais que correspondem às direções de maior variância dos dados, como podemos observar na Figura 13, a ilustração de um grupo hipotético (Gromski *et al.*, 2015).

Figura 13- Rotação das variáveis originais para obtenção das componentes principais. PC 1 e 2 são as componentes principais



Autoria própria, adaptada de Gouveia (2017).

A primeira componente (PC1) explica a maior variância dos dados, enquanto a segunda componente (PC2), que não tem relação com a primeira, explica o máximo de variância residual, e assim consecutivamente até que todas as variâncias dos dados sejam explicadas. Cada componente principal se relaciona com as amostras, através do escore, e com as variáveis originais, através dos pesos (Gromski *et al.*, 2015).

A PCA possibilita verificar a estrutura dos dados e encontrar padrão entre as amostras, por meio da observação da tendência de agrupamentos das amostras, assim como, detectar possíveis *outliers* que estão fora do padrão apresentado pela maioria das amostras. Em relação a essas amostras anômalas, se de fato for constatado ao ser avaliado os pesos, a distância da amostra para o modelo, é interessante que seja excluída, uma vez que está influenciando na construção da componente principal. Mas, é importante também identificar a causa da anomalia, pois pode ser um viés a ser evitado e explicado. As componentes principais são construídas de forma decrescente de explicação da variância do conjunto de dados. Ou seja, as primeiras componentes sempre terão as variâncias explicadas com a maior parte significativa de informações (Chanana, 2020). Na Figura 14, está representado um exemplo de resultados de uma PCA, com os gráficos de escores e pesos.

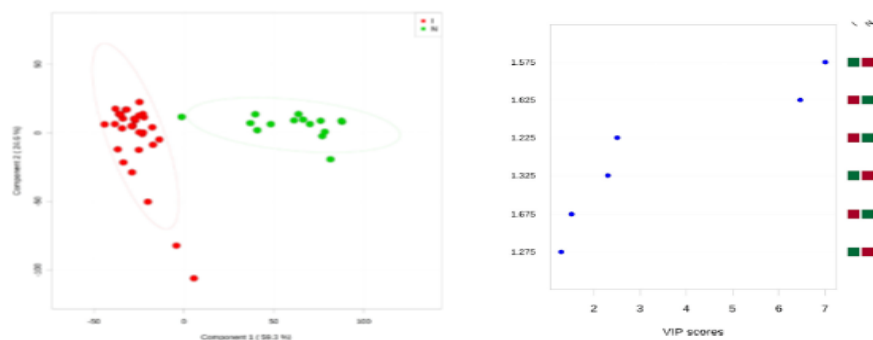
Figura 15- Ilustração da matriz X e Y para um conjunto de amostras classificadas como A e B

		X	Y		
		Variáveis	Classes		
casos	1	X ₁₁ X ₁₂ X ₁₃ X _n	1	0	Classe A
	2	X ₂₁ ...	1	0	
	3	X ₃₁ X ₃₃	1	0	
	4	X ₄₁ ...	0	1	Classe B
	p	X _{p1} ... X _{p33} X _{pn}	0	1	

Fonte: Adaptado de Gouveia (2017).

Assim como a PCA, a PLS-DA também constrói componentes (combinação lineares das variáveis originais) que buscam explicar a variância contida no conjunto de dados, nesse caso, na matriz Y (classe das amostras). Essas combinações lineares são denominadas de variáveis latentes e são ortogonais entre si. (Brereton & Lloyd, 2014). A PLS-DA possibilita a avaliação de dados altamente correlacionados e a extração de parâmetros estatísticos (figuras de mérito), que avaliam a qualidade da modelagem, bem como a importância de cada variável para modelagem. Nesse sentido, é possível projetar as amostras no novo sistema de coordenadas definido pelas variáveis latentes facilitando a visualização das classes de interesse. De outro lado, é possível usar o gráfico de escores VIP para identificar as variáveis mais importantes e como ela varia nos grupos investigados (Gromski *et al.*, 2015; Worley & Powers, 2015). A Figura 16 apresenta um exemplo de PLS-DA, com os gráficos de escores e VIP escores, permitindo identificar as variáveis mais importantes para a classificação dos grupos.

Figura 16- Representação gráfica da PLS-DA. À esquerda, o gráfico de escores; à direita, o VIP escore



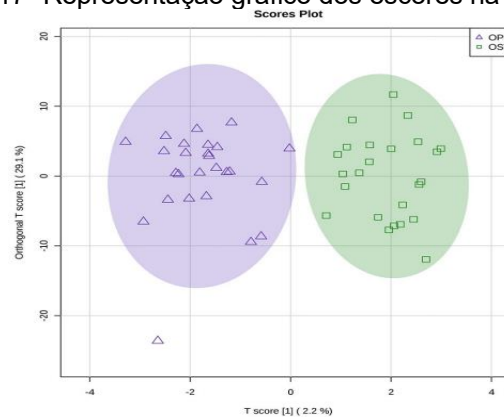
Fonte: RIBEIRO *et al.*, (2014).

Ao analisar a matriz de pesos, é possível identificar as variáveis importantes para a discriminação dos grupos. Nos estudos metabonômicos, essas variáveis indicam regiões espectrais que são mais ou menos intensas, em função das classes das amostras, caracterizando metabólitos que estejam presentes em concentrações distintas e que estejam relacionadas ao objeto de estudo.

2.4.3 Projeções Ortogonais para Análise Discriminante de Estruturas Latentes (OPLS-DA)

O formalismo OPLS-DA (do inglês, *Orthogonal Projections to Latent Structures Discriminant Analysis*) é uma técnica supervisionada, considerada uma variação da PLS-DA, na qual as variações de X (matriz das variáveis independentes) não relacionadas a Y (classes) são reunidas em um novo subespaço ortogonal às variáveis correlacionadas com Y (ENGELSEN *et al.*, 2013). Os desempenhos para classificação e predição de ambos, PLS-DA e OPLS-DA, são análogos. Todavia, o OPLS-DA fornece uma melhor visualização, uma vez que a variância intraclasse está na nova componente ortogonal (Worley & Powers, 2015). A Figura 17 apresenta um exemplo de gráfico de escores da OPLS-DA.

Figura 17- Representação gráfico dos escores na OPLS-DA



Fonte: PONTES *et al.*, (2019).

2.4.4 Análise Discriminante Linear (LDA)

A Análise Discriminante Linear (do inglês, *Linear Discriminant Analysis*) é uma análise classificatória que se baseia em encontrar uma função linear que permita a discriminação entre pontos relativos a dados de duas categorias diferentes (Bahraini *et al.*, 2022). Nesta modelagem é permitido a determinação de uma superfície (classificador) ou limiar de classificação 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. Para isso, é construída uma combinação linear de poucas variáveis originais, o que impõe a utilização de uma ferramenta de seleção de variáveis. O principal objetivo da função discriminante é minimizar as diferenças de escores de indivíduos de um mesmo grupo e maximizar as diferenças entre elementos de grupos distintos, permitindo a identificação de um ponto de corte que discrimina os grupos (Becht, 2021).

Quando o modelo é construído, é importante realizar a validação para avaliar a capacidade assertiva do modelo em relação as amostras desconhecidas, bem como averiguar as variáveis necessárias para caracterizar o conjunto de dados. Este processo de validação pode ser realizado da seguinte forma: através da Validação Externa ou Validação Cruzada. A validação externa é realizada quando o modelo possui amostras suficientes para gerar grupos de treinamento (utilizados para construção do modelo) e de testes (avaliar o modelo) e cada grupo possuindo amostras representativas de cada classe. Quando não há quantidade suficientes de amostras para criar os grupos (mínimo de 30 amostras por grupo), é realizada a validação cruzada (Kwon *et al.*, 2014).

Quando é utilizada a validação cruzada, o método mais comum aplicado é a Validação Cruzada Total (LOOCV, do inglês, *Leave-One-Out Cross Validation*). Este processo consiste em retirar uma amostra do conjunto de treinamento, construindo um novo modelo sem a amostra excluída, e processa para que o modelo classifique a amostra excluída. Este teste é realizado com todas as amostras individualmente, até que cada uma seja retirada do conjunto treinamento e usada como conjunto teste. A exatidão é calculada através do percentual de acertos para cada modelo e a performance da validação cruzada é a média das exatidões (Xie, 2022).

2.4.5 Figuras de Mérito

Modelos diagnóstico visam responder à pergunta: o paciente está acometido pela doença investigada? Essa é uma variável dicotômica, pois a resposta é SIM ou NÃO. Nesses casos, os dados da modelagem são confrontados com o padrão-ouro, numa matriz 2x2 denominada de Matriz de Contingência. Dessa tabela (matriz) são extraídas as Figuras de Mérito do modelo, como segue: Exatidão, Sensibilidade, Especificidade, Valor Preditivo Positivo (VPP) e Valor Preditivo Negativo (VPN).

Na Tabela 2, está ilustrada a matriz de contingência para avaliação dos parâmetros do modelo. Nas linhas da tabela estão indicadas as classes preditas pelo modelo metabonômico, enquanto nas colunas estão as classes verdadeiras das amostras. Os valores preenchidos na tabela correspondem a quantidade de amostras em cada classe e onde elas foram classificadas.

Tabela 2- Matriz de confusão dos resultados de uma classificação

		Classificação Clínica (Padrão Ouro)	
		SIM	NÃO
Modelo	SIM	a	b
	NÃO	c	d

Fonte: Adaptada de Silva (2017).

No nosso estudo, a matriz de contingência foi formada da seguinte maneira: **a** é a quantidade de acertos do grupo melhora pelo novo teste, **b** é a quantidade de erros do grupo não-melhora, **c** é a quantidade de erros do grupo melhora e **d** é a quantidade de acertos do grupo não-melhora. Assim, as figuras de mérito da modelagem foram calculadas, conforme as equações 12-16 (Ferreira, 2015).

$$\text{Exatidão (\%)} = \frac{(a + d)}{(a + b + c + d)} \times 100 \quad (12)$$

$$\text{Sensibilidade (\%)} = \frac{a}{(a + c)} \times 100 \quad (13)$$

$$\text{Especificidade (\%)} = \frac{b}{(b + d)} \times 100 \quad (14)$$

$$\text{VPP (\%)} = \frac{a}{(a + b)} \times 100 \quad (15)$$

$$\text{VPN (\%)} = \frac{d}{(c + d)} \times 100 \quad (16)$$

Em que, exatidão é o percentual de classificações corretas do modelo; sensibilidade (S) é a capacidade que o modelo possui de detectar os verdadeiros positivos; especificidade (E) é a capacidade que o modelo apresenta de detectar os verdadeiros negativos; valor preditivo positivo (VPP) é a probabilidade de um verdadeiro positivo ser realmente positivo; e valor preditivo negativo (VPN) é a probabilidade de um verdadeiro negativo ser realmente negativo.

Os estudos metabonômicos, como já mencionado, têm grande aplicabilidade em diversas áreas. Dado este entendimento sobre a Metabonômica e Quimiometria, iremos abordar a seguir o nosso objeto de estudo, ao qual, foi aplicada a estratégia metabonômica.

2.5 Varicocele

De acordo com a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (do inglês *American Society for Reproductive Medicine*), cerca de 8% a 15% dos casais não conseguem engravidar após um ano de intercurso sexual regular e sem medidas preventivas. Este histórico reprodutivo leva em conta alguns fatores, como frequência e tempo de coito, duração da infertilidade atual e prévia (se houver), doenças na infância, comorbidades sistêmicas, cirurgias anteriores, medicações e alergias, histórico sexual (incluindo Infecções Sexualmente Transmissíveis) e exposição a gonodotoxinas (incluindo fatores ambientais, químicos e calor).

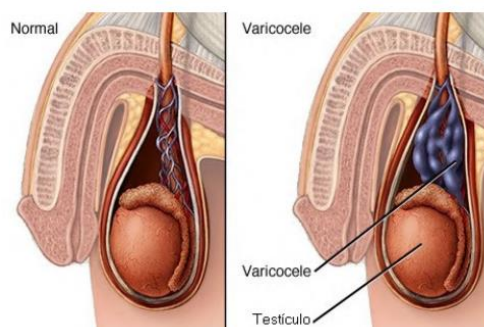
O homem pode ter participação exclusiva na infertilidade em cerca de 20% a 30% dos casos, o que pode contribuir para quase 50% das causas em geral de infertilidade, o que pode ser considerada um risco para o bem-estar tanto para o homem quanto para a família (Silveira, 2022). Alguns fatores estão associados às possíveis causas da infertilidade masculina, como por exemplo o tabagismo, a obesidade, inflamações sistêmicas crônicas, estresse oxidativo, hipogonadismo, hiperinsulinemia, infecções sexualmente transmissíveis como gonorreia e clamídia, dentre outras doenças (Rodrigues, 2022). Assim como alguns casos especiais, por exemplos trabalhadores da agricultura, certos tipos de indústrias, militares, que podem

estar expostos a fatores ambientais e produtos tóxicos, como pesticidas e metais pesados (López-Botella *et al.*, 2021). Há também estudos que comprovam que a qualidade do sono pode interferir diretamente nos parâmetros seminais, algo não muito difícil de acontecer, visto que a sociedade atual busca cada vez mais alta produtividade, negligenciando muitas vezes o tempo de descanso de qualidade (Rodrigues, 2022).

Como possíveis causas para infertilidade masculina, estão estabelecidas condições que possam alterar o processo de espermatogênese (produção dos espermatozoides) e/ou a alteração na qualidade dos parâmetros seminais, causada pela varicocele. Assim, uma avaliação clínica precisa ser realizada, sendo avaliados parâmetros de concentração espermática, motilidade, morfologia e vitalidade (Silveira, 2022).

A varicocele é considerada umas das causas principais de infertilidade, que é caracterizada por uma dilatação ou tortuosidade nas veias testiculares (Figura 18). Esta pode ser assintomática, ou seja, o paciente não relatar sintomas, desconfortos até os casos de sentir dores escrotais crônicas e alteração nos padrões seminais, podendo afetar de 15% a 41% de homens com infertilidade primária (que consiste no casal que ainda não teve uma gestação de sucesso) e 45% a 81% de homens com infertilidade secundária (casal que já teve uma gestação anterior de sucesso) (Lomboy; Coward, 2016).

Figura 18- Imagem testículo normal versus testículo com varicocele

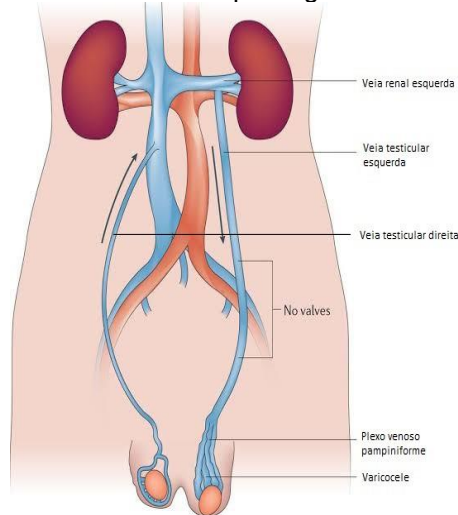


Fonte: Silva, 2021.

A varicocele pode ser considerada uma doença multifatorial, resultando em complicações na circulação do sangue local, que pode ser a principal causa. Uma diferença anatômica na passagem venosa do testículo esquerdo e direito, no qual, existe um ângulo oblíquo (inclinado) da ligação direta da veia cava inferior na veia

testicular direita, enquanto no lado esquerdo, a veia testicular é maior e tem uma junção com a veia renal em um ângulo reto, favorecendo o aumento da pressão e dilatação (Figura 19) (Jensen *et al.*, 2017).

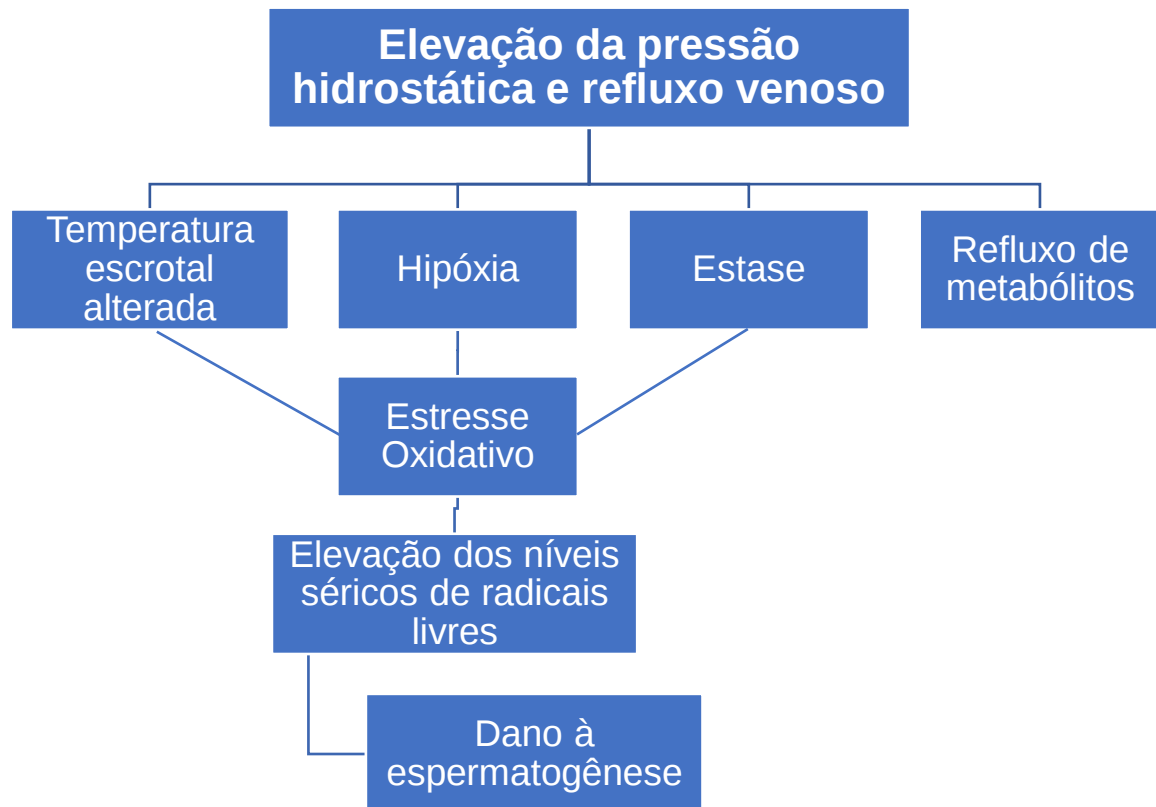
Figura 19- Diferença da estrutura anatômica na passagem venosa do testículo esquerdo e direito



Fonte: Moore (2018).

A varicocele costuma aparecer no testículo esquerdo com mais frequência devido a esta diferença anatômica (aumento da pressão e consequente dilatação dos vasos). Entretanto, estima-se que cerca de 15% a 50% dos casos são de varicocele bilateral, enquanto exclusivamente no lado direito é raro podendo apresentar outras causas para justificar o aparecimento da doença (Zini; Boman, 2009). Esta doença é associada a infertilidade justamente pelos mecanismos que podem levar a alteração na espermatogênese, como listados na Figura 20, sendo o aumento da temperatura escrotal um fator extremamente importante na qualidade dos espermatozoides. Isto porque pode ocorrer um estresse térmico, por conta da diminuição de proteínas protetoras do choque térmico, além de aumentar os níveis de espécies reativa de oxigênio, promovendo a apoptose (Hassanin, 2011). Vale salientar que, os homens que apresentam varicocele não necessariamente já apresentam o diagnóstico de infertilidade, pois há casos que essa condição não afeta a fertilidade. Ainda existe esta lacuna em relação a varicocele e infertilidade.

Figura 20- Efeitos da varicocele



Fonte: Adaptado de SILVEIRA (2022).

Para o diagnóstico da doença, o exame físico tem um enorme destaque, uma vez que a varicocele pode ser assintomática. Um exame de rotina pode ajudar a identificar a doença em estágio inicial e, conseqüentemente, ter um melhor prognóstico (Martello *et al.*, 2015). O foco do exame físico é voltado para possíveis assimetrias entre os testículos, realizando-se também a manobra de valsava (técnica para aumentar a pressão através da respiração, para evidenciar as veias, facilitando a palpação). O resultado vai ser classificado dentro do proposto por Dubin e Amelar (Tabela 3), que categorizaram os graus da varicocele. Caso não se aplique a classificação por este método, será classificada como Varicocele Subclínica, sendo necessária investigação complementar através de exames como a ultrassonografia e análise seminal.

Tabela 3- Classificação de Dubin e Amelar para grau de varicocele no exame físico

Gravidade da Varicocele	Aspecto Clínico
Grau 1	Palpáveis apenas através da manobra de Valsava
Grau 2	Palpáveis sem utilizar a manobra de Valsava
Grau 3	Observáveis visualmente

Fonte: Adaptado de SILVEIRA (2022).

Como tratamento para a varicocele o mais indicado atualmente são as opções cirúrgicas conhecidas como varicocelectomia, que podem ser realizadas com técnicas distintas, a critério médico, considerando cada paciente (Çayan; Woodhouse, 2007). Uma opção bem aceita é a técnica da microcirurgia subinguinal, na qual, é feita uma incisão na região inferior do abdome com o objetivo de identificar e cortar os vasos dilatados do plexo pampiniforme. Esta técnica apresenta uma rápida recuperação, com um pós-operatório pouco agressivo e resultados satisfatórios. Outras técnicas que podem ser utilizadas são microcirurgia retroperitoneal e embolização percutânea (Macedo; Fonseca, 2015). O tratamento da varicocele através das técnicas de microcirurgia tem demonstrado uma eficácia de 40 a 60% dos casos, sendo importante ressaltar que possuem poucas complicações e mínimas chances de recorrência (quando comparadas a outras técnicas) (Zini; Boman, 2009).

A varicocelectomia não é indicada para todos os pacientes. Normalmente, ela é indicada para pacientes classificados no grau 3, quando o paciente apresenta desconforto. A cirurgia não é realizada para fins de infertilidade. Porém, a intervenção cirúrgica pode apresentar melhoras nos parâmetros seminais. Sendo assim, o procedimento cirúrgico é uma espécie de “voo cego”, no qual o médico irá corrigir a varicocele, mas não pode afirmar que a cirurgia irá influenciar no âmbito da infertilidade. Só após 30 a 90 dias da cirurgia que poderá ser feito os exames que indiquem a resposta sobre a melhora dos parâmetros seminais associados à fertilidade.

A associação entre a varicocele, infertilidade e parâmetros seminais não é totalmente entendida. A resposta pode estar concatenada a uma análise como um todo em relação aos diversos pontos que contribuem para o desenvolvimento desta perturbação, por ser uma doença multifatorial. Nesse quesito, um estudo metabonômico pode oferecer ferramenta para a elucidação em relação a esta

patologia, especificamente, ao prognóstico de melhora dos parâmetros seminais, auxiliando o médico com uma predição dos resultados da varicocelectomia.

3 HIPÓTESE

Quando a varicocele é a causa de infertilidade, ocorre uma mudança no perfil de metabólitos endógenos que pode ser associada ao quadro de infertilidade e pode ser monitorada a partir da espectroscopia de RMN de ^1H de amostras de soro sanguíneo. Essa perturbação também permite fazer um prognóstico do emprego da varicocelectomia visando melhorar os parâmetros seminais do paciente.

4 JUSTIFICATIVA

A varicocele pode causar danos ao testículo e alterar os parâmetros espermáticos do indivíduo. Todavia, não é possível concluir que a varicocele esteja diretamente relacionada à infertilidade masculina (Arya, 2022). Os estudos realizados em homens inférteis com varicocele apontam que, após o tratamento cirúrgico da varicocele, ocorre melhora nos parâmetros seminais, como os níveis séricos de testosterona, bem como um aumento da taxa de gravidez. Porém, há casos de pacientes que mesmo realizando a intervenção cirúrgica não logram êxito (Maheshwari, 2022). Assim como, existe grupo de pacientes que apresentam varicocele e são férteis. Mesmo com vários estudos sobre a varicocele, ainda é um dilema a conclusão entre a causa e/ou cofator com a infertilidade (Bertolotto, 2021)

A metabonômica surge como uma alternativa de grande aplicabilidade nos estudos de pacientes masculinos inférteis (Mehrparavar, 2019). No nosso estudo, o biofluido utilizado é o soro de sangue, uma vez que ele contém informações dos metabólitos endógenos e que estão relacionados diretamente a fisiopatologia e parâmetros bioquímicos do paciente.

Com o desenvolvimento das pesquisas metabonômica em pacientes com varicocele infértil, utilizando a espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H , será possível prever de forma minimamente invasiva, usando amostras de soro sanguíneo, os casos em que a intervenção cirúrgica pode ser alternativa de tratamento de infertilidade (Yan, 2021).

Este estudo apresenta método de caráter experimental e, apesar do alto custo de aquisição do espectrômetro, o custo por análise tem valor baixo, podendo se constituir como alternativa prognóstica ágil e precisa.

5 OBJETIVOS

5.1 Objetivo Geral

Construir modelos metabonômicos, a partir de espectros de RMN de ^1H de soro sanguíneo, que sejam capazes de fazer um prognóstico de melhora (ou não) dos parâmetros seminais de pacientes submetidos à varicocelectomia.

5.2 Objetivos Específicos

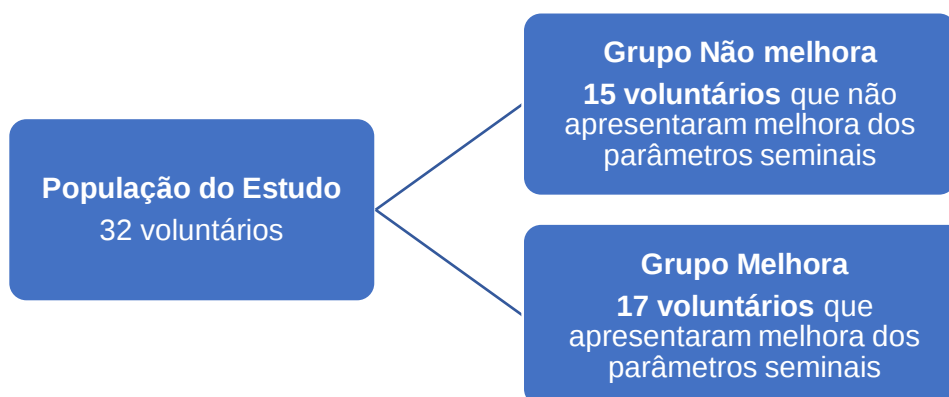
- Adquirir os espectros de RMN de ^1H a partir do soro sanguíneo de voluntários que apresentam um quadro de infertilidade e tenham sido diagnosticados com varicocele;
- Selecionar os formalismos de análise multivariada que se adequam ao estudo realizado;
- Construir modelos metabonômicos para o prognóstico de melhora dos parâmetros seminais pós-varicocelectomia;
- Identificar as variáveis mais importantes para a discriminação das amostras.

6 MATERIAIS E MÉTODOS

6.1 Seleção dos pacientes e grupo de estudo

Foram selecionados 32 homens voluntários, entre 20 e 45 anos, atendidos na clínica de Fertilidade Masculina do Instituto de Medicina Integral Professor Fernando Figueira (IMIP). Todos os voluntários foram submetidos à varicocelectomia e o material biológico (sangue) usado nos ensaios metabonômicos foi fornecido antes da cirurgia. Também foram coletados amostra de sangue, com trinta dias pós-cirurgia, para avaliar a melhora (ou não) dos pacientes. O estudo se baseia na predição da melhora ou não melhora dos parâmetros seminais dos pacientes com diagnósticos de varicocele e submetidos à varicocelectomia (Figura 21). Os dados espectrais usados foram de amostras de soro de sangue coletadas antes da cirurgia e a matriz resposta foi construída usando dados da análise pós-varicocelectomia.

Figura 21- Distribuição dos grupos investigados para o estudo desenvolvido



Autoria própria.

6.2 Aprovação do Comitê de Ética

Todos os voluntários assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) antes de sua inclusão no estudo. O desenvolvimento desse trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE - nº 1.978.735 (ANEXO A) e do IMIP - nº 2.075.028 (ANEXO B).

6.3 Proteção dos pacientes envolvidos

Os pacientes foram informados de possível desconforto no ato da punção venosa periférica. Esse procedimento de coleta já faz parte da rotina de avaliação do paciente com varicocele. Um profissional habilitado no laboratório de análises clínicas

do IMIP-PE ao receber a amostra de sangue, realiza a primeira etapa de centrifugação, separação do soro e encaminha diretamente ao Laboratório de Metabonômica e Quimiometria do DQF/UFPE. As informações pessoais dos pacientes são mantidas em sigilo, sob controle, garantindo a privacidade em relação aos dados confidenciais envolvidos.

6.4 Exames clínicos-laboratoriais dos pacientes

Inicialmente, foi realizada a anamnese e avaliação clínica dos pacientes pelo mesmo urologista, em ambiente bem iluminado e com temperatura apropriada (25°C), com os participantes na posição supino e vertical. Para a avaliação hormonal, foi realizada a coleta do sangue via punção venosa, entre as 07:00 e 11:00 da manhã, após o jejum noturno, e através do sangue, o doseamento sérico foi feito para a determinação das taxas hormonais. Todas as análises dos níveis dos hormônios sexuais foram realizadas no laboratório de análises clínicas do IMIP.

Os parâmetros hormonais avaliados foram: testosterona total (intervalo de referência: 1,4 – 18,2 mUI/mL), estradiol (intervalo de referência: 11,6 – 41,2 pg/dL), hormônio folículo estimulante (FSH) (intervalo de referência: 206 – 1200 ng/dL), hormônio luteinizante (LH) (intervalo de referência: 1,5 – 9,3 mUI/mL), albumina e globulina de ligação aos hormônios sexuais (SHBG) (intervalo de referência: 10 – 57 nmol/L). As dosagens de níveis séricos dos hormônios foram adquiridas através do analisador automático ADAVIA Centaur XP, Siemens Healthcare Diagnostics, através do método de quimioluminescência. As dosagens da albumina (intervalo de referência 3,4 - 4,8 g/dL) foram determinadas usando o analisador automatizado bioquímico (Architect c16000, Abbott Diagnostics), através do método colorimétrico. Os níveis de testosterona livre (intervalo de referência 49,9 – 199,9 pg/mL) foram obtidos a partir da fórmula de Vermeulen *et al.*

6.5 Preparação das amostras de soro sanguíneo e análise por RMN de ^1H

As amostras foram centrifugadas usando 3000 rpm, por 15 minutos, ocorrendo a separação do soro, que foi armazenado em tubos de eppendorf e mantidas congeladas a -40°C até serem analisadas por espectroscopia de RMN de ^1H . Para a realização da análise, as amostras foram descongeladas e uma alíquota de 400 μL foi transferida para um tubo de RMN, com 5 mm de diâmetro interno e adicionado 200 μL de água deuterada (D_2O), sendo homogeneizados, em seguida. Os espectros de RMN de ^1H foram obtidos usando a sequência de pulsos CPMG (Carr-Purcell-Meiboom-

Gill), com pré-saturação (presat) do sinal da água, no espectrômetro Agilent VNMRs 400, operando a 400 MHz e a temperatura de 27°C.

Foram utilizados os seguintes parâmetros experimentais: tempo de pré-saturação igual a 2,34 s, janela espectral de 4,8 kHz, número de ciclos de 88, *tau* igual a 0,0004 s, *bigtau* igual a 0,07 s e 128 transientes. Cada espectro foi adquirido utilizando um tempo total de 10 minutos e 4 segundos. Os espectros foram processados usando *linebroadening* de 0,3 Hz. As linhas de base e distorções de fase foram corrigidas manualmente no programa do equipamento.

Efetou-se outra etapa de processamento, usando o software MestReNova 9.0. Os espectros foram reavaliados, a linha de base ajustada automaticamente, enquanto a fase dos espectros foi ajustada manualmente. Após essa etapa, o sinal do grupo metila do lactato foi referenciado em δ 1,34 ppm e os espectros foram todos colocados sobreposto para conferência dos ajustes. Realizou-se o corte da região necessária para a construção da matriz de dados, sendo considerado apenas a faixa entre δ 0,77 e 4,04 ppm, que foi dividida em regiões (bins) de 0,04 ppm. Para a construção do modelo, agrupamos as matrizes linhas das amostras em uma única matriz, contendo as amostras (casos) nas linhas e os bins nas colunas (variáveis) e inserimos uma coluna com a classificação das amostras. Dessa forma, foi obtida uma matriz com 32 linhas (amostras) e 83 variáveis, que foi submetida às análises quimiométricas.

6.6 Tratamento estatístico para análises multivariadas

Com a matriz adquirida, foi realizado o tratamento quimiométrico dos dados espectrais utilizando a plataforma online MetaboAnalyst 5.0. Os dados foram normalizados pela soma, nas amostras, e autoescalados, nas variáveis. É um procedimento importante e necessário visto que algumas variáveis apresentam intensidades baixas, concentrando-se muito próximas à linha de base (Chong, 2020).

Foi realizada uma análise exploratória, usando a Análise de Componentes Principais (PCA). A análise classificatória foi realizada usando os formalismos *Partial Least Square Discriminants Analysis* (PLS-DA) e *Orthogonal Partial Least Square Discriminants Analysis* (OPLS-DA) para observar se as amostras se agrupavam nas classes de interesse. Como forma de validar os modelos PLS-DA e OPLS-DA, foi utilizado o teste de permutação, fazendo 2000 permutações e para determinar os

valores de Q^2 , R^2 e a exatidão de classificação dos modelos foi utilizado o LOOCV (*Leave-One-Out Cross Validation*).

Em seguida, foi construído um modelo metabonômico usando o formalismo LDA, através do *software* Statistica 12.0. Os dados foram pré-processados, usando SNV (*Standard Normal Variate*) e autoescalamamento. A seleção de variáveis foi realizada usando o Lambda de Wilks, resultando em uma regressão contendo cinco variáveis. A validação foi feita por LOOCV, da seguinte maneira: construiu-se 32 modelos distintos utilizando as mesmas amostras, com a exceção de uma amostra por vez, a qual foi classificada pelo modelo construído. Após a etapa de validação, calculou-se as seguintes Figuras de Mérito: sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP), valor preditivo negativo (VPN) e exatidão dos modelos.

A identificação dos metabólitos de interesse foi realizada através dos bancos de dados eletrônicos *Human Metabolome Database* (HMDB) (Wishart, 2022), *Biological Magnetic Resonance Bank* (BMRB) (Baskaran, 2022) e artigos (HTUN, 2021).

7 RESULTADOS E DISCUSSÃO

7.1 Resultados demográficos clínico-laboratoriais

A Tabela 4 apresenta os dados demográficos e clínicos dos voluntários deste estudo, considerando Melhora quando os voluntários apresentaram uma elevação mínima de 30% no total de espermatozoides, pós-varicocelectomia.

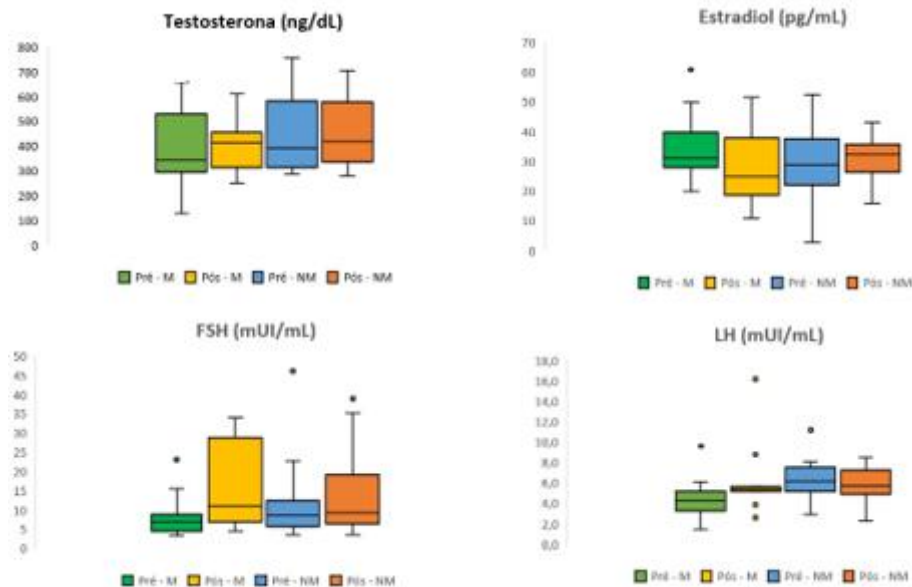
Tabela 4- Dados demográficos e clínicos dos 32 voluntários participantes do estudo

Grupo Não Melhora*				Grupo Melhora*			Valor de p [#]
Exame Físico e Dados Demográficos							
Nº de voluntários	n= 15			n= 17			–
Idade (anos)	32 ± 4			33 ± 7			0,773
IMC (kg.m ⁻²)	24,6 (23,7-26,3)			26,3 (21,2-29,9)			0,915
Volume do testículo direito (mL)	15,0 (11,5-16,3)			20,0 (15,0-20,0)			0,248
Volume do testículo esquerdo (mL)	10,0 (10,0-14,3)			12,0 (10,0-17,5)			0,478
Hormônios Sexuais	Pré	Pós	Valor de p ^s	Pré	Pós	Valor de p ^s	Valor de p [#]
Testosterona (ng/dL) (241-827 ng/dL) ^a	391 (313-581)	416 (337-578)	0,700	343 (293-530)	415 (315-457)	0,156	0,5408
Estradiol (pg/mL) (11-44 pg/mL) ^a	29,0 (22,2-37,6)	32,4 (26,4-37,6)	0,547	31,0 (28,0-39,8)	25,0 (18,8-38,0)	0,617	0,897
FSH (mUI/mL) (1,4 – 13,8 mUI/mL) ^a	8,5 (5,6-12,5)	9,4 (6,3-19,2)	0,989	6,9 (4,5-8,9)	10,9 (6,8-28,7)	0,141	0,242
LH (mUI/mL) (0,57 – 12,07 mUI/mL) ^a	6,2 (5,2-7,5)	5,7 (4,9-7,3)	0,032	4,3 (3,2-5,2)	5,4 (5,2-5,6)	0,187	0,999
Análise Seminal	Pré	Pós	Valor de p [*]	Pré	Pós	Valor de p [*]	Valor de p [#]
Total de espermatozoides (x10 ⁶) (39-928) ^a	3,0 (0,0-33,3)	5,0 (0,0-30,0)	0,193	5,0 (1,0-19,5)	42,0 (28,5-63,0)	<0,001	0.001
Volume (mL) (1,5-7,6 mL) ^a	4,0 (3,0-4,0)	3,0 (2,0-5,0)	0,291	3,0 (2,0-4,0)	4,0 (2,0-5,0)	0,012	0.235
Concentração espermática (10 ⁶ /mL)(15-259) ^a	2,0 (0,0-10,0)	1,0 (0,0-6,0)	0,195	3,0 (0,4-8,0)	18,0 (10,0-23,0)	<0,001	0.003
Motilidade progressiva (%) (32%-75%) ^a	30,0 (17,3-38,75)	22,0 (4,5-31,5)	0,238	26,0 (8,0-36,0)	38,0 (25,0-43,0)	0,004	0.023
Total de espermatozoides progressivos (x10 ⁶)	3,0 (0,0-33,25)	5,0 (0,0-30,0)	0,009	5,0 (1,6-19,5)	42,0 (28,5-63,0)	<0,001	0.002
Morfologia alterada (%) (≥4%) ^a	5,0 (4,0-10,0)	5,0 (3,5-6,5)	0,718	7,0 (5,0-10,0)	9,0 (5,25-10,0)	0,790	0.025

Autoria própria. *Mediana (IQR); ^sTeste de Wilcoxon - Comparação dos níveis séricos intragrupo (pré e pós-varicocelectomia); [#]Teste de Mann-Whitney- Comparação dos níveis séricos entre os grupos (pós-varicocelectomia); ^a Valores de referência na faixa etária dos voluntários.

Na Figura 22, são apresentados os gráficos boxplot para os níveis séricos dos hormônios sexuais, indicando a variabilidade de valores nos conjuntos de dados, antes e após a varicocelectomia.

Figura 22- Gráfico boxplot dos níveis séricos dos hormônios sexuais. M – Melhora / NM – Não-Melhora

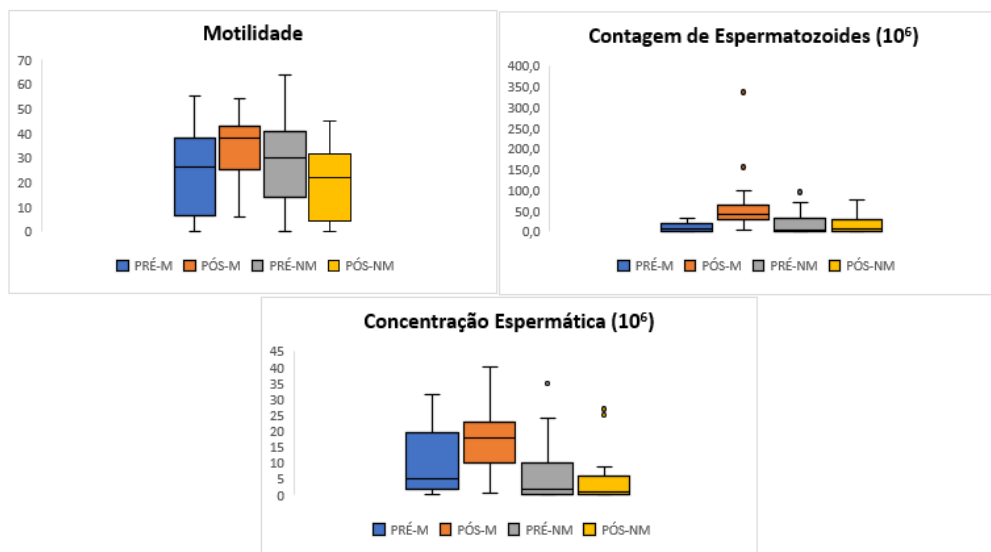


Autoria Própria.

Os gráficos apresentados na Figura 22 indicam que a varicocelectomia não provocou mudanças nos níveis séricos de hormônios sexuais dos voluntários, como já evidenciado na Tabela 4. Testosterona, Estradiol e FSH (Hormônio Folículo-Estimulante) apresentaram-se bem dispersos, enquanto os níveis séricos de LH (Hormônio Luteinizante) teve baixa dispersão.

Na Figura 23, são apresentados os gráficos boxplot para os níveis séricos dos parâmetros seminais, dos pacientes antes e após a cirurgia.

Figura 23- Gráfico bloxpot dos níveis séricos dos parâmetros seminais. *M* – Melhora / *NM* – Não-Melhora



Autoria Própria.

É possível observar a dispersão no grupo melhora, quando comparado ao grupo que não melhorou, mas a motilidade também apresentou uma dispersão considerável no grupo não-melhora. As amostras apresentam distribuição não-normal e nos parâmetros de contagem de espermatozoides e concentração espermática foi possível observar valores discrepantes (*outlier*). Para entendermos a relação dos parâmetros seminais com a infertilidade, de forma geral, a relação seria de quanto maior a contagem de espermatozoides, maior a concentração de espermatozoides, maior motilidade e maior a probabilidade de sucesso gestacional. Todavia, mesmo que o indivíduo apresente baixa contagem de espermatozoides, mas possua boa concentração espermática e motilidade, consiga êxito gestacional.

Observando a Tabela 4, a hipótese admitida no estudo é que a varicocelectomia repercute nos parâmetros que afetam a infertilidade apenas de alguns pacientes e, portanto, é possível criar um modelo metabonômico para prever aqueles pacientes que serão afetados positivamente. No primeiro momento, é possível observar que não há diferenças significativas em relação a idade, IMC e volume dos testículos direito e esquerdo de ambos os grupos, ou seja, não são considerados critérios discriminantes da fertilidade. Não foi obtido informações acerca dos volumes dos testículos, após a cirurgia, impossibilitando admitir importância estatística intragrupos. A avaliação dos volumes testiculares é interessante investigar, visto que, o tamanho dos testículos está associado à espermatogênese (processo que ocorre a formação dos

espermatozoides), permitindo uma associação com a produção normal de espermatozoide (Macedo; Fonseca, 2015).

O IMC (Índice de Massa Corporal) é um parâmetro importante na avaliação do quadro de infertilidade, pois a obesidade está associada a menor produção de testosterona e ao estresse oxidativo a nível testicular. A Tabela 4 indica que os voluntários têm valores de IMC comparáveis e com mediana abaixo do valor que indica obesidade, a partir de IMC igual a 30, obesidade I (Da Silva, 2022). O FSH, LH, Estradiol e Testosterona são os responsáveis por todo o ajuste da atividade testicular e, quando as taxas estão irregulares, elas podem afetar diretamente a fertilidade (Ashoub *et al.*, 2021). Ao ser observado os efeitos hormonais, comparando os grupos de forma global – Melhora e Não-Melhora –, os níveis séricos de testosterona, estradiol, FSH e LH não apresentaram significância estatística, ou seja, a intervenção cirúrgica, neste caso, não influenciou para que esses parâmetros fossem determinantes na discriminação dos grupos.

Na análise seminal, são observados os parâmetros referentes a quantidade de espermatozoides e a viabilidade destes, ou seja, a morfologia e a motilidade. A quantidade e concentração total de espermatozoides, motilidade e morfologia têm relação diretamente proporcional com as chances de fecundação, por isso esses valores são determinísticos na avaliação estatística do prognóstico (Yamei, 2020).

Observando os parâmetros seminais obtidos, é possível concluir que existe um evidente impacto no tratamento cirúrgico na melhora dos aspectos citados acima, visto que, em relação ao grupo Melhora, comparando intragrupos, houve um aumento considerável no total de espermatozoides, concentração espermática, motilidade e no total de espermatozoides progressivos, apresentando significância estatística ($p < 0,05$). Quanto à morfologia, não foram observadas mudanças significativas. No tocante à análise entre os grupos, foi observada variação estatisticamente significativas, para todos os parâmetros avaliados, com exceção do volume de sêmen fornecido.

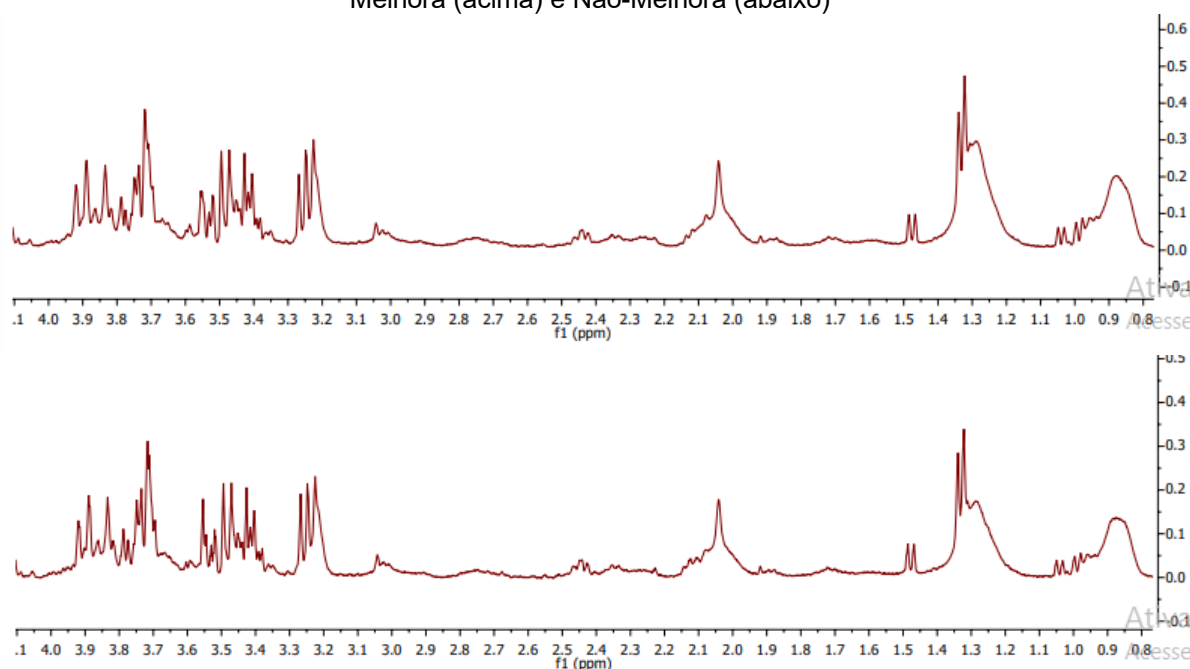
Vale salientar que a varicocelectomia é um procedimento cirúrgico invasivo e nos resultados acima foi possível comprovar que existem casos em que o procedimento melhora os parâmetros seminais, como há casos que os parâmetros seminais não tiveram alterações significativas. Sendo assim, a construção de modelos metabonômicos com o propósito da predição da melhora (ou não) da qualidade

seminal pós-varicoceletoomia, pode ser mais uma ferramenta importante para auxiliar o médico na tomada de decisão.

7.2 Espectro de RMN de ^1H dos grupos Não-Melhora e Melhora

A Figura 24 apresenta espectros de RMN de ^1H de amostras de soro dos grupos Melhora e Não Melhora. Visualmente, não é possível identificar diferenças significativas entre os espectros. Nos espectros foram realizados os cortes dos sinais que não serão utilizados na modelagem e é através do pré-processamento desses espectros que a matriz de dados é obtida.

Figura 24- Espectros de RMN de ^1H (400 MHz, D_2O , Presat-CPMG) de amostras de soro dos grupos Melhora (acima) e Não-Melhora (abaixo)



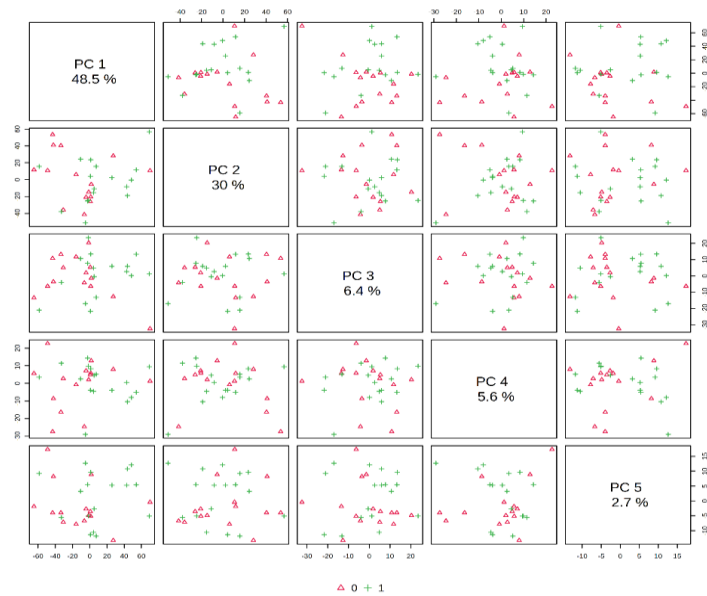
Autoria própria.

As amostras dos dois grupos apresentam o mesmo padrão espectral, não sendo possível, apenas com inspeção visual, identificar as diferenças entre elas.

7.3 Análise Exploratória - PCA

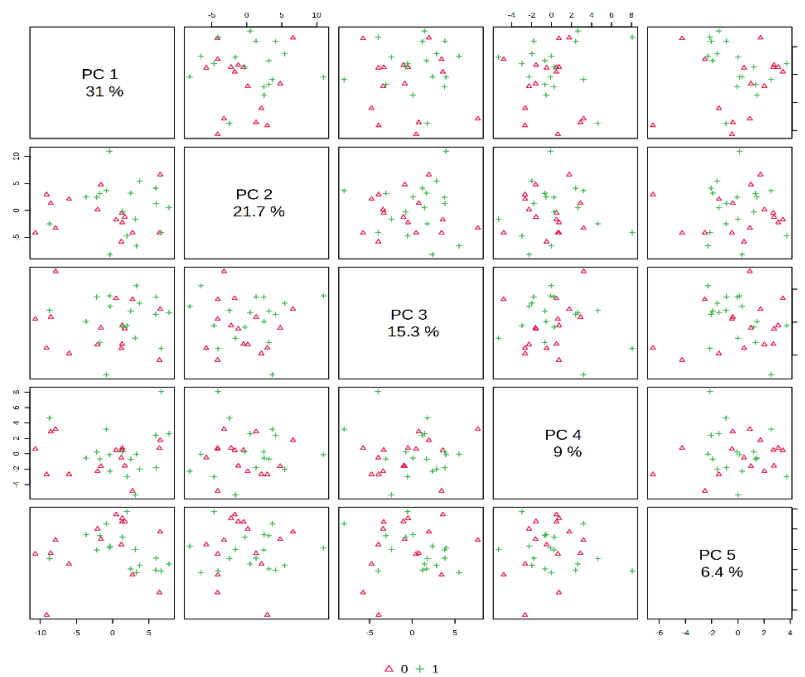
As Figuras 25 e 26 apresentam os gráficos de escores da PCA, usando duas formas de pré-processamento. A planilha matriz (*input*) utilizada na análise está no APÊNDICE A.

Figura 25- Gráficos dos escores das amostras do modelo PCA obtido a partir da matriz CPMG com os pré-processamentos da normalização por soma e centralização na média, realizada usando a matriz de covariância. Em vermelho, amostras do grupo não-melhora; em verde, amostras do grupo melhora



Autoria própria.

Figura 26- Gráficos dos escores das amostras do modelo PCA obtido a partir da matriz CPMG com os pré-processamentos da normalização por soma e autoescalamento, realizada usando a matriz de covariância. Em vermelho, amostras do grupo não-melhora; em verde, amostras do grupo melhora

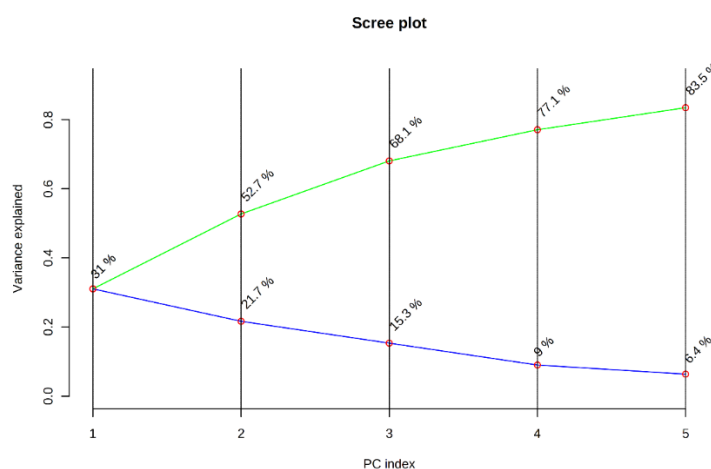


Autoria própria.

Observando os escores com seus respectivos pré-processamentos, não foi possível identificar agrupamento natural das amostras nas classes de interesse, indicando que a variância no conjunto de dados associada ao status bioquímico do quadro de infertilidade associada à varicocele, é relativamente pequena. No processamento centralização na média é possível visualizar uma amostra anômala, possivelmente *outlier*, na primeira e segunda componente, já no autoescalamiento não apresenta amostras anômalas. Com isso, foi feita a opção de usar normalização pela soma e autoescalamiento como pré-processamentos dos dados.

Observando o *Scree plot* (Figura 27), a linha azul está relacionada a quanto cada componente individualmente explica a variância no conjunto de dados, ou seja, a primeira componente consegue explicar 31%, a linha superior explica as variações acumuladas. Isto significa que as cinco primeiras componentes juntas explicam 83,5% da variância contida no conjunto de dados.

Figura 27- Scree plot da PCA. Em azul, a variância explicada por cada PC; e em verde, a variância acumulada



Autoria própria.

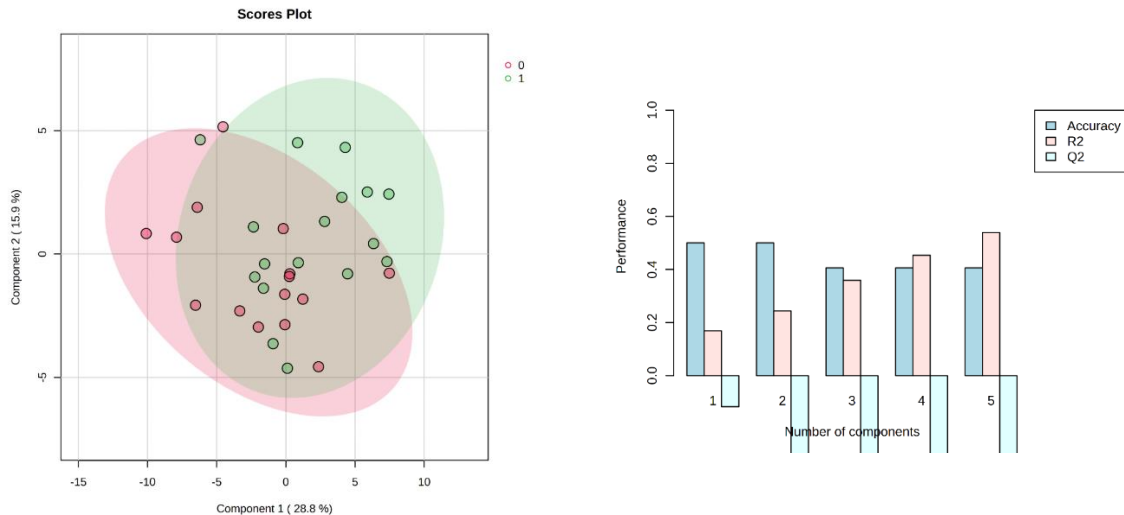
Na análise exploratória pela PCA, com o pré-processamento normalização por soma e autoescalamiento, não identificamos *outlier*, não houve a necessidade de excluir amostras e não obtivemos separação entre as classes, sendo necessário utilizar os métodos supervisionados.

7.4 Análise Classificatória – PLS-DA

Na construção do modelo PLS-DA, foram aplicados os processamentos normalização pela soma e autoescalamiento. O modelo PLS-DA mostrou uma forte

sobreposição das amostras, que acaba sendo evidenciado tanto no gráfico de escores, quanto nos valores de R^2 e Q^2 da regressão (Figura 28).

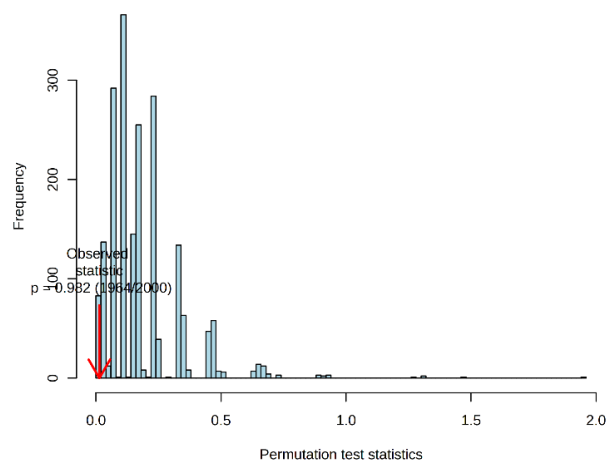
Figura 28- Gráfico de escores (esquerda) e figuras de mérito (direita) do modelo PLS-DA



Autoria própria.

No gráfico do desempenho do modelo, foi observado que a capacidade preditiva do modelo é baixa com a exatidão de apenas 50% usando a primeira componente, no modelo usando de um a cinco componentes. No teste de permutação (Figura 29), o Q^2 é negativo, confirmando que o modelo não teve capacidade preditiva e o valor do p calculado foi de 0,982, indicando que o modelo não apresenta significância estatística.

Figura 29- Teste de permutação da PLS-DA com 2000 permutações



Autoria própria.

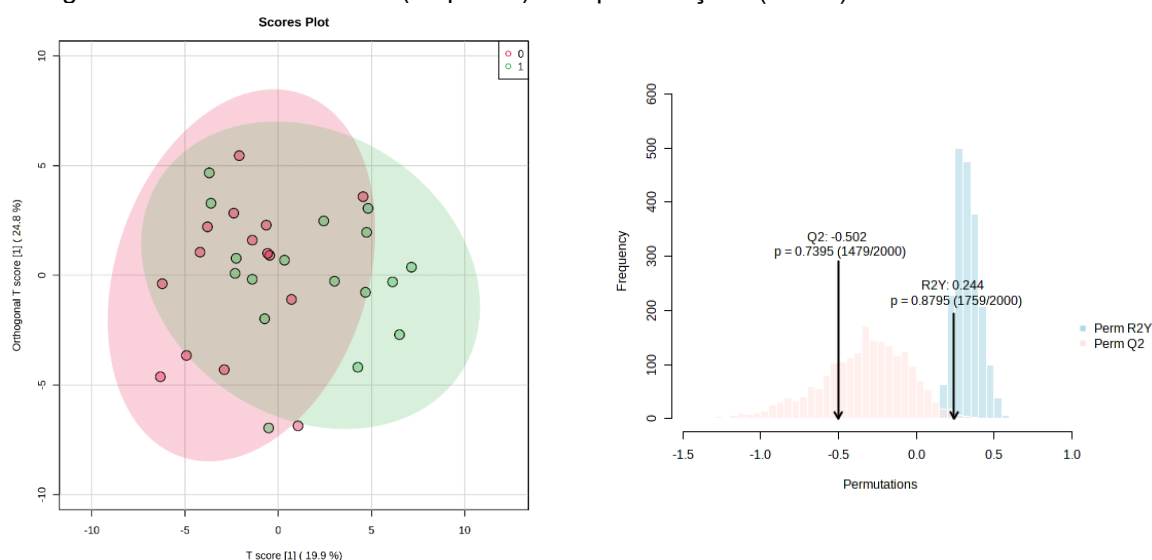
Portanto, o modelo PLS-DA não discriminou as amostras com a capacidade preditiva satisfatória indicando que no teste quando ocorreu a comparação do classificado pelo modelo com a classificação original não foi estatisticamente

significativo. Por isso, outro método supervisionado foi testado (Anwardeen *et al.*, 2023).

7.5 Análise Classificatória – OPLS-DA

Pode-se observar no gráfico de escores formado entre a primeira componente e a sua ortogonal (Figura 30) que de fato não houve separação entre os grupos, como já tinha sido evidenciado no PLS-DA.

Figura 30- Gráfico de escores (esquerda) e de permutações (direita) do modelo OPLS-DA



Autoria própria.

O teste de permutação indicou que o modelo não tem significância estatística, pois, os valores de p foram iguais a 0,7395 e 0,8795, para Q^2 e R^2Y , respectivamente.

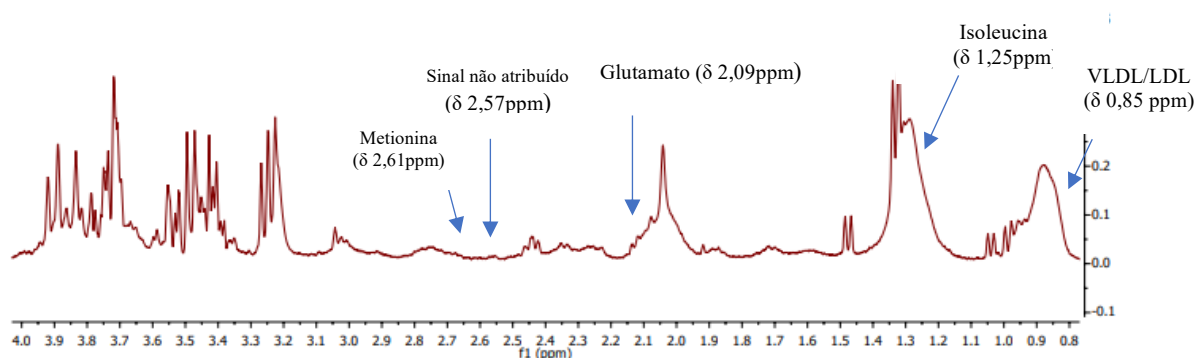
Os formalismos PLS-DA e OPLS-DA utilizam todas as variáveis do conjunto de dados. Em alguns casos, a dispersão intragrupo pode ser tão intensa, que atrapalha a discriminação entre os grupos. Em casos dessa natureza, uma alternativa é usar uma etapa de seleção de variáveis, como o Lambda de Wilks, e a partir disso construir o modelo LDA, que é outra análise classificatória e permite explorar melhor essa relação entre os conjuntos de dados. Este processo exige um esforço computacional maior por conta da etapa de seleção de variáveis.

7.6 Análise Classificatória - LDA

Como não foi observada separação na análise exploratória entre as classes de interesse na PCA e os métodos classificatórios PLS-DA e OPLS-DA tiveram baixa capacidade preditiva, foi realizado outra análise classificatória usando LDA, a fim de obter um modelo com melhor poder preditivo.

A partir da matriz de dados normalizada pelos pré-processamentos SNV e autoescalamento (APÊNDICE B), foram selecionadas as seguintes variáveis (deslocamentos químicos): δ (ppm) 0,85, 1,25, 2,09, 2,57 e 2,61, através de Lambda de Wilks. Na Figura 31, estão indicadas as possíveis variáveis responsáveis pela separação dos grupos.

Figura 31- Espectro de RMN e ^1H (PRESAT-CPMG, 400 MHz) do soro, com atribuição dos sinais selecionados no formalismo LDA



Autoria própria.

A Tabela 5 apresenta, de forma resumida, os achados a partir do modelo LDA, indicando onde cada metabólito apresentou nível sérico mais elevado.

Tabela 5- Identificação dos principais metabólitos discriminantes, bins correspondentes e níveis de concentração relativos em cada grupo

Metabólitos	δ (ppm)	
VDL/LDL	0,85	Sinal mais intenso no grupo não-melhora
Isoleucina	1,25	Sinal mais intenso no grupo melhora
Glutamato	2,09	Sinal mais intenso no grupo não-melhora
Não foi possível atribuir sinal	2,57	Sinal mais intenso no grupo melhora
Metionina	2,61	Sinal mais intenso no grupo não-melhora

Autoria própria.

Em relação a identificação dos metabólitos, foi considerada uma margem de $\pm 0,02$ ppm do bin, sendo indicados os seguintes metabólitos: o sinal em δ 0,85 ppm foi atribuído aos grupos metilas das lipoproteínas VLDL/LDL (HTUN, 2021), enquanto o sinal em δ 1,25 ppm foi atribuído à metila da Isoleucina (HMDB), o sinal em δ 2,09 ppm foi atribuído ao Glutamato (BMRB) e o sinal em δ 2,61 ppm foi atribuído à Metionina (HMDB). O sinal em δ 2,57 ppm não foi atribuído e, assim como o sinal em δ 2,61 ppm, tem baixa razão sinal/ruído.

Esses sinais com baixa razão sinal/ruído, e que são relevantes para a discriminação, podem indicar que os parâmetros utilizados no filtro de T_2 não estejam otimizados. Em outras palavras: esses sinais podem ser de espécies que têm valores de T_2 próximos ao valor de tau empregado. Algo semelhante foi observado nos estudos utilizando amostras de sêmen já desenvolvidos pelo grupo de pesquisa (Neto, 2022). Para a confirmação dos metabólitos, assim como a rota metabólica envolvida, são necessários outros ensaios específicos como estudos das correlações para atribuir adequadamente esses sinais.

De acordo com a literatura, a isoleucina é um aminoácido essencial para o metabolismo energético e que em homens com diagnóstico de infertilidade a sua intensidade é diminuída, e quando observamos em relação aos grupos estudados, os pacientes que melhoraram os parâmetros seminais após a varicocelectomia e que podem ter chance de sucesso gestacional, este metabólito está mais intenso juntamente com o metabólito cujo sinal não foi atribuído. A isoleucina e infertilidade masculina não são pragmáticos, todavia pode estar relacionada ao metabolismo energético e ao estresse oxidativo culminando na espermatogênese (Qiao, 2017; Neto, 2020).

Estudos apontam relação entre VLDL e glutamato com obesidade ou sobrepeso por questões endócrinas de disfunção hipotalâmica. O fator obesidade está associada a menor produção de testosterona e estresse oxidativo. O glutamato é encontrado em abundância nos testículos, especificamente, no fluido seminal. Eis o motivo que as concentrações endógenas podem influenciar na fertilidade. Assim como, a metionina que é um dos aminoácidos responsáveis pela produção da carnitina e que está relacionada com a motilidade do espermatozoide, parâmetro este fundamental no aspecto da infertilidade masculina. Relacionando os metabólitos com os grupos, é observado que no grupo onde não houve melhora dos parâmetros seminal após a cirurgia, estão mais intensos (Da Silva, 2022; Gouveia, 2017; Cenci, 2016).

Salientamos que apesar da identificação desses metabólitos como variáveis importantes para a discriminação dos grupos em nosso estudo, a confirmação desses achados, as rotas metabólicas para uma melhor compreensão do mecanismo que explica o impacto da varicocele no quadro de infertilidade masculina precisam ser investigadas e confirmadas. Portanto, mais pesquisas são necessárias para esclarecer a importância desses metabólitos para a espermatogênese.

As funções discriminantes indicam o peso de cada variável na combinação linear. Considerando que escores maiores na função discriminante classificam a amostra no grupo Não-Melhora, aquelas variáveis que têm peso positivo, quando se apresentam mais intensas, levam a amostra a ser classificada no grupo Não-Melhora.

$$FD = 5,269 \times \delta_{0,85} - 5,227 \times \delta_{1,25} + 1,778 \times \delta_{2,09} - 4,866 \times \delta_{2,57} + 6,206 \times \delta_{2,61} - 1,376$$

Sendo assim, os sinais em δ (ppm) 0,85, 2,09 e 2,61 estão mais intensos nas amostras do grupo Não-Melhora, pois apresentaram pesos positivos nas funções discriminantes. Enquanto os sinais em δ 1,25 e 2,57 ppm estão mais intensos nas amostras do grupo Melhora, pois têm peso negativo. Portanto, aqueles que não apresentaram melhora dos parâmetros seminais tinham um nível mais elevado de lipoproteínas de baixa densidade, glutamato e metionina. Enquanto aqueles que apresentaram melhora tinham níveis séricos mais elevados de isoleucina e do metabólito não identificado.

Foram identificados três casos de falso-positivo e dois casos de falso-negativo. Com isto, a LDA demonstrou uma exatidão de 84,4%, como pode ser visto na Tabela 6.

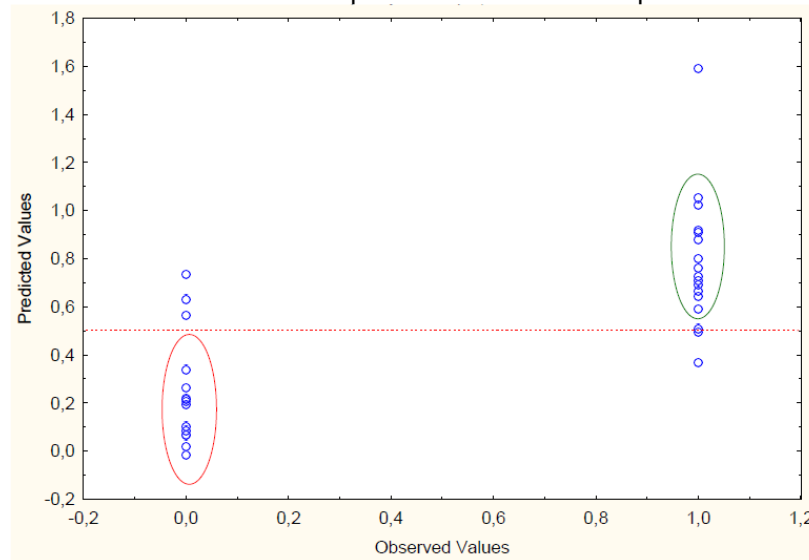
Tabela 6- Matriz de Confusão do Modelo LDA após Validação Cruzada

		Diagnóstico Clínico	
		Melhora	Não-Melhora
Modelo LDA	Melhora	15	3
	Não-Melhora	2	12

Exatidão = 84,4%; Sensibilidade = 88,2%; Especificidade = 80,0%; Valor Preditivo Positivo = 83,3%; Valor Preditivo Negativo = 85,7%. Fonte: Autoria Própria.

A Figura 32 apresenta o gráfico de escores na LDA, considerando as classes de interesse – Melhora (escore igual a zero) e Não-Melhora (escore igual a um).

Figura 32- Gráfico de escores da LDA. Elipse verde – Melhora. Elipse vermelha – Não-Melhora



Autoria própria.

A representação gráfica ajuda a compreender melhor essas classificações, pois o modelo classificou de forma equivocada apenas cinco amostras. Observando os valores das Figuras de Mérito do modelo está abaixo daqueles observados no trabalho de nosso grupo, usando amostras de fluido seminal, que alcançou 93,1% de exatidão (Neto *et al.*, 2022). No entanto, a modelagem aqui apresentada tem a vantagem de não constranger o paciente e pode ser utilizada como uma ferramenta de *screening*, sem alterar a rotina clínica do paciente.

Este é um trabalho piloto que necessita de ampliação do conjunto amostral, mas que apresenta resultados promissores. Vale salientar que a interpretação desses resultados não pode ser feita no sentido da identificação de biomarcadores individuais, pois a discriminação observada é alcançada a partir da combinação linear das intensidades relativas, no espectro de RMN de ^1H , das amostras. Ademais, o modelo LDA tem capacidade para predizer os pacientes que serão afetados positivamente pela varicocelectomia com o objetivo de melhorar os parâmetros seminais.

8 CONCLUSÃO

Os resultados indicam que a estratégia metabonômica baseada em RMN de ^1H tem potencial para ser usada como ferramenta no prognóstico para alterações dos parâmetros seminais pós-varicocelectomia, utilizando dados espectrais obtidos a partir de soro sanguíneo. Sendo considerada de uma grande vantagem e aplicabilidade por se tratar de um procedimento minimamente invasivo, simples, que requer uma preparação mínima da amostra, e reprodutível, que possibilita o estudo em larga escala (Emwas, 2019).

Como resultado deste estudo, por meio do LDA, a capacidade de classificar corretamente as amostras nos grupos Melhora e Não-Melhora, os modelos metabonômicos foram construídos com a exatidão de 84,4%. Após a validação por LOOCV, as figuras de mérito foram calculadas, resultando em 88,2% de sensibilidade, 80,0% de especificidade, valores preditivos positivo e negativo iguais a 83,33% e 85,71%, respectivamente. As variáveis selecionadas como importantes na discriminação dos grupos foram: δ (ppm) 0,85, 1,25, 2,09, 2,57 e 2,61, **confirmando a hipótese admitida que os espectros de RMN de ^1H , obtidos a partir do soro sanguíneo, possuem informações relevantes acerca da predisposição à melhora dos padrões seminais pós-varicocelectomia.**

No que pese os bons resultados observados, pelo menos duas regiões espectrais selecionadas têm intensidades reduzidas nos espectros tanto para as amostras do grupo Melhora, quanto no grupo Não-Melhora. Essa característica também foi observada no estudo realizado pelo grupo usando fluido seminal. Isso sugere que o filtro de T_2 não esteja otimizado para estudos visando prognóstico de melhora dos parâmetros seminais. Entretanto, a otimização do filtro de T_2 é outro estudo, que demanda mais tempo de máquina para execução e não estava previsto no projeto inicial.

O modelo construído pode ser de grande utilidade na prática clínica, ajudando na condução de homens que apresentam o diagnóstico de varicocele e infertilidade e que desejam saber sobre o efeito da varicocelectomia em relação ao impacto nos parâmetros seminais e consequentemente sua chance de sucesso gestacional. Utilizando a estratégia metabonômica, foi possível prever a melhora dos parâmetros

seminais, através do soro sanguíneo, uma vez que o exame rotineiramente realizado é o espermograma, cuja coleta pode causar constrangimento ao paciente, e neste caso, os resultados atingidos com o soro sanguíneo foram auspiciosos, podendo ser utilizado como uma ferramenta que pode auxiliar o médico na tomada de decisão e orientar o paciente sobre o prognóstico após a cirurgia.

9 PERSPECTIVAS

O presente trabalho possui oportunidades de melhoria e aprofundamento, visando a continuidade no projeto, como:

- Ampliar o número de amostras a fim de ser possível dividi-las em dois grupos: conjunto de treinamento e de teste, com amostras representativas em cada classe;
- Selecionar as variáveis discriminantes em cada modelo metabonômico e identificar quais metabólitos endógenos, através de RMN bidimensional, estão associados às possíveis discriminações a serem observadas no presente estudo;
- Investigar as rotas metabólicas envolvidas, para uma melhor compreensão do mecanismo que explica o impacto da varicocele no quadro de infertilidade masculina;

Os achados dessa pesquisa possibilitam a abertura para o desenvolvimento de trabalhos com a mesma estratégia, visando diagnóstico e prognóstico de enfermidades que acometem o sistema reprodutor masculino.

REFERÊNCIAS

- ARYA, Deepshikha; BALASINOR, Nafisa; SINGH, Dipty. **Varicocoele-associated male infertility: Cellular and molecular perspectives of pathophysiology**. *Andrology*, v. 10, n. 8, p. 1463-1483, 2022.
- ASHOUB, Aliaa H. et al. **Ameliorative effect of fractionated low-dose gamma radiation in combination with ellagic acid on nicotine-induced hormonal changes and testicular toxicity in rats**. *Environmental Science and Pollution Research*, [S.L.], v. 28, n. 18, p. 23287-23300. Springer Science and Business Media LLC. 2021.
- ANWARDEEN, Najeha R. et al. **Statistical methods and resources for biomarker discovery using metabolomics**. *BMC bioinformatics*, v. 24, n. 1, p. 1-18, 2023.
- ASRM (American Society for Reproductive Medicine). Practice Committee Of The American Society For Reproductive Medicine. **Diagnostic evaluation of the infertile male: A committee opinion**. *Fertility and Sterility*, v. 103, n. 3, p. e18–e25, 2015.
- BAHRAINI, Tahereh et al. **Density-oriented linear discriminant analysis**. *Expert Systems with Applications*, v. 187, p. 115946, 2022.
- BASKARAN, Kumaran et al. **Merging NMR Data and Computation Facilitates Data-Centered Research**. *Frontiers in molecular biosciences*, v. 8, p. 817175, 2022.
- BATISTA, Andrea Dória. **Validação de modelos metabonômicos por ressonância magnética nuclear de hidrogênio para predição de fibrose hepática significativa, fibrose hepática avançada e cirrose em pacientes com hepatite C crônica**. 2017.
- BECHT, Alexander et al. **Tracing the origin of paracetamol tablets by near-infrared, mid-infrared, and nuclear magnetic resonance spectroscopy using principal component analysis and linear discriminant analysis**. *Analytical and bioanalytical chemistry*, v. 413, p. 3107-3118, 2021.
- BERTOLOTTO, Michele et al. Varicocoele. **Classification and pitfalls**. *Andrology*, v. 9, n. 5, p. 1322-1330, 2021.
- BLAISE, Benjamin J. et al. **Statistical analysis in metabolic phenotyping**. *Nature Protocols*, v. 16, n. 9, p. 4299-4326, 2021.
- BRERETON, Richard G.; LLOYD, Gavin R. **Partial least squares discriminant analysis: taking the magic away**. *Journal of Chemometrics*, v. 28, n. 4, p. 213-225, 2014.
- BVS. **Biblioteca Virtual em Saúde**. MINISTÉRIO DA SAÚDE <https://bvsmis.saude.gov.br/infertilidade-masculina>. 2014.
- CROOK, Alexandra A.; PODERES, Roberto. **Metabolômica biomédica baseada em RMN quantitativa: situação atual e aplicações**. *Moléculas*, v. 25, n. 21, pág. 5128, 2020.

CANUTO, Gisele A. B. et al. **Metabolômica: definições, estado-da-arte e aplicações representativas**. Química Nova, v. 41, p. 75-91, 2018.

CENCI, Vitoria Hayduck et al. **Sinalização purinérgica induz estresse oxidativo e altera captação e metabolismo do glutamato em testículos de ratos imaturos**. Dissertação de Mestrado. 2016.

ÇAYAN, Settin; WOODHOUSE, Christopher R. J. **The treatment of adolescents presenting with a varicocele**. BJU international, England, v. 100, n. 4, p. 744–747, 2007.

CHANANA, Shaurya et al. **HCAPCA: Automated hierarchical clustering and principal component analysis of large metabolomic datasets in R**. Metabolites, v. 10, n. 7, p. 297, 2020.

CHENG, Jiye; YUAN, Chunhua; GRAHAM, Terrence L. **Potential defense-related prenylated isoflavones in lactofen-induced soybean**. Phytochemistry, v. 72, n. 9, p. 875-881, 2011.

CHONG, Jasmine; XIA, Jianguo. **Using MetaboAnalyst 4.0 for metabolomics data analysis, interpretation, and integration with other omics data**. Computational methods and data analysis for metabolomics, p. 337-360, 2020.

COLNAGO, L. A.; ALMEIDA, F. C. L.; VALENTE, A. P. **Espectrometria de massa e Rmn multidimensional e multinuclear: revolução no estudo de macromoléculas biológicas**. Atualidades em Química, v. 17, n. 11, p. 9-14, 2002.

COLNAGO, Luiz Alberto; ANDRADE, Fabiana Diuk de; **"RMN no domínio do tempo: fundamentos e aplicações offline e online"**. In: Biotecnologia Aplicada à Agro&Indústria - Vol. 4. São Paulo: Blucher, p. 439 -470, 2017.

DA COSTA, Tássia Brena Barroso Carneiro. **Análise metabonômica de soro sanguíneo de usuários de crack a partir de RMN de ¹H**. Tese de Doutorado. 2020.

DA CUNHA, Danyelle Alves. **Estudo da validação de um método de quantificação de lactose e da adulteração de leite por RMN de ¹H**. Tese de Doutorado. 2020.

DA SILVA, Nágela Ludmilla Rodrigues; MAIA, Carla Soraya Costa. **INFERTILIDADE MASCULINA E SUA RELAÇÃO COM ESTADO NUTRICIONAL**. Coletânea de Monografias do curso de medicina da UECE, p. 365, 2022.

DAI, Li-shang et al. **¹H NMR-based metabonomic evaluation of the pesticides camptothecin and matrine against larvae of *Spodoptera litura***. Pest Management Science, v. 77, n. 1, p. 208-216, 2021.

DE ALMEIDA, Lucas Gama. **Uso de ressonância magnética nuclear sem solvente deuterado (No-D NMR) para análise de cocaína e seus adulterantes**. Dissertação de Mestrado. 2014.

DONA, Anthony C. et al. **A guide to the identification of metabolites in NMR-based metabonomics/metabolomics experiments**. Computational and structural biotechnology journal, v. 14, p. 135-153, 2016.

EMWAS, Abdul-Hamid et al. **NMR spectroscopy for metabolomics research**. Metabolites, v. 9, n. 7, p. 123, 2019.

EMWAS, Abdul-Hamid M. **The strengths and weaknesses of NMR spectroscopy and mass spectrometry with particular focus on metabolomics research.** *Metabonomics: Methods and protocols*, p. 161-193, 2015.

ENGELSEN, Søren B. et al. **Chemometric exploration of quantitative NMR data.** *Emagres*, v. 2, p. 267-278, 2013.

FERLIN, Alberto; FORESTA, Carlo. **Infertility: practical clinical issues for routine investigation of the male partner.** *Journal of Clinical Medicine*, v. 9, n. 6, p. 1644, 2020.

FERREIRA, Marcia Miguel Castro. **Quimiometria: conceitos, métodos e aplicações.** Editora da UNICAMP, 2015.

FOREZI, L. S. M.; CASTELO-BRANCO, F. S. **Editando espectros de RMN com o software MestReNova: um guia prático.** *Rev Virtual Quim*, v. 9, n. 6, p. 2650-2672, 2017.

GILL, K. et al. **The higher risk for sperm DNA damage in infertile men.** *Ginekologia Polska*, v. 90, p. 684–691, 2019.

GOUVEIA, Liana Ribeiro et al. **Diagnosis of coinfection by schistosomiasis and viral hepatitis B or C using ¹H NMR-based metabonomics.** *Plos one*, v. 12, n. 8, p. e0182196, 2017.

GROMSKI, Piotr S. et al. **A tutorial review: Metabolomics and partial least squares-discriminant analysis—a marriage of convenience or a shotgun wedding.** *Analytica chimica acta*, v. 879, p. 10-23, 2015.

HASSANIN, A. M.; AHMED, H. H.; KADDAH, A. N. **A global view of the pathophysiology of varicocele.** *Andrology*, v. 6, n. 5, p. 654-661, 2018.

HTUN, Khin Thandar et al. **Identification of metabolic phenotypes in young adults with obesity by ¹H NMR metabolomics of blood serum.** *Life*, v. 11, n. 6, p. 574, 2021.

JACOBSON, Bertil; ANDERSON, Weston A.; ARNOLD, James T. **A proton magnetic resonance study of the hydration of deoxyribonucleic acid.** *Nature*, v. 173, n. 4408, p. 772-773, 1954.

JENSEN, Christian Fuglesang S. et al. **Varicocele and male infertility.** *Nature Reviews Urology*, v. 14, n. 9, p. 523-533, 2017.

KOKOVA, Daria; MAYBORODA, Oleg A. **Twenty years on: Metabolomics in helminth research.** *Trends in parasitology*, v. 35, n. 4, p. 282-288, 2019.

KOSTIDIS, Sarantos et al. **¹H-NMR analysis of feces: new possibilities in the helminthes infections research.** *BMC infectious diseases*, v. 17, n. 1, p. 1-8, 2017.

KRAUSZ, Csilla; RIERA-ESCAMILLA, Antoni. **Genetics of male infertility.** *Nature Reviews Urology*, v. 15, n. 6, p. 369-384, 2018.

KWON, Yong-Kook et al. **An integrated analysis for determining the geographical origin of medicinal herbs using ICP-AES/ICP-MS and ¹H NMR analysis.** *Food chemistry*, v. 161, p. 168-175, 2014.

LAVINE, Barry. K., & WORKMAN, Jerome. **Chemometrics**. Analytical Chemistry, 85(2), 705–714. 2012.

LEVITT, M. H. **Spin Dynamics: Basic Principles of NMR Spectroscopy**. Wiley, vol. 2, p.714, 2010.

LEVITT, Malcolm H. **Dinâmica do spin: fundamentos da ressonância magnética nuclear**. John Wiley & Filhos. 2013.

LIMA-OLIVEIRA, Gabriel et al. **Pre-analytical phase management: a review of the procedures from patient preparation to laboratory analysis**. Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation, v. 77, n. 3, p. 153-163, 2017.

LINDGREN, Mark C. **Male infertility**. Physician Assistant Clinics, v. 3, n. 1, p. 139-147, 2018.

LOMBOY, J. R.; COWARD, R. M. **The Varicocele: Clinical Presentation, Evaluation, and Surgical Management**. Seminars in Interventional Radiology, v. 33, n. 3, p. 163–169, 2016.

LÓPEZ-BOTELLA, A. et al. **Impact of Heavy Metals on Human Male Fertility—An Overview**. Antioxidants, v. 10, n. 9, p. 1473, 15 set. 2021.

MACEDO, Luciana Conci; FONSECA, Renata Pâmella. **Varicocele: A Principal Causa da Infertilidade Masculina**. Saúde e Pesquisa, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 167, 2015.

MAHESHWARI, Abha et al. **A review of varicocele treatment and fertility outcomes**. Human Fertility, v. 25, n. 2, p. 209-216, 2022.

MARQUES, Ronmilson Alves. **Metabonômica aplicada à avaliação da qualidade do fluido seminal: identificação de infertilidade associada à varicocele & prognóstico de melhora dos padrões seminais pós-varicocelectomia e impacto no sucesso gestacional**. 2022.

MARTELLO, Reginaldo et al (ed.). **Manual Ilustrado de Infertilidade Masculina**. Rio de Janeiro: Sociedade Brasileira de Urologia, 2015.

MARTINS, Elizabeth Rose Costa et al. **Vulnerabilidade de homens jovens e suas necessidades de saúde**. Escola Anna Nery, v. 24, 2020.

MAZZOLA, Alessandro A. **Ressonância magnética: princípios de formação da imagem e aplicações em imagem funcional**. Revista brasileira de física médica , v. 3, n. 1, pág. 117-129, 2009.

MEHRPARAVAR, Bahareh et al. **Metabolomics of male infertility: a new tool for diagnostic tests**. Journal of Reproduction & Infertility, v. 20, n. 2, p. 64, 2019.

MLYNÁRIK, Vladimír. **Introdução à ressonância magnética nuclear**. Analytical Biochemistry , v. 529, p. 4-9, 2017.

MOORE, Keith L. **Anatomia orientada para a clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2018.

NETO FTL, Marques RA, de Freitas Cavalcanti Filho A, et al. **"Metabonômica baseada em RMN de ^1H para diagnóstico de infertilidade em homens com varicocele"**. J. Assist Reprod Genet, v. 37, n. 9, 2020.

Neto, Filipe Tenorio Lira, Ronmilson Alves Marques, Alexandre De Freitas Cavalcanti Filho, João Eduardo Freire Da Fonte, Salvador Vilar Correia Lima e Ricardo Oliveira Silva. **"Prediction of Semen Analysis Parameter Improvement after Varicocoelectomy Using ^1H NMR-based Metabonomics Assays."** Andrology (Oxford), v. 10, n. 8, 2022.

OLIVEIRA, Luciana Coutinho; ABIKO, Layara Akemi; SALINAS, Roberto Kopke. **Ressonância magnética nuclear de proteínas.** 2017.

PALOMARES, Cristofher Victor Vivas. **Efeito citotóxico de nanopartículas de prata em células envolvidas na imunidade/reparação tecidual: um estudo usando metabolômica baseada em ^1H -RMN.** Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2022.

PATTI, Gary J.; YANES, Oscar; SIUZDAK, Gary. **Metabolomics: the apogee of the omics trilogy.** Nature reviews molecular cell biology, v. 13, n. 4, p. 263-269, 2012.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to Spectroscopy.** Thomson Learning, v. I, 2001.

PILON, Alan C. et al. **Metabolômica de plantas: métodos e desafios.** Química Nova, v. 43, p. 329-354, 2020.

PONTES, T. A. et al. **Osteopenia-osteoporosis discrimination in postmenopausal women by ^1H NMR-based metabonomics.** PLoS one, v. 14, n. 5, p. e0217348, 2019.

QIAO, S.; Wu W.; Chen, M. et al. **"Abordagem da metabolômica do plasma seminal para o diagnóstico de infertilidade masculina inexplicada "**. PLoS one, v. 12, n. 8, 2017.

RODRIGUES, Milena Lima et al. **Assessment of periportal fibrosis in Schistosomiasis mansoni patients by proton nuclear magnetic resonance-based metabonomics models.** World Journal of Hepatology, v. 14, n. 4, p. 719, 2022.

RODRIGUES, Larissa de Oliveira. **Análise de citocinas inflamatórias no plasma seminal de pacientes com varicocele.** Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP. 2022.

RODRIGUES, Milena Lima. **Discriminação de pacientes com fibrose periportal esquistossomótica por metabonômica.** Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2020.

SANTIAGO, Gabriela Torres et al. **NMR-based metabonomic approach reveals changes in the urinary and fecal metabolome caused by resveratrol.** Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis, v. 162, p. 234-241, 2019.

SILVA, Hélder Vinícius Carneiro da. **Análise metabonômica para discriminação de pacientes com varicocele quanto sua fertilidade usando dados clínicos e**

cromatografia a líquido. Dissertação de Mestrado. Universidade Federal de Pernambuco. 2021.

SILVA, Ronaldo Dionísio da. **Aplicações metabonômicas usando ressonância magnética nuclear de ^1H : diagnóstico não-invasivo de câncer de próstata e urológico & classificação de oliva extravirgem de produção orgânica.** Universidade Federal de Pernambuco. 2017.

SILVEIRA, Lucas Valentim. **Varicocele e sua relação com a infertilidade masculina.** Universidade Federal de Santa Catarina. 2022.

VEEMAN, W.S. **Nuclear magnetic resonance, a simple introduction to the principles and applications.** Geoderma, v. 80, p. 225–242, 1997.

VERMEULEN, Alex; VERDONCK, Lieve; KAUFMAN, Jean M. **A critical evaluation of simple methods for the estimation of free testosterone in serum.** The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism, v. 84, n. 10, p. 3666-3672, 1999.

VILLAR, J. D. F. **Fundamentos e Aplicações da Ressonância Magnética Nuclear: Aspectos Quânticos da Ressonância Magnética Nuclear.** AUREMN, 2a ed. Rio de Janeiro. 2002.

VINHAL, Gustavo Siqueira. **Análise do FID na ressonância magnética por imageamento.** CEEL. 2019.

WISHART, David S. et al. **HMDB 5.0: the human metabolome database for 2022.** Nucleic acids research, v. 50, n. D1, p. D622-D631, 2022.

WHO (WORLD HEALTH ORGANIZATION) et al. **WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen.** 2010.

WORLEY, Bradley; POWERS, Robert. **Multivariate analysis in metabolomics.** Current metabolomics, v. 1, n. 1, p. 92-107, 2013.

XIE, Guobo; JIANG, Jiawei; SUN, Yuping. **LDA-LNSUBRW: IncRNA-disease association prediction based on linear neighborhood similarity and unbalanced bi-random walk.** IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics, v. 19, n. 2, p. 989-997, 2020.

XU, Yu et al. **An atlas of genetic scores to predict multi-omic traits.** Nature, v. 616, n. 7955, p. 123-131, 2023.

YAN, Sylvia et al. **Should the current guidelines for the treatment of varicoceles in infertile men be re-evaluated?** Human Fertility, v. 24, n. 2, p. 78-92, 2021.

YU, Mengqian et al. **Metabonomics research progress on liver diseases.** Canadian Journal of Gastroenterology and Hepatology, v. 2017, 2017.

ZINI, Armand; BOMAN, Jason M. **Varicocele: red flag or red herring?** Seminars in reproductive medicine, United States, v. 27, n. 2, p. 171–178, 2009.

ZIRA, Athina N. et al. **^1H NMR metabonomic analysis in renal cell carcinoma: a possible diagnostic tool.** Journal of proteome research, v. 9, n. 8, p. 4038-4044, 2010.

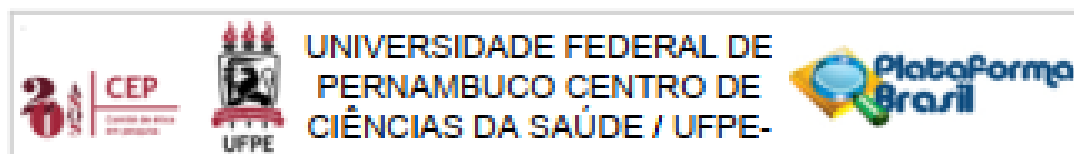
APÊNDICE A – PLANILHA MATRIZ DOS DADOS PROCESSADOS NO METABOANALYST

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC					
1	Title,Class,0	77243,0	812392,0	852353,0	892314,0	932275,0	972236,1	10122,1	105216,1	109212,1	113208,1	117204,1	1212,1	125196,1	129192,1	133189,1	137185,1	141181,1	145177,1	149173,1	153169,1	157165,1	161161,1	165157,1	169153,1	17315,1	177146,1	181142,1	185138,1	189134,1	19313,1	197126,2	201122,2	205118,2
2	EV_51,0,0	609873001,1	930661556,12	78161819,30	11863568,22	53729007,20	24399374,15	408657216,34	9317812,4	3681129,0	771293181,1	66405127,6	421860537,13	23083114,24	96163641,39	94912118,38	6212739,6	062994829,5	271411763,14	63021185,5	725907708,1	706252												
3	EV_52,1,0	631913411,5	606153741,29	79102135,30	43355469,19	54741513,21	35835875,8	688081353,8	557342268,0	641601767,0	776647907,3	650656899,10	10259466,25	49202347,31	50007947,42	86526557,9	520605154,5	438739229,6	393307437,13	50711497,2	168717871													
4	EV_53,0,0	539662834,5	878129135,38	80791628,41	08389073,25	64093605,23	29553821,9	975064558,10	11464911,1	418583499,1	354844603,7	499528105,12	76797717,34	53910355,48	67861596,60	3596454,15	94778608,7	020276923,8	851082959,11	39884876,3	028359494													
5	EV_56,1,1	827998996,7	020884551,31	48738195,37	52423951,22	93890331,15	8743646,5	898673812,5	786687586,0	802406362,1	708691031,7	671288795,15	53904642,32	04009181,49	26866463,71	27834725,13	07376705,4	327739528,7	440208101,9	098664198,1	343847267													
6	EV_57,0,1	483415659,10	25697365,34	98658045,29	37058799,22	85717004,16	35225194,6	367533688,4	271946257,1	569168551,2	151449106,6	294415159,13	64516666,30	81012567,40	62777594,46	21625922,10	39840712,7	135339734,11	38964387,8	50620328,3	306258456,3													
7	EV_59,1,0	649840964,5	087687959,31	45253774,42	9201095,28	39052095,23	49005671,9	08369364,7	457336306,1	60640473,1	786311304,5	494687766,12	77632421,31	56092667,51	31448053,61	95170509,19	97509082,8	352847722,8	189895507,14	72673503,4	12519151,4													
8	EV_63,1,0	290759417,4	979541002,33	57847539,36	35537408,19	12608184,19	47559578,8	200544946,7	716188748,1	46961407,1	1275429695,3	635921665,10	53092892,30	06556406,38	3868138,80	0623889,15	06019238,5	900157207,4	652025783,14	75478796,3	02122222,2													
9	EV_78,0,0	643805393,4	942731133,26	37278641,24	81681369,17	14031794,17	34159848,7	429741751,6	952501251,1	449681485,1	566281526,4	596092191,10	81763316,22	27653856,27	20406525,52	65731151,10	11817278,5	525563488,8	383047797,11	64905188,3	092796508,2													
10	EV_86,1,0	582522251,6	002828676,39	88074255,48	4347185,27	46522481,4	61321417,6	032610369,5	381122387,1	483599282,1	965872075,4	606004668,14	35819616,45	71690775,83	41098066,77	99140406,24	78347074,8	480867373,5	296095179,7	172397902,3	43135190,3													
11	EV_89,1,0	44763382,2	91976828,23	94779688,36	52416978,26	3146755,15	22543738,9	037690655,6	385666045,2	052428332,1	410806336,3	119602978,8	273269162,28	51285718,59	46900338,86	48673647,47	49203214,13	50231123,6	330570667,13	16194696,4	039416178,4													
12	EV_90,0,0	830854056,1	885350969,14	23604263,36	63103895,32	67144398,17	66371417,15	2495894,6	801647735,4	680004003,1	170350307,2	040353201,6	733407282,18	45091054,0	24244553,53	80055475,70	95274497,8	007522479,3	950666702,7	605415193,6	7207765													
13	EV_91,0,0	548104239,2	310505671,19	79578252,32	54421508,20	83734128,15	52241132,12	30042612,5	636621055,3	51290998,0	843909239,2	154515933,6	67825689,19	81017011,35	51602321,56	04261823,41	94637678,5	00395247,3	503981967,10	21741138,4	010540754,1	12811												
14	EV_93,0,0	569404675,6	071448799,33	22757852,33	34184507,17	60091815,16	26067208,7	496440407,6	934445002,1	61923185,1	509995089,3	769583922,12	64824981,28	5092469,39	11888339,82	47259355,18	69650998,7	397069776,5	795377713,14	19703878,3	879942716													
15	EV_96,1,-0	328864563,6	408832504,37	03994349,45	06637508,27	28696066,16	03372363,7	260757448,5	758773528,1	34999149,1	127915622,3	59866541,14	26848389,46	71718692,87	63856989,99	74653626,31	76970955,12	72176255,7	788599646,10	77096129,5	2920249													
16	EV_100,1,1	909100958,12	73057734,39	50250989,39	70248037,18	7993955,13	46189792,7	231595036,5	250584696,1	946455442,2	835352759,7	1417683,20	78264551,51	05851781,75	69430865,84	68189582,14	92751008,6	071891992,7	223390533,7	53262744,3	257518993,5													
17	EV_104,0,1	97706561,5	53432044,36	28331771,46	50142772,22	05235108,14	41832601,0	02279447,7	4024895,1	980960237,2	023968045,4	376865149,11	42957543,36	20236511,57	31583292,64	16230879,30	54583684,5	276579597,3	181242514,11	75903304,2	683147554,2													
18	EV_115,1,0	841302283,8	997131055,35	07214709,44	10512098,22	83752592,10	660499,5	176847924,3	704516538,1	655064835,2	060768212,5	348503334,15	85236334,47	52724508,87	7896667,86	45567711,25	19917888,9	986205565,8	976102292,9	42457138,5	241552923,7													
19	EV_117,0,0	495508026,3	069120188,21	97646042,34	10591662,24	50436701,19	0349889,10	83575878,8	729565258,2	011155705,1	442183669,2	913311675,7	845018587,21	18935095,41	24547387,69	43179777,38	44081033,10	61785577,6	031798574,15	15075411,4	769003607,4													
20	EV_118,0,0	748459181,4	602732056,35	57420705,45	4869914,21	55622563,17	65677765,7	350882087,7	023124066,1	792354479,1	676311452,4	080735484,10	89683303,33	66688313,53	33861566,55	18546511,15	03694221,7	361862619,5	140791734,13	09234156,4	206590324													
21	EV_119,0,0	545606535,5	651792773,31	37671099,38	07148035,19	33869479,14	08457818,6	69319434,6	164271965,1	383484341,1	1575726251,3	890356209,11	12149777,29	36415364,48	39761004,63	01660741,17	07303213,7	069765272,4	573331045,11	89880041,3	530637964,3													
22	EV_120,1,0	855449562,5	705407572,29	93398225,39	773354,22	16025807,16	01350225,6	972866568,6	959475788,1	656168018,1	1774073037,3	947348721,11	03184695,30	80255797,57	57510709,67	8950185,19	37967515,7	91167874,5	645434215,10	94936932,3	983380641,4													
23	EV_136,1,0	331097152,2	131665165,21	52451533,38	41452838,27	83446488,17	56850651,11	15405761,6	620332924,2	689135766,1	553540172,2	642666684,7	80049713,24	22489553,49	92978048,77	07558968,49	67638475,10	81000692,5	853903231,14	81216808,5	135526343,3													
24	EV_137,1,0	349401049,5	245992073,36	04994215,42	07878272,25	89280798,17	53164893,8	251505403,6	478380135,1	817082125,1	738699125,5	19530226,15	1397979,38	72725591,70	56148608,79	25140425,30	84556783,12	26315557,7	454016861,9	51300846,4	485617354,5													
25	EV_141,1,0	330030458,1	734822156,16	49035808,36	0927888,20	06675152,14	74445232,10	33512338,5	132010228,2	769658032,1	031383581,3	09945978,8	310733399,16	4498941,31	02951321,38	46771325,44	2226658,6	375864897,4	596667693,10	54134083,4	129071878,1	184												
26	EV_142,0,0	634094553,1	623695283,10	16762901,28	97875808,33	2677515,21	38473164,14	9129203,7	021973251,4	956815233,2	057551141,4	090813055,8	350273894,14	26570474,36	64300185,69	13710072,64	66269685,14	1150199,7	20382694,14	70708716,6	309382156,3	9												
27	EV_143,0,0	288131513,0	767996345,7	251142046,29	06824508,40	98653021,25	85350588,17	64105298,7	516533956,4	651910409,1	677098656,2	317030141,7	277906509,12	42482539,33	2093887,64	0527774,74	8690532,16	94399694,8	340879419,14	25993429,6	485034767													
28	RP_01,1,0	34301063,3	226977803,19	06542202,36	26909366,17	46343209,12	23061891,8	722685438,6	265420568,2	139644299,1	627717128,2	653578272,7	77984168,19	74388165,68	91558856,55	57027478,24	13508558,9	332111079,6	575375155,9	297032179,5	15874952,6													
29	RV_06,0,2	015772908,8	94675797,35	81973111,60	93028481,16	75901238,12	56499598,5	261201514,4	661453234,1	750362947,2	654278483,4	785261924,13	05035658,40	68108851,121	4558242,72	84654329,22	13494742,6	153430235,3	971108285,9	824425873,4	99399083,1													
30	RV_09,1,2	634017235,17	2986898,38	81287622,20	60849159,12	30343553,10	85505639,6	769268415,4	155193831,2	045247765,2	954700493,6	864979574,19	46958984,44	67737232,46	37168369,36	14083228,7	092692092,5	327509696,10	00815847,8	716132433,3	8325298													
31	RV_12,1,0	651401187,1	729237777,21	3266457,56	80651222,38	95613285,12	62060696,9	503101424,5	164231097,3	806340991,2	470530155,3																							

APÊNDICE B- PLANILHA MATRIZ DOS DADOS PROCESSADOS NO STATISTICA

A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	V	W	X	Y	Z	AA	AB	AC
Title	Class																											
EV_51	0	-0,629	-1,033	-1,56	-1,036	-0,094	1,0234	1,9959	-0,333	1,0532	-1,213	-1,726	-1,365	-1,635	-1,573	-1,875	0,616	-0,846	-0,813	1,3446	0,7007	-1,349	-1,317	-1,032	-0,745	0,9937	0,6108	-1,031
EV_52	1	-0,537	0,032	0,3509	-1,011	-0,656	1,314	-0,24	1,3545	-1,345	-1,132	-0,518	-0,293	-0,295	-1,204	-1,657	-1,123	-1,046	-0,152	0,8484	-1,631	-1,201	-1,175	-0,771	0,865	0,5387	-1,335	-1,384
EV_53	0	-0,258	0,1777	1,2464	0,5119	0,3594	1,7298	0,2391	2,5763	-0,563	-0,333	1,8266	0,4663	0,5988	-0,302	-0,39	-0,751	-0,428	1,2977	-0,054	-0,823	-0,439	-0,417	0,2729	1,0005	0,4319	-0,449	-0,17
EV_56	1	1,1541	0,5696	0,3313	-0,268	-0,228	-0,313	-1,009	-0,267	-0,531	0,4097	2,0678	1,1751	0,2114	-0,391	0,1879	-0,918	-1,173	0,6845	-0,939	-1,494	-0,78	-0,641	-0,084	0,5093	-0,517	-0,905	-0,14
EV_57	0	-1,018	1,2781	1,2943	-0,794	0,2236	0,0889	-1,09	-2,662	-1,694	-1,136	0,5542	0,7908	0,5736	-0,453	-0,998	-1,085	-0,694	2,6001	-1,532	-1,685	-0,8	-0,547	0,5198	2,2673	-0,964	-2,257	-0,735
EV_59	1	-0,32	-0,203	0,6356	1,2104	1,0935	2,0496	-0,148	0,3774	-1,021	-0,693	0,3841	0,4864	0,4655	0,0328	0,0755	-0,482	-0,091	0,759	1,4291	-0,566	-0,309	-0,092	1,3925	2,3919	2,3472	-0,427	-0,701
EV_63	1	-0,263	-0,027	0,6338	-0,292	-0,81	0,6686	-0,331	0,9165	-0,394	-0,224	-0,238	-0,127	0,0895	-0,898	1,0386	-0,805	-0,759	-0,884	1,3199	-0,709	-0,709	-0,701	-0,352	0,7953	1,2801	0,2193	0,0715
EV_78	0	-1,245	-0,319	0,0973	-1,744	-1,021	0,3166	-0,812	-0,155	-1,379	-1,181	-0,32	-0,116	-0,556	-1,38	-0,594	-1,097	-1,199	0,7978	0,0293	-1,5	-1,11	-0,983	-0,259	0,696	0,1517	-0,795	-0,614
EV_86	1	1,0183	0,451	0,9246	0,8276	0,2856	-0,689	-0,792	-0,128	0,4461	1,2643	0,8143	0,8129	1,2586	1,0387	0,2367	-0,353	0,2333	-0,089	-1,518	0,2366	0,8898	0,8175	0,7121	0,115	-0,437	0,4713	1,2926
EV_89	1	0,428	-0,41	-0,471	-0,518	0,2592	-0,5	0,0122	0,2514	0,3848	0,4228	-0,187	-0,685	-0,186	0,0645	1,1423	0,87	1,6937	0,2079	0,6395	0,27	0,4794	0,6392	0,5461	-0,708	-0,93	-0,045	0,2002
EV_90	0	0,0586	-0,876	-1,41	-0,218	1,5506	0,2076	2,0005	0,24	1,5446	-0,376	-1,16	-1,185	-1,101	-0,785	-0,941	2,343	-0,082	-1,292	-1,611	1,5781	-0,968	-0,956	-1,429	-1,949	-1,12	0,6162	-0,325
EV_91	0	0,446	-0,577	-0,875	-1,058	-0,609	-0,422	1,0144	-0,267	1,1922	-0,026	-0,713	-1,096	-1,016	-1,132	-1,006	0,5916	-0,909	-1,21	-0,484	0,2229	-0,937	-0,993	-1,265	-1,458	-0,526	0,1949	-0,374
EV_93	0	-0,628	0,1557	0,7486	-0,529	-1,007	-0,098	-0,665	0,1221	-0,738	-0,586	-0,472	0,4408	0,0443	-0,76	1,5881	-0,577	-0,373	-0,504	1,1519	-0,518	-0,471	-0,635	-0,876	-0,273	0,1364	-0,199	-0,262
EV_96	1	0,7968	0,605	0,5575	0,1875	0,1549	-0,406	-0,377	0,2797	0,636	1,1353	0,5167	0,7678	1,2067	1,0757	1,4213	-0,057	1,434	1,1486	-0,217	1,4211	1,6674	1,3961	1,6193	0,9542	0,514	0,9882	1,6317
EV_100	1	1,5485	2,0222	1,013	-0,143	-0,965	-0,936	-0,515	-0,411	0,4304	1,5407	1,9119	2,4308	1,9091	0,8214	0,9187	-0,826	-0,537	0,6907	-1,446	-0,092	0,6395	0,1183	-0,183	0,1293	-0,517	-0,454	0,1648
EV_104	0	1,1341	0,1598	0,8619	1,1187	-0,346	-0,668	0,2843	0,7697	0,0617	0,5099	0,2634	0,1036	0,6652	0,0673	-0,267	0,0356	-0,913	-1,554	0,101	-0,788	-0,547	-0,612	-1,082	-1,046	-0,235	-0,075	-0,199
EV_115	1	1,0812	1,1367	0,5112	0,3189	-0,385	-1,596	-1,066	-1,231	0,4585	1,233	1,1234	1,1786	1,4667	1,2956	0,872	-0,324	0,6542	1,586	-0,73	1,1724	1,6677	1,0668	0,7493	-0,033	-1,127	0,1679	1,2316
EV_117	0	-1,13	-0,825	-0,467	-0,23	0,3732	0,7914	0,4889	1,3482	-0,806	-1,062	-1,237	-1,008	-0,711	-0,554	0,7549	0,6772	0,7267	-0,538	1,6338	-0,164	-0,141	-0,046	-0,018	-0,01	1,0318	0,2916	-0,421
EV_118	0	-0,624	-0,295	1,0546	1,5078	-0,254	0,3164	-0,741	0,1306	-0,728	-0,58	-0,362	-0,071	0,648	0,0957	-0,585	-0,792	-0,41	-0,933	0,6779	-0,381	-0,286	-0,417	-0,33	0,4408	0,7763	-0,226	-0,486
EV_119	0	-0,681	0,0292	0,548	0,2484	-0,683	-0,703	-0,955	-0,474	-0,92	-0,566	-0,42	-0,002	0,1456	-0,217	0,0159	-0,673	-0,494	-1,209	0,151	-0,774	-0,427	-0,502	-0,899	-0,453	-0,302	-0,641	-0,617
EV_120	1	-0,36	0,0607	0,3663	0,4832	-0,18	-0,172	-0,84	0,1604	-0,679	-0,331	-0,344	-0,025	0,2859	0,2897	0,3748	-0,539	-0,186	-0,57	-0,26	-0,422	0,0749	0,0006	-0,194	-0,12	-0,262	-0,591	-0,29
EV_136	1	-0,337	-0,818	-0,629	0,066	0,7203	0,1872	0,6383	0,099	0,2881	-0,11	-0,844	-0,897	-0,497	-0,251	0,8703	1,1519	0,841	-0,289	1,3569	0,5626	-0,005	0,048	0,0863	-0,537	0,4654	0,4801	-0,079
EV_137	1	0,0679	0,1049	0,8096	0,4173	0,2734	0,1117	-0,272	0,1775	0,0331	0,3862	0,7433	1,0761	0,8888	0,7305	0,8033	0,0403	1,3186	0,6773	-0,783	0,3677	0,7792	0,7065	0,6923	0,0312	-0,599	-0,194	0,1549
EV_141	1	-0,721	-1,048	-1,147	-0,125	-0,569	-0,529	0,3399	-1,18	0,0816	-0,88	-0,811	-0,802	-1,287	-1,237	-2,026	0,9245	-0,709	-1,137	-0,433	-0,298	-1,225	-1,33	-1,57	-2,06	-1,571	-0,245	-1,028
EV_142	0	-0,663	-1,138	-1,858	-1,204	1,9064	1,3588	1,9539	0,1517	1,4143	-0,223	-0,329	-0,812	-1,52	-0,889	0,5441	2,1921	1,9779	0,2637	1,385	1,0695	-0,371	0,2232	1,0968	-0,002	0,8296	1,2714	0,1301
EV_143	0	-0,535	-1,244	-2,167	-1,309	3,1051	2,4507	2,837	0,6757	1,4243	-0,167	-1,128	-1,065	-1,726	-1,142	-0,06	2,6426	2,9016	1,0022	1,1464	1,3506	-0,408	-0,059	1,2092	0,4698	1,125	1,7341	0,73
RP_01	1	-1,738	-0,91	-0,77	0,3412	-0,931	-1,2	-0,353	-0,826	-1,063	-1,349	-1,687	-1,093	-0,833	1,2916	-0,244	-0,179	0,2054	-0,38	-1,104	-0,135	0,6787	0,8019	-0,636	-1,221	-0,834	-0,134	-0,317
RV_06	0	2,4875	1,198	0,3586	1,9097	-1,382	-1,167	-0,844	-0,175	1,0722	2,2541	1,2025	0,4834	0,582	2,38	-0,46	-0,525	-0,284	-0,375	-0,506	1,4262	2,6874	1,5297	1,1663	0,6439	0,2504	0,8719	1,8482
RV_09	1	0,1175	3,5254	1,7354	-2,415	-1,974	-1,647	-1,139	-2,665	-1,232	-0,285	0,9818	2,6656	2,2445	-0,109	-1,963	-1,303	-1,372	1,7356	-1,405	-1,197	-0,704	-1,35	-2,179	-1,192	-2,938	-2,866	-2,559
RV_12	1	2,43	-0,09	-0,949	0,819	1,2482	-1,168	0,3429	0,5357	2,5304	2,7814	1,1624	-0,582	-0,392	1,6375	1,5259	0,1333	0,4183	-0,262	-0,543	2,1436	1,817	2,9656	2,0637	0,4078	0,537	2,0594	2,606
RV_14	1	-0,591	-0,891	-0,707	1,5424	0,2994	-0,206	-0,144	-0,135	-0,298	-0,123	-0,722	-0,641	-0,694	0,973	0,1428	0,084	-0,252	-0,965	0,2161	-0,066	0,4994	0,8455	0,0838	-0,315	0,4879	0,653	0,3254
RV_15	0	0,108	-0,803	-1,069	1,3843	0,2408	-0,193	0,1869	0,7435	0,3391	0,639	-0,337	-1,014	-0,836	1,4838	0,5544	0,1084	0,3536	-0,293	0,1354	0,7224	1,3062	1,6158	0,95	0,4048	0,9817	1,2074	1,3454

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA DA UFPE



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:

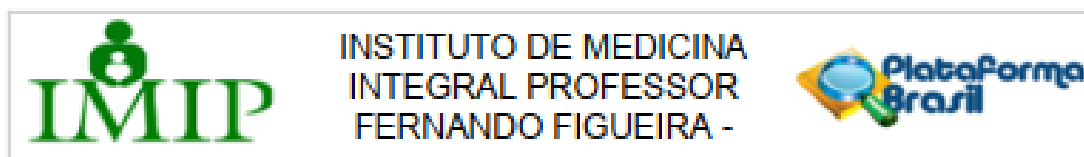
Trata-se de um Projeto de Pesquisa do Mestrado em Cirurgia do Programa de Pós-graduação em Cirurgia apresentado pelo aluno Felipe Tenório Lira Neto, sob a orientação do Prof.Dr. Salvador Vilar Correia Lima, cujo objetivo principal é proceder a Investigação da Varicocele Através de Análise Metabonômica 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 à varicocelectomia.

Desde o ano 2000, estudos metabonômicos têm sido utilizados para criar modelos que sejam capazes de auxiliar o diagnóstico e prognóstico das mais diferentes doenças. A construção de um modelo metabonômico por um meio não invasivo como a RMN de ¹H (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:** 50.740-900
UF: PE **Município:** RECIFE
Telefone: (81)2126-8588 **E-mail:** cepcca@ufpe.br

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO COMITÊ DE ÉTICA DO IMIP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: Filipe Tenório Lira Neto

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 64211917.1.3001.5201

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.075.028

Apresentação do Projeto:

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

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

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

Objetivo Secundário:

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

Endereço: Rua dos Coelhos, 300

Bairro: Boa Vista

CEP: 55.070-550

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2122-4756

Fax: (81)2122-4782

E-mail: comitedetica@imip.org.br