

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
Escola Paulista de Medicina
Programa de Pós-graduação em Urologia

Sophia Costa Araújo

**ANÁLISE METABOLÔMICA NO PLASMA SEMINAL DE PACIENTES
COM VARICOCELE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Mestra em Ciências.

São Paulo
2024

Sophia Costa Araújo

**ANÁLISE METABOLÔMICA NO PLASMA SEMINAL DE PACIENTES
COM VARICOCELE**

Dissertação apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Orientador(a):

Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla

São Paulo

2024

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Prof. Antonio Rubino de Azevedo,
Campus São Paulo da Universidade Federal de São Paulo, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Araújo, Sophia Costa

Análise metabolômica no plasma seminal de pacientes com varicocele /
Sophia Costa Araújo. - São Paulo, 2024.
xii, 52f.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de São Paulo, Escola
Paulista de Medicina. Programa de Pós-Graduação em Urologia.

Título em inglês: Metabolomic analysis in seminal plasma of patients
with varicocele.

1. Varicocele. 2. Infertilidade. 3. Metabolômica. 4. Metabólitos. 5.
Espectrometria de Massas.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM UROLOGIA

Chefe do Departamento:

Prof. Dr. Edson Khodor Cury

Chefe da Disciplina:

Prof. Dr. Fernando Gonçalves de Almeida

Coordenador(a) do Curso de Pós-graduação:

Profa. Dra. Paula Intasqui Lopes

Agradecimentos

A realização deste estudo foi possível graças ao apoio e contribuições de diversas pessoas e instituições, às quais gostaria de expressar minha sincera gratidão.

Primeiramente, quero agradecer meu orientador, Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla, pela orientação sábia e paciência. Seu conhecimento foi fundamental para moldar este trabalho.

À Prof.a Dra. Paula Intasqui, Prof.a Dra. Mariana Camargo e Prof.a Dra. Mariana Antoniassi pela disponibilidade e sugestões.

Agradeço aos meus pais, Denise e Orlando, pelo encorajamento constante. Suas palavras de incentivo foram a força motriz por trás desse trabalho.

Agradeço também às organizações e instituições que me auxiliaram nesse processo. À UNIFESP por proporcionar um ambiente propício à pesquisa e pelo acesso aos recursos necessários para a realização deste trabalho. À Universidade de São Paulo e Universidade Federal da Bahia, que colaboraram fornecendo dados, recursos e informações valiosas.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoas de nível Superior -CAPES (CAAE: 43300721.3.0000.5505), por financiar essa pesquisa.

Aos participantes desta pesquisa, pelo tempo e disposição. Sua contribuição é inestimável e profundamente apreciada.

Por último, mas não menos importante, agradeço a todas as pessoas que, de alguma forma, cruzaram meu caminho durante esta jornada. Cada conversa, conselho e encorajamento foram significativos para mim.

"O conhecimento é uma riqueza que não se perde quando é compartilhada." -

Alexandre Dumas

Resumo

Introdução: A varicocele é uma condição médica caracterizada pela dilatação anormal das veias do plexo pampiniforme. Em alguns casos, a varicocele pode afetar a fertilidade, uma vez que o aumento das veias pode elevar a temperatura local, prejudicando a produção e qualidade dos espermatozoides. A metabolômica se define como a identificação, quantificação e análise de um conjunto amplo de metabólitos para entender como os processos metabólicos estão funcionando em um sistema biológico específico. Essa técnica pode auxiliar na investigação dos processos bioquímicos associados à fertilidade masculina, além de doenças como a varicocele. **Objetivo:** Avaliar o perfil metabolômico de pacientes diagnosticados com varicocele, comparando-os com pacientes sem varicocele e apresentando normozoospermia. **Metodologia:** Trata-se de um estudo de coorte que realizou a análise metabolômica por cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS) em amostras de pacientes divididos, inicialmente, em dois grupos: (i) controle; (ii) com varicocele. Posteriormente, o grupo de varicocele foi dividido em: (iii) com varicocele e normozospermicos; (iv) com varicocele e sêmen alterado. **Resultados:** Considerando a comparação entre os três grupos de análise, foi observada diferença significativa nos metabólitos ureia (N_urea), serina (N_serine), ácido aspártico (N_aspartic acid), treitol (N_threitol), manitol (N_mannitol/sorbitol) e maltose (N_maltose/cellobiose) entre os grupos. Comparando apenas os dois grupos, foi observada diferença significativa nos seguintes metabólitos: fenilacetaldéido (N_phenylacetaldehyde), ureia (N_urea), serina (N_serine), treitol (N_threitol), ácido piroglutâmico (N_pyroglutamic acid), ribose (N_ribose) e N-acetilmanosamina (N_N-acetyl-D-mannosamine). **Conclusão:** Foram observadas diferenças significativas entre os grupos de análise.

Palavras-chave: Varicocele; Infertilidade; Metabolômica; Metabólitos; Espectrometria de Massas.

Abstract

Introduction: Varicocele is a medical condition characterized by the abnormal dilation of the veins of the pampiniform plexus. In some cases, varicocele can affect fertility, as the increased veins can elevate local temperature, impairing the production and quality of spermatozoa. Metabolomics is defined as the identification, quantification, and analysis of a wide array of metabolites to understand how metabolic processes are functioning in a specific biological system. This technique can assist in investigating the biochemical processes associated with male fertility, as well as conditions such as varicocele. **Objective:** To evaluate the metabolomic profile of patients diagnosed with varicocele, comparing them with patients without varicocele and presenting normozoospermia. **Methodology:** This is a cohort study that conducted metabolomic analysis using gas chromatography coupled with mass spectrometry (GC-MS) on samples from patients initially divided into two groups: (i) control; (ii) with varicocele. Subsequently, the varicocele group was divided into: (iii) with varicocele and normozoospermia; (iv) with varicocele and altered semen. **Results:** Considering the comparison between the three analysis groups, significant differences were observed in the metabolites urea (N_urea), serine (N_serine), aspartic acid (N_aspartic acid), threitol (N_threitol), mannitol (N_mannitol/sorbitol), and maltose (N_maltose/cellobiose) among the groups. Comparing only the two groups, significant differences were observed in the following metabolites: phenylacetaldehyde (N_phenylacetaldehyde), urea (N_urea), serine (N_serine), threitol (N_threitol), pyroglutamic acid (N_pyroglutamic acid), ribose (N_ribose), and N-acetyl-D-mannosamine (N_N-acetyl-D-mannosamine). **Conclusion:** Significant differences were observed among the analysis groups.

Keywords: Varicocele; Infertility; Metabolomics; Metabolites; Mass Spectrometry.

Sumário

Agradecimentos.....	v
Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Lista de figuras.....	x
Lista de tabelas.....	xi
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	xiii
1 INTRODUÇÃO	2
1.1 Infertilidade e varicocele	2
1.2 Metabolômica.....	7
2 OBJETIVO	12
3 MÉTODO.....	14
3.1 Características da população e coleta de amostra.....	14
3.2 Análise Seminal e separação do plasma.....	15
3.3 Preparo da amostra	16
3.4 Derivatização	17
3.5 Análise por GC-MS	17
3.6 Processamento dos dados e anotação dos metabólitos.....	18
3.7 Análise estatística	19
4 RESULTADOS.....	21
5 DISCUSSÃO	38
6 CONCLUSÕES	45

Lista de figuras

Figura 1. Mecanismos envolvidos na fisiopatologia da varicocele.....	17
Figura 2. Desenho do estudo.....	23

Lista de tabelas

Tabela 1. Apresentação dos parâmetros clínicos – Comparação entre os três grupos.....	28
Tabela 2. Apresentação dos parâmetros clínicos – Comparação entre os dois grupos.....	30
Tabela 3. Valores estatísticos para os metabólitos – Comparação entre os três grupos.....	32
Tabela 4. Valores estatísticos para os metabólitos – Comparação entre os dois grupos.....	36

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

OMS	Organização Mundial da Saúde
FSH	Hormônio folículo-estimulante
LH	Hormônio luteinizante
EROs	Espécies reativas de oxigênio
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
RNA	Ácido Ribonucleico
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo
GC-MS	Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas
IQ-USP	Instituto de Química da Universidade de São Paulo
QC	Controle de qualidade
DP	Desvio padrão
IC	Intervalo de confiança

1 INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Infertilidade e varicocele

Conforme as diretrizes estabelecidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS), a infertilidade conjugal é caracterizada pela não ocorrência de gestação após um ano de tentativas de concepção com relações sexuais regulares, sem a utilização de métodos contraceptivos, em mulheres na faixa etária reprodutiva (1). Estima-se que aproximadamente 15% dos casais em idade reprodutiva enfrentem dificuldades para conceber, sendo que a contribuição do fator masculino está presente em 50% dos casos (1,2).

Ao longo dos anos, a fertilidade masculina pode ser influenciada por diversos fatores adversos, tais como o avanço da idade, traumatismos testiculares, distúrbios ejaculatórios ou de penetração, baixa contagem ou motilidade espermática, deficiência hormonal de hormônios como o hormônio folículo-estimulante (FSH), hormônio luteinizante (LH) e testosterona, aumento da temperatura escrotal, uso de finasterida, estilo de vida sedentário, estresse psicológico, consumo de álcool, tabagismo e uso de substâncias psicoativas (3,4). Adicionalmente, doenças como caxumba, varicocele, infecções do trato urogenital, anomalias genéticas, doenças sexualmente transmissíveis, anomalias urogenitais congênitas ou adquiridas e fatores imunológicos também podem afetar negativamente a fertilidade masculina (3,5–8). É importante ressaltar que a exposição ocupacional a certas substâncias químicas, como pesticidas, metais e compostos de cloro, também pode ter impacto prejudicial sobre a capacidade reprodutiva masculina (5–7,9).

A varicocele, considerada a principal causa tratável de infertilidade masculina, é caracterizada pela presença de dilatação nas veias do plexo pampiniforme acompanhada de refluxo sanguíneo (6). Estima-se que a varicocele esteja presente em cerca de 35% dos homens com infertilidade primária e em até 80% dos homens com infertilidade secundária, sendo considerada responsável por um declínio progressivo da fertilidade (6,8). Essa anormalidade é mais comumente observada de forma unilateral no lado esquerdo, embora também possa ocorrer bilateralmente em aproximadamente 30% a 50% dos casos (6–8,10–12).

A varicocele apresenta uma predominância mais acentuada no lado esquerdo devido a três fatores principais. Primeiramente, a veia espermática no lado esquerdo é mais comprida e apresenta um percurso mais tortuoso. Além disso, essa veia insere-se na veia renal, o que a expõe a compressões intermitentes. Por fim, a veia espermática desemboca em ângulo reto em uma veia de menor diâmetro. Em contrapartida, no lado direito, a veia espermática desemboca na veia cava em um ângulo oblíquo (6,10–13). Os casos raros de varicocele isolada no lado direito requerem investigação adicional, pois podem estar associados a *situs inversus* ou tumores retroperitoneais (10,11,13).

A varicocelectomia é o procedimento cirúrgico utilizado para o tratamento da varicocele. Sua aplicação como tratamento para a varicocele começou a ser reconhecida a partir de 1952, quando Tulloch (14) relatou o primeiro caso de um homem diagnosticado com azoospermia por falha na maturação espermática. Nesse caso, a varicocelectomia bilateral resultou em uma melhora na contagem de espermatozoides e levou à ocorrência de uma gravidez espontânea. No entanto, foi somente em 1955 (15), quando Tulloch publicou uma série de resultados de pacientes submetidos à cirurgia, que a varicocelectomia passou a ser reconhecida como um tratamento importante para a infertilidade masculina (16,17).

Embora aproximadamente 80% dos homens com varicocele não apresentem comprometimento da fertilidade e não necessitem de técnicas de reprodução assistida para procriar, pesquisas indicam que mesmo aqueles com análise seminal normal ou histórico documentado de fertilidade podem estar sujeitos ao risco de deterioração da função testicular e diminuição da fertilidade (18,19). A fisiopatologia da infertilidade associada à varicocele ainda não está completamente esclarecida (15), entretanto, estudos têm levantado algumas hipóteses plausíveis para esse desfecho (Figura 1). Entre as principais hipóteses propostas, destacam-se as seguintes:

(i) Refluxo de metabólitos renais e adrenais: O refluxo de esteroides e catecolaminas (especialmente a norepinefrina) através das veias gonadais pode acarretar efeitos prejudiciais nos testículos. Níveis elevados de norepinefrina podem ocasionar constrição dos vasos sanguíneos intratesticulares e diminuição da perfusão arterial, resultando em hipóxia e aumento na geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) (10,11,15,18);

(ii) Desequilíbrios no eixo hipotálamo-hipófise-gonadal: O eixo hipotálamo-hipófise-gonadal desempenha um papel fundamental na regulação da função reprodutiva, envolvendo a liberação de hormônios como o hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH), hormônio luteinizante (LH) e hormônio folículo-estimulante (FSH). O estresse oxidativo e o aumento da temperatura local nos testículos podem interferir na regulação hormonal do eixo, possivelmente contribuindo para desequilíbrios hormonais que podem impactar as funções reprodutivas (19–21).

(iii) Alteração na pressão venosa: Quando a pressão venosa excede a pressão arterial, o fluxo sanguíneo adequado através do testículo fica comprometido. A redução do influxo arterial pode levar a uma subnutrição testicular, isquemia e liberação de EROs e outros fatores inflamatórios, culminando em aumento do estresse oxidativo. Gat et al. identificaram sinais histológicos de dano isquêmico nos testículos de homens com varicocele, incluindo degeneração das células germinativas, atrofia das células de Leydig e espessamento fibrótico das membranas basais dos túbulos seminíferos (20–22);

(iv) Hipertemia testicular: A drenagem venosa comprometida interfere na troca de calor em contracorrente vascular, resultando no aumento da temperatura relativa do escroto, afetando ambos os testículos. Como as funções celulares testiculares são extremamente sensíveis a variações de temperatura, a hipertemia causa redução na produção de testosterona pelas células de Leydig, lesões nas membranas das células germinativas, alterações nas proteínas e diminuição da função das células de Sertoli. A varicocelectomia restabelece a temperatura escrotal aos níveis normais. No entanto, o aumento da temperatura não explica completamente a geração de EROs em varicoceles, uma vez que a maioria dos homens com varicocele apresenta aumento da temperatura escrotal, mas a maioria deles é fértil (21–23);

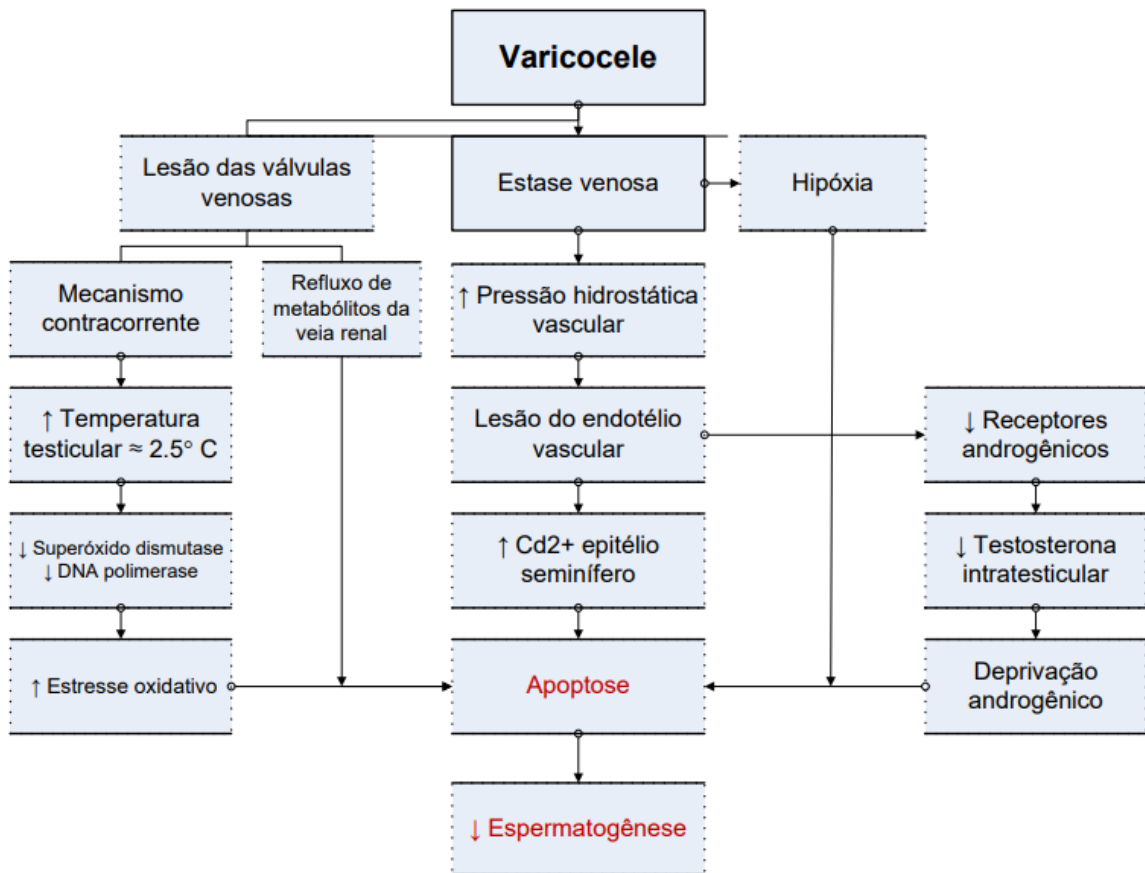
(v) Hipóxia testicular: A má drenagem venosa pode resultar em hipóxia testicular, ou seja, baixa concentração de oxigênio. Isso pode levar a uma depuração deficiente de gonadotoxinas e ao aumento na geração de EROs, intensificando o estresse oxidativo (11,23,24).

Pesquisas recentes têm evidenciado uma correlação significativa entre níveis elevados de espécies reativas de oxigênio (EROs) e pacientes portadores de varicocele que apresentam comprometimento da fertilidade (25,26). Todas as

hipóteses mencionadas indicam a possibilidade de ocorrência de alterações na espermatogênese e/ou na maturação dos espermatozoides (7,8,20,21,23,25,26).

A elevação nos níveis de espécies reativas de oxigênio (EROs) pode estabelecer uma relação com a varicocele devido à concepção de estresse oxidativo. As EROs são moléculas de notável reatividade e instabilidade, portadoras de oxigênio, que manifestam a habilidade de provocar danos às células e às estruturas celulares (24,27,28). A anomalia de dilatação das veias no escroto, característica da varicocele, pode induzir à retenção de sangue e, por conseguinte, elevar a temperatura local nos testículos, culminando no aumento da geração de EROs e no estabelecimento de um estado de estresse oxidativo nas células testiculares (24,27,29).

O estresse oxidativo se instaura quando um desequilíbrio surge entre a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade das células de contrabalançá-las por meio de sistemas antioxidantes. Esse contexto de estresse oxidativo pode causar prejuízos às membranas celulares, ao DNA, às proteínas e aos lipídios, acarretando, assim, comprometimentos na função celular (23,30,31). Dentro do contexto da varicocele, o aumento na temperatura local e a estagnação sanguínea podem ocasionar uma sobreprodução de EROs nas células testiculares. Como resultado, esse processo pode provocar deterioração oxidativa nas células germinativas (que dão origem aos espermatozoides) e nas células de Sertoli (que auxiliam no desenvolvimento dos espermatozoides). Esse dano oxidativo pode influenciar negativamente a produção e a qualidade dos espermatozoides, produzindo repercussões sobre a capacidade reprodutiva (24).



Fonte: Benoff et al. (2001)

Figura 1. Mecanismos envolvidos na fisiopatologia da varicocele.

Atualmente, estudos revelam que a varicocelectomia está associada a melhorias nos aspectos funcionais do espermatozoide e do sêmen (22,24,27,32–34). Essas pesquisas relataram melhorias na atividade mitocondrial e na integridade do DNA dos espermatozoides (35), bem como um aumento no volume testicular (36). Além disso, foi observado que a varicocelectomia pode melhorar a qualidade seminal e a fertilidade (37–39), ao mesmo tempo em que promove alterações na expressão de proteínas no plasma seminal (31). Esses estudos evidenciam que a varicocele tem o potencial de afetar vias moleculares nos testículos, assim como os aspectos funcionais dos espermatozoides. Portanto, compreender de forma mais aprofundada as alterações nos metabólitos torna-se de grande importância, a fim de obter um melhor entendimento sobre as vias causais da infertilidade em pacientes com varicocele.

1.2 Metabolômica

Atualmente, a análise seminal é considerada fundamental na análise do homem infértil. No entanto, é importante ressaltar que essa análise por si só apresenta uma correlação limitada com a fertilidade e é considerada insuficiente como método diagnóstico. Estudos demonstraram que os parâmetros seminais não conseguem determinar de forma precisa o verdadeiro potencial fértil do indivíduo em aproximadamente 15% dos casos, além de falharem em identificar a causa da infertilidade em 30% a 40% dos casos, resultando na classificação desses pacientes como portadores de infertilidade idiopática (40,41).

Uma pesquisa conduzida por Guzick et al. apresentou evidências de que certos limiares de análise seminal, relacionados à concentração, motilidade e morfologia espermática, poderiam ser aplicados para categorizar os indivíduos do sexo masculino em grupos de subfertilidade, fertilidade indeterminada ou fertilidade plena. No entanto, é importante ressaltar que nenhuma das medidas, seja de forma isolada ou em conjunto, pode ser definitivamente considerada como um diagnóstico de condição de infertilidade (42). Diante dessa limitação, torna-se necessário o emprego de métodos complementares que possibilitem uma avaliação adequada e precisa dos pacientes. Uma abordagem promissora é a avaliação da qualidade funcional do espermatozoide, a qual envolve a análise de parâmetros que vão além das características convencionais da análise seminal. Esses métodos adicionais proporcionam entendimentos mais detalhados sobre o potencial fértil masculino, auxiliando na identificação de possíveis disfunções ou alterações que possam estar comprometendo a fertilidade. Dessa forma, a combinação de múltiplas avaliações, incluindo a análise seminal e avaliações da qualidade funcional do espermatozoide, tem sido sugerida para uma avaliação mais abrangente e precisa dos pacientes com dificuldades reprodutivas (43–45).

Neste sentido, a avaliação dos mecanismos moleculares do sêmen tem ganhado espaço na literatura recente. As ciências ômicas baseiam-se em tecnologias em rápida evolução que também têm sido empregadas na área da reprodução humana com o intuito de identificar novos marcadores que auxiliem na avaliação do potencial fértil masculino e feminino (43,46–48). Dentre essas abordagens ômicas, destaca-se a metabolômica, que surgiu como uma disciplina posterior às reconhecidas técnicas de genômica, transcriptômica e proteômica. A

metabolômica tem como objetivo analisar o conjunto de metabólitos, também conhecido como metaboloma, presentes em um determinado sistema biológico (48). Os metabólitos são moléculas pequenas, com massa molecular inferior a 1 quilodalton (kDa), e podem englobar diversas classes, tais como hormônios, lipídios, carboidratos, aminoácidos e nucleotídeos. Eles representam os produtos finais do metabolismo de uma determinada molécula ou substância, fornecendo informações sobre os processos metabólicos que ocorrem em um organismo. Além disso, os metabólitos podem oferecer informações acerca das interações complexas entre os fatores genéticos e ambientais, permitindo uma compreensão mais abrangente dos mecanismos subjacentes a diversos fenótipos (30,43,44,49).

Assim, a metabolômica surge como uma ferramenta promissora no campo da reprodução humana, permitindo a identificação de marcadores metabólicos específicos e a investigação dos processos bioquímicos associados à fertilidade masculina (44). A aplicação dessas tecnologias ômicas, incluindo a metabolômica, tem o potencial de fornecer uma visão mais abrangente e integrada dos processos biológicos envolvidos na reprodução, contribuindo para um melhor entendimento dos mecanismos subjacentes à fertilidade masculina e abrindo caminho para o desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas mais eficazes (43,44,49,50).

Em comparação às demais ômicas, a metabolômica apresenta uma quantidade reduzida de moléculas a serem analisadas, uma vez que o número estimado de metabólitos é aproximadamente 6.500. Tal número é consideravelmente inferior em relação à estimativa de genes (25.000), RNAs mensageiros (100.000) e proteínas (1.000.000) (49,50). Isso se deve ao fato de que a variação dos metabólitos presentes em um determinado meio pode revelar alterações no estado celular e suas respostas a estímulos celulares e extracelulares em um momento específico. Dessa forma, ao refletir os efeitos de exposições exógenas, o metabolismo endógeno e a variação genética, a metabolômica é considerada mais próxima do fenótipo real em comparação com a proteômica e a genômica. Portanto, torna-se extremamente atraente analisar o metaboloma em diferentes doenças, a fim de obter uma compreensão mais aprofundada das alterações ocorridas no meio e nas células (43,44,50).

Por outro lado, a análise dos metabólitos é bastante sensível às alterações ambientais devido à natureza dinâmica e complexa dos sistemas metabólicos. Os

níveis de metabólitos podem variar significativamente entre diferentes indivíduos, tecidos, órgãos e até mesmo em diferentes momentos do dia devido a fatores genéticos, epigenéticos e fisiológicos (44,51,52). A dieta, o estilo de vida, a exposição a toxinas e outros fatores ambientais podem resultar em variações nos perfis metabólicos entre grupos de indivíduos ou ao longo do tempo. Ademais, o metabolismo é altamente regulado por vias metabólicas complexas e interconectadas. Pequenas mudanças em uma via metabólica podem ter efeitos em cascata em várias outras vias. Isso significa que até mesmo pequenas perturbações nos processos metabólicos podem resultar em variações significativas nos níveis de metabólitos (34,37,46,48).

Não obstante, estudos buscam cada vez mais identificar perfis metabólicos associados a uma variedade de doenças crônicas, como doenças cardiovasculares, diabetes e câncer (30,45,53,54). Além disso, a metabolômica já foi aplicada em diferentes sistemas biológicos humanos, incluindo urina, plasma, soro sanguíneo, líquido cefalorraquidiano, fluido folicular, saliva, leite materno, lágrimas e plasma seminal (30,44,50). Devido à capacidade de refletir exposições específicas e fornecer informações em nível molecular, os metabólitos podem ser considerados marcadores precoces de doenças, representar vias que contribuem para o desenvolvimento de doenças e, além disso, podem ser úteis na predição de riscos de doenças (52).

Portanto, neste estudo, nosso objetivo é analisar o metaboloma de pacientes com varicocele, com a possibilidade de identificar potenciais biomarcadores moleculares e contribuir para um melhor entendimento do mecanismo da infertilidade masculina (45,46,49,54–56). Além disso, dado que a varicocele desempenha um papel significativo, embora não determinante, na indução da infertilidade, é de suma importância compreender os seus mecanismos subjacentes e como ela influencia as características do metabolismo seminal. Um melhor entendimento do perfil metabolômico dos pacientes com varicocele pode auxiliar os pesquisadores a identificar processos bioquímicos específicos que são prejudicados pela varicocele, permitindo o desenvolvimento de abordagens terapêuticas mais direcionadas e auxiliando na tomada de decisões clínicas (31,43,51,52).

Utilizar o perfil metabolômico do fluido seminal como uma ferramenta de suporte diagnóstico e prognóstico pode ser particularmente valioso para casais que enfrentam desafios de concepção relacionados à varicocele. Ao compreender como

a varicocele influencia os metabólitos presentes no fluido seminal, é possível explorar a criação de terapias personalizadas. Um exemplo prático seria a suplementação de metabólitos específicos em falta devido à varicocele, visando melhorar a saúde dos espermatozoides e potencialmente aumentar as chances de fertilização bem-sucedida. Além disso, a análise dos metabólitos seminais pode desempenhar um papel relevante na avaliação da eficácia dos tratamentos para a varicocele. Se determinados metabólitos retornarem aos níveis normais após um tratamento bem-sucedido, poderia servir como um indicador de recuperação da saúde espermática (49,52,57).

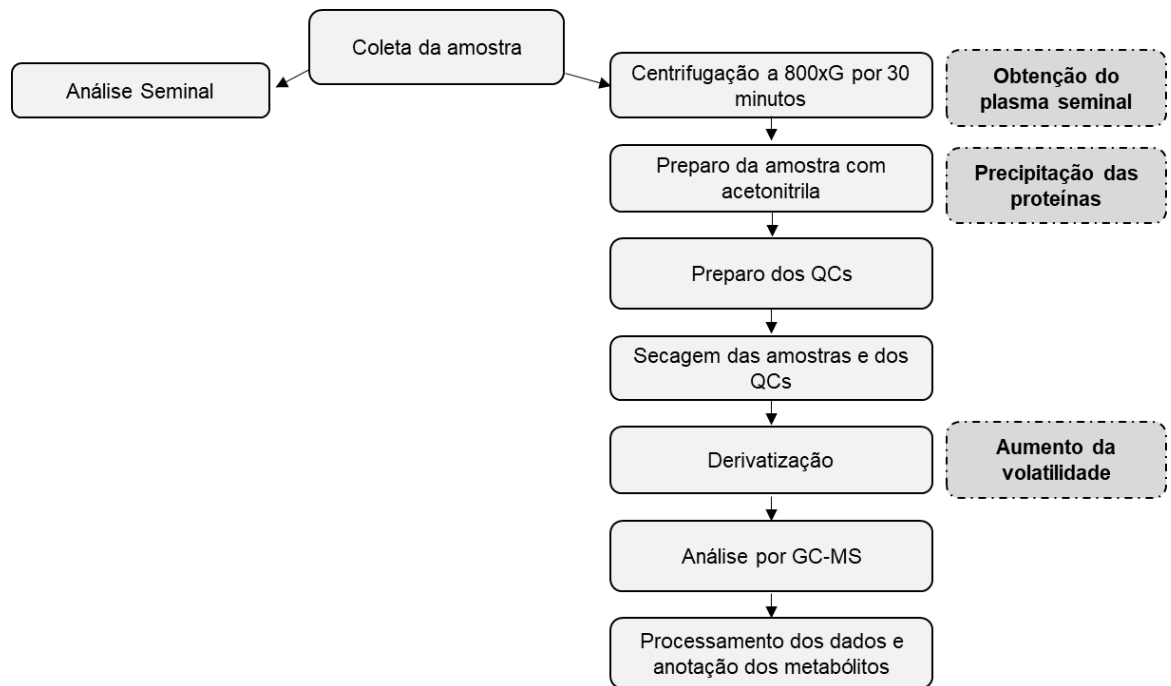
2 OBJETIVO

2 OBJETIVO

Realizar uma avaliação do perfil metabólico de pacientes diagnosticados com varicocele, comparando-os com pacientes sem varicocele e apresentando normozoospermia, utilizando como ferramenta a cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas no plasma seminal.

3 MÉTODO

Após a obtenção da aprovação deste estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CAAE: 43300721.3.0000.5505) da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), deu-se início a um estudo observacional transversal (Figura 2). Para a realização deste estudo, foram utilizadas informações provenientes de um banco de dados contendo dados de casais que buscaram o Laboratório de Andrologia do Setor Integrado de Reprodução Humana, da Disciplina de Urologia da UNIFESP, com o intuito de obter tratamento para infertilidade conjugal ou realizar exames de rotina.



Fonte: De autoria própria.

Figura 2. Desenho do estudo.

3.1 Características da população e coleta de amostra

A coleta de amostras ocorreu por meio de masturbação em uma área adjacente ao laboratório, utilizando recipientes estéreis de polipropileno. Para isso, foi necessário que os pacientes observassem um período de abstinência ejaculatória de dois a cinco dias.

Foram selecionados prontuários de casais em que o homem apresentava idade entre 18 e 50 anos e que possuíam amostras congeladas coletadas entre 2005 e 2019 para inclusão no estudo. Os prontuários de pacientes com doenças infectocontagiosas, azoospermia, vasectomia, bem como aqueles expostos a outras drogas ou com alterações urogenitais que afetassem a função testicular normal foram excluídos do estudo.

Antes da inclusão no estudo, os pacientes passaram por uma avaliação física realizada por um médico urologista, que verificou a presença da varicocele e classificou seu grau de acordo com a classificação de Dubin & Amelar (58). Os graus de varicocele foram definidos da seguinte forma:

- Grau I: não visível e palpável apenas com a manobra de Valsalva;
- Grau II: não visível e palpável sem a necessidade de Valsalva;
- Grau III: visível e palpável sem a necessidade de manobra de Valsalva;
- Sem varicocele.

O estudo envolveu um total de 98 homens, que foram inicialmente divididos em dois grupos: grupo controle e pacientes com varicocele.

Os critérios de inclusão foram os seguintes:

(i) Controle (n=23): homens adultos sem varicocele ou com varicocele grau I (uni ou bilateral), normozoospermicos, conforme os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2010;

(ii) Com varicocele (n=75): homens com varicocele, graus II e/ou III uni ou bilateral;

Posteriormente, o grupo de varicocele foi dividido em dois subgrupos:

(iii) Com varicocele e normozoospermicos (n=55)

(iv) Com varicocele e sêmen alterado (n=20)

3.2 Análise Seminal e separação do plasma

Após a coleta, a amostra foi mantida em temperatura ambiente por 60 minutos para permitir a liquefação. Uma porção da amostra foi utilizada para a realização da análise seminal, seguindo os critérios estabelecidos no manual da Organização Mundial de Saúde de 2010 (1). As variáveis analisadas neste estudo incluíram: volume do ejaculado, concentração espermática, contagem total de

espermatozoides, morfologia, presença de células redondas, neutrófilos, motilidade progressiva, motilidade não progressiva e imobilidade dos espermatozoides.

A porção remanescente da amostra foi submetida a uma centrifugação a 800xG, durante 30 minutos, para obter o plasma seminal. Em seguida, o plasma seminal foi centrifugado novamente a 16.100xG, a uma temperatura de 4°C, por 30 minutos, a fim de eliminar os resíduos celulares. As amostras foram então armazenadas a -20°C até o momento da realização dos procedimentos de análise metabólica.

3.3 Preparo da amostra

Previamente à realização da avaliação metabólica, as amostras foram preparadas para a remoção de proteínas. Após o descongelamento, foi retirado um volume inicial de 150 microlitros, ao qual foram adicionados 600 microlitros de acetonitrila a -20°C. As amostras foram então incubadas a -20°C por 60 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas a uma centrifugação a 14.000xG, a 4°C, por 20 minutos. O sobrenadante resultante dessa centrifugação foi coletado, transferido para um frasco identificado e armazenado a -80°C até o momento da análise. Paralelamente, foram preparados controles de qualidade (QCs) para a análise, os quais consistem em frascos contendo volumes iguais de todas as amostras do estudo.

Para a avaliação metabólica, foi utilizada a técnica de cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (GC-MS). Para viabilizar essa análise, após o descongelamento, as amostras foram submetidas a um processo de desidratação e centrifugadas no equipamento Speed Vac, com os tubos abertos, até que as amostras estivessem completamente secas. A análise metabólica por GC-MS foi realizada no Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), e as amostras foram devidamente transportadas em um recipiente de isopor contendo gelo seco.

3.4 Derivatização

No Instituto de Química da Universidade de São Paulo (IQ-USP), as análises foram conduzidas sob a responsabilidade da Professora Marina Franco Maggi Tavares, com a assistência do Professor Daniel Rossado Oliveira. As amostras secas, os controles de qualidade (QCs) e um controle em branco foram submetidos à derivatização. Para a etapa de oximação, 20 microlitros da solução de metoxiamina em piridina (15 mg/mL) foram adicionados ao extrato seco. O frasco foi agitado vigorosamente por meio de um banho de ultrassom e um vórtex, e a reação foi realizada a 70°C, em ausência de luz, durante 60 minutos. Para a etapa de silição, foram adicionados 20 microlitros de uma solução contendo BSTFA + 1% TMCS, e os reagentes foram agitados vigorosamente por meio de um banho de ultrassom e um vórtex. A reação ocorreu em um banho termostatizado a 70°C por 60 minutos. Após a derivatização, 100 microlitros de heptano contendo P.I. (metil tridecanoato) foram adicionados, seguido de agitação em vórtex para homogeneização e injeção imediata no equipamento de GC-MS. As amostras foram analisadas de forma aleatória, e os controles de qualidade foram analisados no início, a cada 10 amostras e no final da sequência analítica.

3.5 Análise por GC-MS

Para a análise, foi utilizado um espectrômetro de massas do tipo quadrupolo (SHIMAZU GC-2010 Plus). A separação dos metabólitos foi realizada a partir de um volume de 1 µL das amostras derivatizadas que foram injetadas na coluna Agilent J&W GC (Agilent Technologies) HP5-MS (30 m de comprimento, 0,25 mm diâmetro interno, filme de 0,25 µm com 95% dimetilpolisiloxano e 5% fenil). Gás Hélio de alta pureza foi utilizado como fase móvel em uma vazão de 1 mL/min. O injetor do cromatógrafo gasoso foi mantido à 250°C e a razão do split foi de 1:10 a 10 mL/min para injeção das amostras. Para a separação dos analitos foi utilizado um gradiente, onde a temperatura inicial do forno era de 60°C (mantida por 1 minuto), e posteriormente, aumento até 300°C a uma taxa de 10°C/min. O tempo total da corrida foi de 25 minutos.

3.6 Processamento dos dados e anotação dos metabólitos

O processamento dos dados foi realizado em parceria com a Profa. Gisele André Baptista Canuto da Universidade Federal da Bahia. Os dados foram convertidos para *.mzData e ajustes dos parâmetros de processamento de dados no XCMS utilizando literatura especializada e o algoritmo de otimização IPO (Isotopologue Parameter Optimization, versão 1.16.0), executado no programa RStudio (versão 3.6.3), usando amostras QCs para encontrar as melhores condições de processamento. Ajustes finos das condições foram realizados manualmente, no próprio XCMS(versão 3.8.2) executado no RStudio (versão 3.6.3).

A extração da matriz de dados foi realizada com os seguintes parâmetros: método "matched filter", para detecção de picos com largura de pico (fwhm) = 4, relação sinal/ruído (snthresh) = 1.5 e número máximo de picos por cromatograma de íon extraído (max) = 100. O agrupamento foi realizado com correção de largura de banda (bw) = 2, largura das faixas sobrepostas de m/z 's (mzwid) = 0.25 e fração mínima de amostras detectadas (minfrac) = 0.5, para primeiro e segundo agrupamento. A correção dos tempos de retenção foi realizada com o método default (retcor). A ferramenta "fillPeaks" foi aplicada para remoção de *missing values*, e os molecular features (relações m/z , tempo de retenção e intensidade) foram salvos em formato .csv para posterior normalização e análise estatística dos dados.

A anotação dos metabólitos foi feita no software Automated Mass Spectral Deconvolution and Identification System (AMDIS, versão 2.73) utilizando a biblioteca de espectros Fiehn RT Library, seguindo as etapas:

1) Criação da lista e arquivo de calibração baseado na análise da mistura dos 9 hidrocarbonetos (FAME MIX - C8 a C24).

2) Análise por retention index (RI), baseada na similaridade de perfil espectral
Settings: minimum match factor = 30, RI window: 20 + 0, component width = 15.

3) Análise por retention time (RT), correções de pequenos desvios de retenção de biblioteca target, criada especificamente para o batch de amostras que se está trabalhando.

Settings: minimum match factor = 60, RT window: 0.05 min, component width = 15.

4) Anotação da lista de metabólitos e remoção daqueles presentes no branco e artefatos (produtos de derivatização e plastificantes).

3.7 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando SPSS para o Windows. Inicialmente, foi realizada uma análise estatística descritiva considerando três grupos: controle (i), varicocele sêmen normal (ii) e varicocele sêmen alterado (iii); e, posteriormente, foram considerados dois grupos de análise: controle (i) e varicocele (ii).

Os dados foram verificados quanto a normalidade dos resíduos por meio do teste Kolmogorov-Smirnov. Foi realizada análise comparativa entre os três grupos utilizando análise de variância, seguida do teste *post-hoc* de Games-Howell. Para o sub-estudo considerando dois grupos, foi realizado um teste de normalidade como descrito acima. Os dois grupos foram comparados por meio do teste t de Student para amostras não pareadas. Para o estudo foi adotado um alfa de 5%.

4 RESULTADOS

Um total de 28 metabólitos ou classes (para açúcares) foram identificados neste estudo. A correlação foi realizada por meio da comparação do tempo de retenção e dos íons/fragmentos espectrais, buscando-se os íons com maior intensidade de sinal analítico para a correlação.

As características clínicas dos pacientes, considerando os três grupos de análise, estão apresentadas na Tabela 1. Foi observada uma diferença significativa nos parâmetros: idade, altura, concentração, contagem total, motilidade não progressiva, espermatozoides imóveis, total de espermatozoides móveis, vitalidade e morfologia normal. Altura, não progressivos e os espermatozoides imóveis apresentaram diferença significativa no teste ANOVA, porém não no teste *post-hoc*.

Na Tabela 2, são apresentadas as características clínicas dos pacientes, comparando apenas os grupos de varicocele e controle. Foi observada diferença significativa entre os grupos nos parâmetros de idade e índice de massa corporal (IMC).

Tabela 1. Apresentação dos parâmetros clínicos – Comparação entre os três grupos

	Controle (n = 23)	VSN (n = 55)	VSA (n = 20)	p
Idade (anos)				
Média; DP	36,3; 6,91 ^a	28,4; 8,51 ^b	29,9; 9,04 ^b	0,001 [*]
IC 95%	[33,3; 39,3]	[26,1; 30,7]	[25,7; 34,1]	
Massa (kg)				
Média; DP	81,8; 10,88	77,8; 12,93	82,8; 13,12	0,489
IC 95%	[75,2; 88,4]	[72,4; 83,3]	[72,7; 92,9]	
Altura (metros)				
Média; DP	1,8; 0,90	1,8; 0,72	1,8; 0,90	0,042 [*]
IC 95%	[1,7; 1,8]	[1,7; 1,8]	[1,8; 1,9]	
IMC				
Média; DP	26,2; 1,90	24,8; 3,28	24,2; 3,73	0,186
IC 95%	[25,3; 27,1]	[23,3; 26,4]	[20,7; 27,6]	
Tempo de liquefação				
Média; DP	27,8; 13,80	31,6; 14,24	32,5; 12,51	0,460
IC 95%	[21,9; 33,8]	[27,8; 35,5]	[26,6; 38,4]	
Volume (ml)				

Média; DP	3,9; 1,35	3,7; 1,47	3,3; 2,47	0,514
IC 95%	[3,3; 4,5]	[3,3; 4,1]	[2,2; 4,5]	
pH				
Média; DP	8,1; 0,21	8,2; 0,32	8,1; 0,24	0,442
IC 95%	[8,0; 8,2]	[8,1; 8,3]	[8,0; 8,2]	
Concentração (x10⁶ml)				
Média; DP	109,7; 74,28 ^a	85,0; 60,94 ^a	42,4; 42,03 ^b	0,002 [*]
IC 95%	[77,6; 141,9]	[68,5; 101,4]	[22,7; 62,1]	
Contagem total				
Média; DP	402,4; 260,97 ^a	303,1; 221,52 ^a	132,9; 171,81 ^b	0,001 [*]
IC 95%	[289,5; 515,2]	[243,2; 363,0]	[52,5; 213,3]	
Motilidade A+B				
Média; DP	56,3; 10,92	54,2; 9,53	48,6; 14,29	0,064
IC 95%	[51,6; 61,0]	[51,6; 56,8]	[42,0; 55,3]	
Não progressivos				
Média; DP	6,3; 3,23	4,7; 2,73	4,3; 2,63	0,028 [*]
IC 95%	[5,0; 7,7]	[3,9; 5,4]	[3,0; 5,5]	
Imóveis				
Média; DP	38,3; 11,45	41,1; 8,48	47,1; 14,09	0,024 [*]
IC 95%	[33,4; 43,3]	[38,9; 43,4]	[40,5; 53,7]	
Total de móveis (a+b+c)				
Média; DP	62,7; 10,33 ^a	58,7; 8,48 ^{a b}	52,9; 14,09 ^b	0,010 [*]
IC 95%	[58,2; 67,1]	[56,4; 61,0]	[46,3; 59,5]	
Total de progressivos (a+b)				
Média; DP	56,3; 10,92	54,0; 9,52	48,7; 14,29	0,068
IC 95%	[51,6; 61,0]	[51,4; 56,6]	[42,0; 55,3]	
Vitalidade				
Média; DP	82,0; 8,16 ^{a b}	87,5; 8,19 ^a	76,4; 13,15 ^b	0,018 [*]
IC 95%	[75,2; 88,8]	[83,3; 91,7]	[68,8; 84,0]	
Células redondas (x10⁶/ml)				
Média; DP	2,4; 2,20	2,4; 3,09	2,0; 1,82	0,785
IC 95%	[1,4; 3,4]	[1,6; 3,3]	[1,1; 2,8]	
Neutrófilos(x10⁶/ml)				
Média; DP	0,2; 0,33	0,6; 2,26	0,2; 0,32	0,447
IC 95%	[0,1; 0,3]	[0,0; 1,3]	[0,0; 0,3]	
Morfologia Normal (%)				
Média; DP	7,5; 3,45 ^a	7,8; 2,34 ^a	3,5; 1,57 ^b	0,000 [*]
IC 95%	[6,0; 9,0]	[7,2; 8,4]	[2,7; 4,2]	

DP – Desvio padrão

IC 95% - Intervalo de confiança de 95% da média

* - $p < 0,05$

Letras sobrescritas diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa no teste *post-hoc*

Tabela 2. Apresentação dos parâmetros clínicos – Comparação entre os dois grupos

	Controle (n = 23)	Varicocele (n = 75)	p
Idade (anos)			
Média; DP	36,3; 6,91	28,8; 8,62	0,015 *
IC 95%	[33,3; 39,2]	[26,8; 30,8]	
Massa (kg)			
Média; DP	81,8; 10,88	79,2; 12,97	0,556
IC 95%	[75,2; 88,4]	[74,6; 83,8]	
Altura (metros)			
Média; DP	1,8; 0,09	1,8; 0,08	0,520
IC 95%	[1,7; 1,8]	[1,8; 1,8]	
IMC			
Média; DP	26,2; 1,90	24,7; 3,34	0,019 *
IC 95%	[25,3; 27,1]	[23,3; 26,0]	
Tempo de liquefação			
Média; DP	27,8; 13,80	31,9; 13,72	0,982
IC 95%	[21,9; 33,8]	[28,7; 35,0]	
Volume (ml)			
Média; DP	3,9; 1,35	3,6; 1,78	0,516
IC 95%	[3,3; 4,5]	[3,2; 4,0]	
pH			
Média; DP	8,1; 0,21	8,1; 0,30	0,118
IC 95%	[8,0; 8,2]	[8,1; 8,2]	
Concentração (x10⁶ml)			
Média; DP	109,7; 74,28	73,6; 59,35	0,085
IC 95%	[77,6; 141,9]	[60,0; 87,3]	
Contagem total			
Média; DP	402,4; 260,97	257,7; 221,65	0,192
IC 95%	[289,5; 515,2]	[206,7; 308,7]	
Motilidade A+B			
Média; DP	56,3; 10,92	52,7; 11,17	0,915
IC 95%	[51,6; 61,0]	[50,1; 55,3]	
Não progressivos			
Média; DP	6,3; 3,23	4,5; 2,69	0,110

IC 95%	[5,0; 7,7]	[3,9; 5,2]	
Imóveis			
Média; DP	38,3; 11,45	42,7; 10,51	0,446
IC 95%	[33,4; 43,3]	[40,3; 45,2]	
Total de móveis (a+b+c)			
Média; DP	62,7; 10,33	57,1; 10,52	0,913
IC 95%	[58,2; 67,1]	[54,7; 59,6]	
Total de progressivos (a+b)			
Média; DP	56,3; 10,92	52,6; 11,17	0,909
IC 95%	[51,6; 61,0]	[50,0; 55,2]	
Vitalidade			
Média; DP	82,0; 8,16	82,5; 11,93	0,303
IC 95%	[75,2; 88,8]	[78,1; 86,8]	
Células redondas (x10⁶/ml)			
Média; DP	2,4; 2,20	2,3; 2,80	0,636
IC 95%	[1,4; 3,4]	[1,7; 2,9]	
Neutrófilos(x10⁶/ml)			
Média; DP	0,2; 0,33	0,5; 1,96	0,165
IC 95%	[0,1; 0,3]	[0,1; 1,0]	
Morfologia Normal (%)			
Média; DP	7,5; 3,45	6,6; 2,89	0,448
IC 95%	[6,0; 9,0]	[6,0; 7,3]	

DP – Desvio padrão

IC 95% - Intervalo de confiança de 95% da média

* - $p < 0,05$

Os metabólitos identificados estão apresentados na Tabela 3, considerando a comparação entre os três grupos de análise. Foi observada diferença significativa nos metabólitos ureia (N_urea), serina (N_serine), ácido aspártico (N_aspartic acid), treitol (N_threitol), manitol (N_mannitol/sorbitol) e maltose (N_maltose/cellobiose) entre os grupos. É importante ressaltar que a ureia apresentou diferença significativa no teste ANOVA, porém não no teste *post-hoc*. A distribuição dos dados desses metabólitos, que apresentaram alterações entre os três grupos, pode ser visualizada nos gráficos 1, 2, 3, 4, 5 e 6.

Na Tabela 4, estão listados os metabólitos comparando apenas os dois grupos. Foi observada diferença significativa nos seguintes metabólitos: fenilacetaldéido (N_phenylacetaldehyde), ureia (N_urea), serina (N_serine), treitol

(N_threitol), ácido piroglutâmico (N_pyroglutamic acid), ribose (N_ribose) e N-acetilmanosamina (N_N-acetyl-D-mannosamine). A distribuição dos dados desses metabólitos, que apresentaram alterações entre os dois grupos, pode ser visualizada nos gráficos 7, 8, 9, 10, 11, 12 e 13.

Tabela 3. Valores estatísticos para os metabólitos – Comparação entre os três grupos

	Controle (n = 23)	VSN (n = 55)	VSA (n = 20)	p
N_pyruvic acid				
Média; DP	0,5; 0,75	0,7; 0,87	0,9; 0,69	0,417
IC 95%	[0,2; 0,9]	[0,4; 0,9]	[0,5; 1,2]	
N_oxalic acid				
Média; DP	4,1; 2,73	4,9; 2,17	5,7; 3,56	0,129
IC 95%	[2,9; 5,3]	[4,3; 5,5]	[4,1; 7,4]	
N_leucine				
Média; DP	0,1; 0,15	0,1; 0,13	0,1; 0,14	0,974
IC 95%	[0,1; 0,2]	[0,1; 0,2]	[0,1; 0,2]	
N_ileucine				
Média; DP	5,1; 7,37	5,0; 4,01	5,9; 6,14	0,795
IC 95%	[1,9; 8,3]	[3,9; 6,0]	[3,0; 8,8]	
N_phenylacetaldehyde				
Média; DP	25,2; 20,56	23,1; 14,81	20,6; 12,10	0,639
IC 95%	[16,3; 34,0]	[19,1; 27,1]	[14,9; 26,2]	
N_urea				
Média; DP	1,2; 2,08	0,3; 0,55	0,2; 0,16	0,002 *
IC 95%	[0,3; 2,1]	[0,1; 0,4]	[0,1; 0,2]	
N_serine				
Média; DP	2,1; 2,09 ^a	9,3; 8,08 ^b	8,8; 8,73 ^b	0,000 *
IC 95%	[1,2; 3,0]	[7,1; 11,5]	[4,7; 12,9]	
N_threonine/allothreonine				
Média; DP	2,0; 1,79	2,8; 1,57	2,5; 1,79	0,187
IC 95%	[1,3; 2,8]	[2,4; 3,2]	[1,6; 3,3]	
N_catechol				
Média; DP	6,6; 4,81	8,3; 7,82	8,1; 7,41	0,633
IC 95%	[4,5; 8,7]	[6,2; 10,4]	[4,6; 11,5]	
N_aspartic acid				
Média; DP	0,6; 0,39 ^a	0,9; 0,51 ^b	1,0; 0,97 ^{a b}	0,046 *
IC 95%	[0,4; 0,7]	[0,7; 1,0]	[0,6; 1,5]	
N_threitol				

Média; DP	6,0; 2,30 ^a	8,8; 4,15 ^b	9,0; 4,96 ^{a b}	0,013 [*]
IC 95%	[5,0; 7,0]	[7,7; 10,0]	[6,7; 11,3]	
N_pyroglutamic acid				
Média; DP	1,3; 3,38	0,6; 0,57	0,8; 0,90	0,214
IC 95%	[-0,1; 2,8]	[0,4; 0,7]	[0,4; 1,2]	
N_phenylalanine				
Média; DP	15,8; 13,13	10,7; 12,39	11,1; 11,41	0,242
IC 95%	[10,1; 21,5]	[7,4; 14,1]	[5,7; 16,4]	
N_benzene-1,2,4-triol				
Média; DP	15,2; 9,48	12,7; 8,06	12,6; 8,34	0,468
IC 95%	[11,1; 19,3]	[10,5; 14,9]	[8,7; 16,5]	
N_4-hydroxybenzoic acid				
Média; DP	0,2; 0,15	0,2; 0,19	0,2; 0,18	0,167
IC 95%	[0,1; 0,2]	[0,2; 0,3]	[0,2; 0,3]	
N_ribose				
Média; DP	3,5; 6,10	1,6; 1,82	2,3; 5,05	0,139
IC 95%	[0,9; 6,2]	[1,1; 2,0]	[0,0; 4,7]	
N_arabitol / ribitol				
Média; DP	1,0; 0,54	0,8; 0,33	1,0; 1,16	0,255
IC 95%	[0,8; 1,3]	[0,7; 0,9]	[0,4; 1,5]	
N_trans-aconitic acid				
Média; DP	0,3; 0,18	0,3; 0,16	0,3; 0,29	0,551
IC 95%	[0,2; 0,3]	[0,2; 0,3]	[0,2; 0,5]	
N_glycerol 1-phosphate				
Média; DP	0,3; 0,21	0,3; 0,19	0,3; 0,27	0,705
IC 95%	[0,2; 0,4]	[0,2; 0,3]	[0,2; 0,4]	
N_citric acid				
Média; DP	0,4; 0,21	0,6; 0,27	0,6; 0,58	0,196
IC 95%	[0,3; 0,5]	[0,5; 0,6]	[0,3; 0,9]	
N_tagatose /sorbose				
Média; DP	2,2; 2,20	1,8; 2,56	1,6; 1,25	0,655
IC 95%	[1,3; 3,2]	[1,2; 2,5]	[1,0; 2,2]	
N_tyrosine				
Média; DP	0,3; 0,18	0,3; 0,12	0,4; 0,45	0,314
IC 95%	[0,3; 0,4]	[0,3; 0,3]	[0,2; 0,6]	
N_allose / altrose / mannose				
Média; DP	3,1; 4,36	3,3; 4,24	3,0; 3,39	0,971
IC 95%	[1,2; 5,0]	[2,1; 4,4]	[1,4; 4,6]	
N_sedoheptulose				

anhydride monohydrate

Média; DP	0,4; 0,52	0,4; 0,46	0,4; 0,35	0,915
IC 95%	[0,2; 0,6]	[0,3; 0,5]	[0,3; 0,6]	

N_glucose / talose

Média; DP	1,5; 1,59	1,5; 1,86	1,7; 1,97	0,925
IC 95%	[0,9; 2,2]	[1,0; 2,0]	[0,8; 2,6]	

N_mannitol / sorbitol

Média; DP	0,3; 0,14 ^a	0,4; 0,15 ^b	0,3; 0,21 ^{a,b}	0,036 [*]
IC 95%	[0,2; 0,3]	[0,3; 0,4]	[0,2; 0,4]	

N_N-acetyl-D-mannosamine

Média; DP	0,5; 1,04	0,2; 0,20	0,2; 0,18	0,130
IC 95%	[0,0; 0,9]	[0,1; 0,2]	[0,1; 0,3]	

N_maltose / cellobiose

Média; DP	0,2; 0,07 ^a	0,2; 0,09 ^b	0,3; 0,30 ^{a,b}	0,045 [*]
IC 95%	[0,1; 0,2]	[0,2; 0,3]	[0,1; 0,4]	

DP – Desvio padrão

IC 95% - Intervalo de confiança de 95% da média

* - $p < 0,05$

Letras sobrescritas diferentes em uma mesma linha indicam diferença significativa no teste *post-hoc*

Gráfico 1. Ureia – Comparação em três grupos

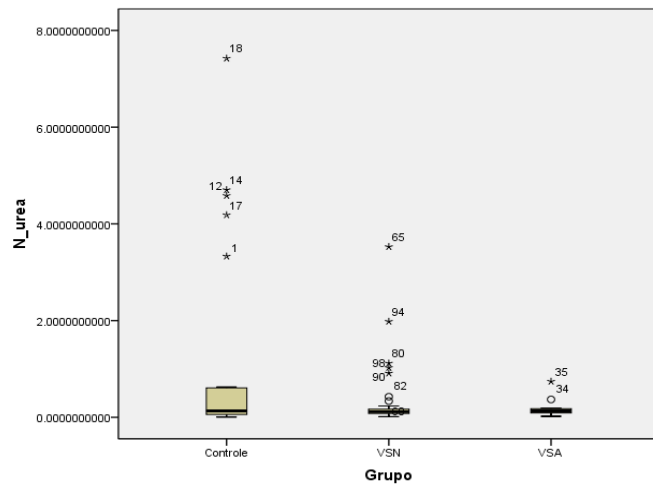


Gráfico 2. Serina – Comparação em três grupos

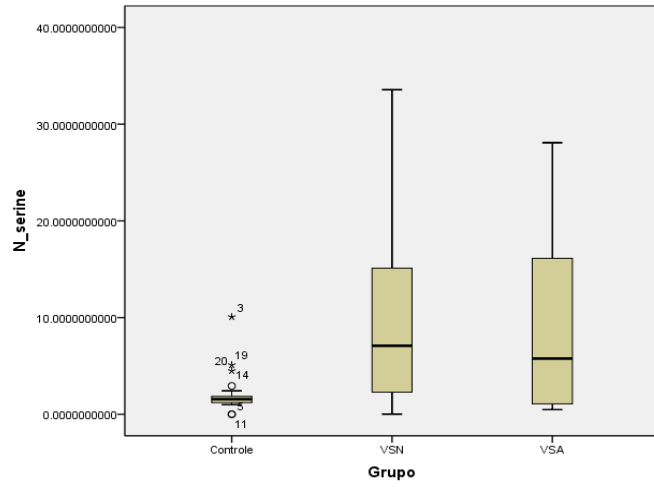


Gráfico 3. Ácido aspártico – Comparação em três grupos

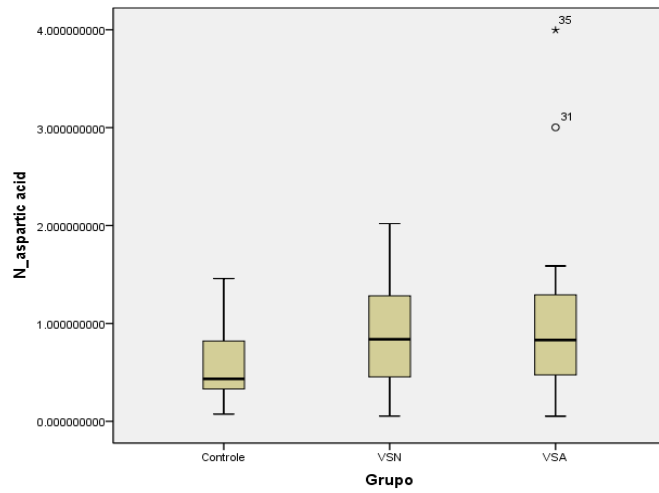


Gráfico 4. Treitol – Comparação em três grupos

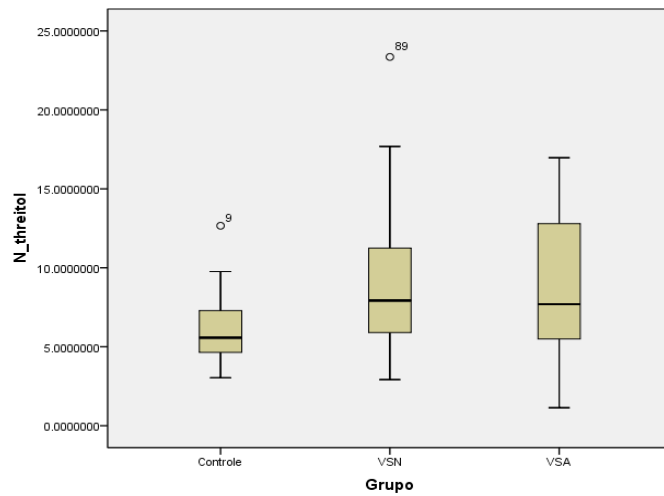
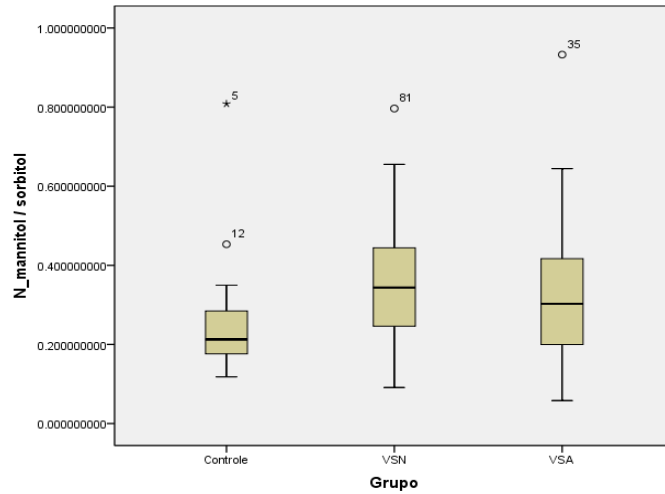
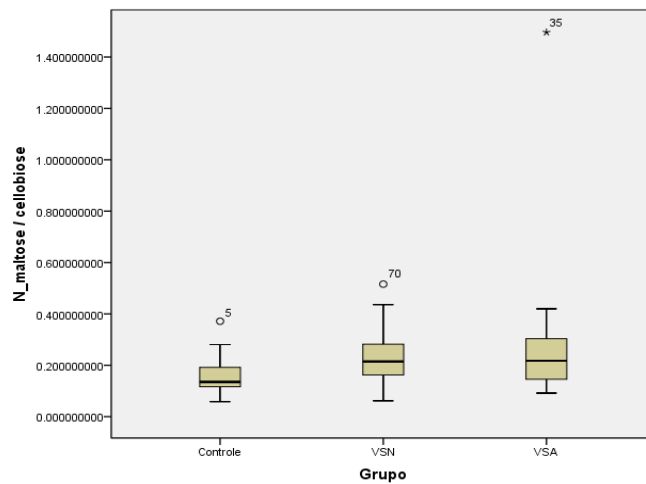


Gráfico 5. Manitol – Comparação em três grupos**Gráfico 6. Maltose – Comparação em três grupos****Tabela 4. Valores estatísticos para os metabólitos – Comparação entre dois grupos**

	Controle (n = 23)	Varicocele (n = 75)	p
N_pyruvic acid			
Média; DP	0,5; 0,75	0,7; 0,82	0,505
IC 95%	[0,2; 0,9]	[0,5; 0,9]	
N_oxalic acid			
Média; DP	4,1; 2,73	5,1; 2,61	0,669
IC 95%	[2,9; 5,3]	[4,5; 5,7]	
N_leucine			
Média; DP	0,1; 0,15	0,1; 0,13	0,692
IC 95%	[0,1; 0,2]	[0,1; 0,2]	

N_ isoleucine			
Média; DP	5,1; 7,37	5,2; 4,65	0,605
IC 95%	[1,9; 8,3]	[4,1; 6,3]	
N_phenylacetaldehyde			
Média; DP	25,2; 20,56	22,4; 14,10	0,007 *
IC 95%	[16,3; 34,0]	[19,2; 25,7]	
N_urea			
Média; DP	1,2; 2,08	0,2; 0,48	0,000 *
IC 95%	[0,3; 2,1]	[0,1; 0,4]	
N_serine			
Média; DP	2,1; 2,09	9,2; 8,20	0,000 *
IC 95%	[1,2; 3,0]	[7,3; 11,1]	
N_threonine/allothreonine			
Média; DP	2,0; 1,79	2,7; 1,63	0,834
IC 95%	[1,3; 2,8]	[2,3; 3,1]	
N_catechol			
Média; DP	6,6; 4,81	8,2; 7,67	0,113
IC 95%	[4,5; 8,7]	[6,5; 10,0]	
N_aspartic acid			
Média; DP	0,6; 0,39	0,9; 0,66	0,108
IC 95%	[0,4; 0,7]	[0,8; 1,1]	
N_threitol			
Média; DP	6,0; 2,30	8,9; 4,35	0,001 *
IC 95%	[5,0; 7,0]	[7,9; 9,9]	
N_pyroglutamic acid			
Média; DP	1,3; 3,38	0,6; 0,67	0,001 *
IC 95%	[-0,1; 2,8]	[0,5; 0,8]	
N_phenylalanine			
Média; DP	15,8; 13,13	10,8; 12,06	0,736
IC 95%	[10,1; 21,5]	[8,0; 13,6]	
N_benzene-1,2,4-triol			
Média; DP	15,2; 9,48	12,7; 8,08	0,120
IC 95%	[11,1; 19,3]	[10,8; 14,5]	
N_4-hydroxybenzoic acid			
Média; DP	0,2; 0,15	0,2; 0,19	0,393
IC 95%	[0,1; 0,2]	[0,2; 0,3]	
N_ribose			
Média; DP	3,5; 6,10	1,8; 3,01	0,000 *
IC 95%	[0,9; 6,2]	[1,1; 2,4]	
N_arabitol / ribitol			

Média; DP	1,0; 0,54	0,8; 0,66	0,539
IC 95%	[0,8; 1,3]	[0,7; 1,0]	
N_trans-aconitic acid			
Média; DP	0,3; 0,18	0,3; 0,20	0,893
IC 95%	[0,2; 0,3]	[0,3; 0,3]	
N_glycerol 1-phosphate			
Média; DP	0,3; 0,21	0,3; 0,21	0,626
IC 95%	[0,2; 0,4]	[0,2; 0,3]	
N_citric acid			
Média; DP	0,4; 0,21	0,6; 0,38	0,355
IC 95%	[0,3; 0,5]	[0,5; 0,7]	
N_tagatose /sorbose			
Média; DP	2,2; 2,20	1,8; 2,28	0,810
IC 95%	[1,3; 3,2]	[1,3; 2,3]	
N_tyrosine			
Média; DP	0,3; 0,18	0,3; 0,25	0,934
IC 95%	[0,3; 0,4]	[0,3; 0,4]	
N_allose / altrose / mannose			
Média; DP	3,1; 4,36	3,2; 4,01	0,707
IC 95%	[1,2; 5,0]	[2,3; 4,1]	
N_sedoheptulose anhydride monohydrate			
Média; DP	0,4; 0,52	0,4; 0,43	0,738
IC 95%	[0,2; 0,6]	[0,3; 0,5]	
N_glucose / talose			
Média; DP	1,5; 1,59	1,6; 1,88	0,979
IC 95%	[0,9; 2,2]	[1,1; 2,0]	
N_mannitol / sorbitol			
Média; DP	0,3; 0,14	0,4; 0,17	0,148
IC 95%	[0,2; 0,3]	[0,3; 0,4]	
N_N-acetyl-D- mannosamine			
Média; DP	0,5; 1,04	0,2; 0,20	0,000 *
IC 95%	[0,0; 0,9]	[0,2; 0,2]	
N_maltose / cellobiose			
Média; DP	0,2; 0,07	0,2; 0,17	0,281
IC 95%	[0,1; 0,2]	[0,2; 0,3]	

DP – Desvio padrão

IC 95% - Intervalo de confiança de 95% da média

* - $p < 0,05$

Gráfico 7. Fenilacetaldéido – Comparação em dois grupos

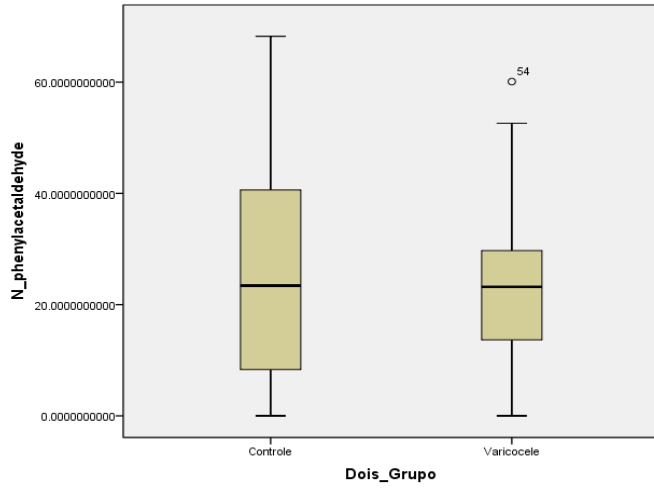


Gráfico 8. Ureia – Comparação em dois grupos

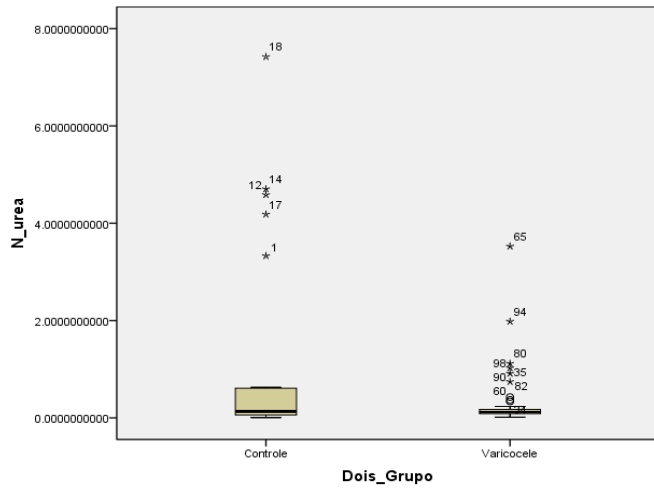


Gráfico 9. Serina – Comparação em dois grupos

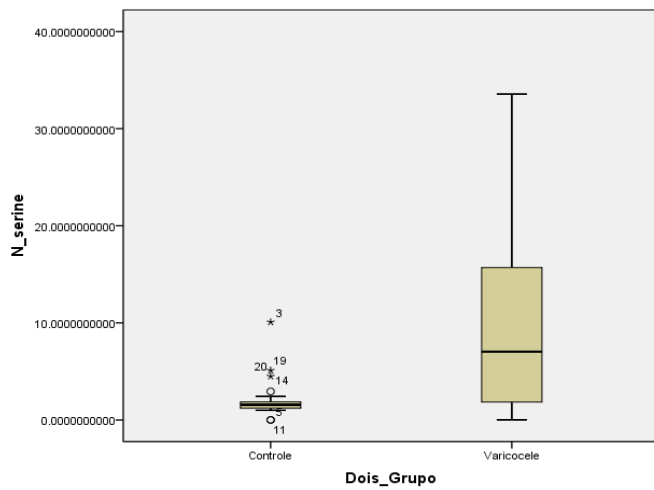


Gráfico 10. Treitol – Comparação em dois grupos

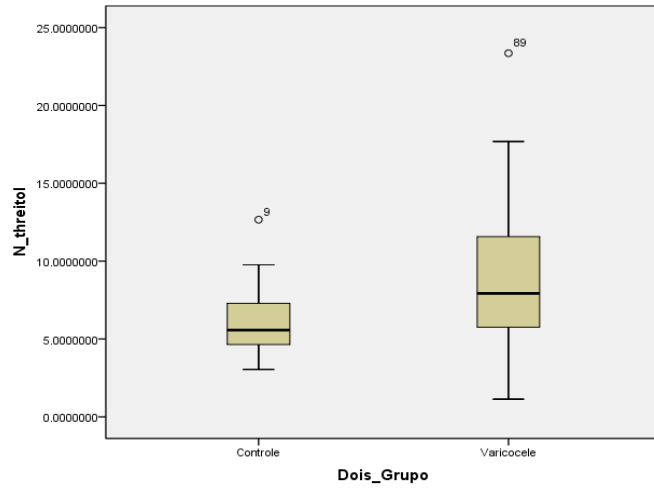


Gráfico 11. Ácido piroglutâmico – Comparação em dois grupos

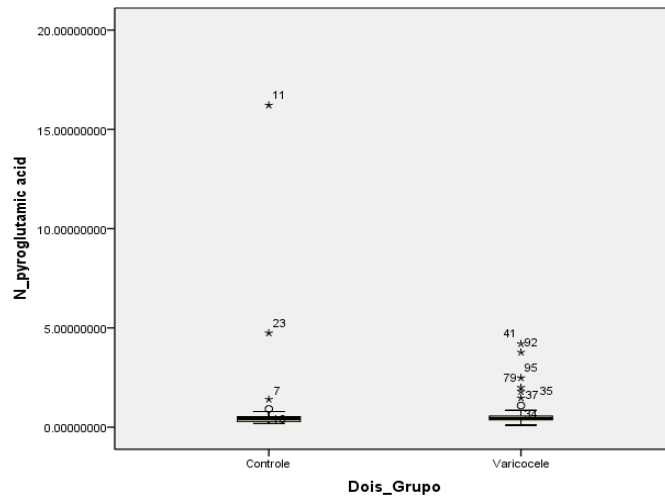


Gráfico 12. Ribose – Comparação em dois grupos

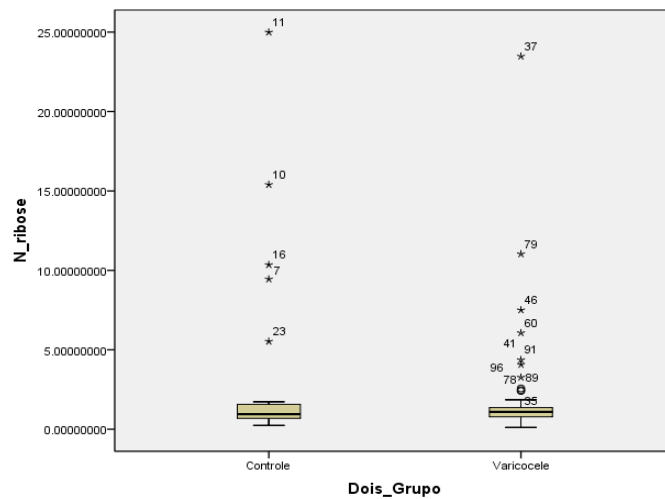


Gráfico 13. N-acetil-D-mannosamina – Comparação em dois grupos

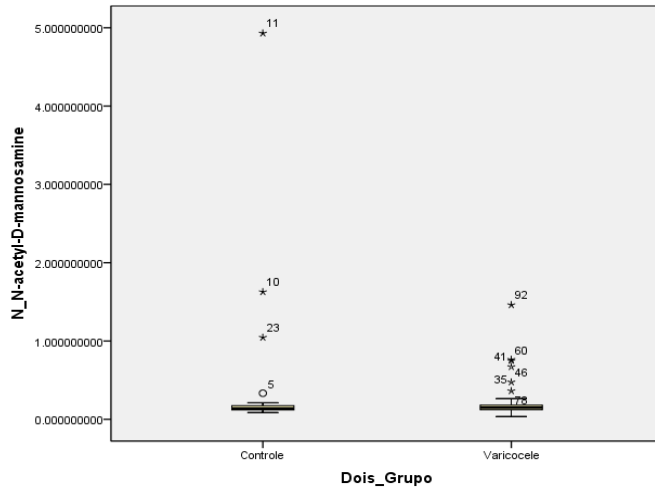


Gráfico 14. Idade – Comparação em dois grupos

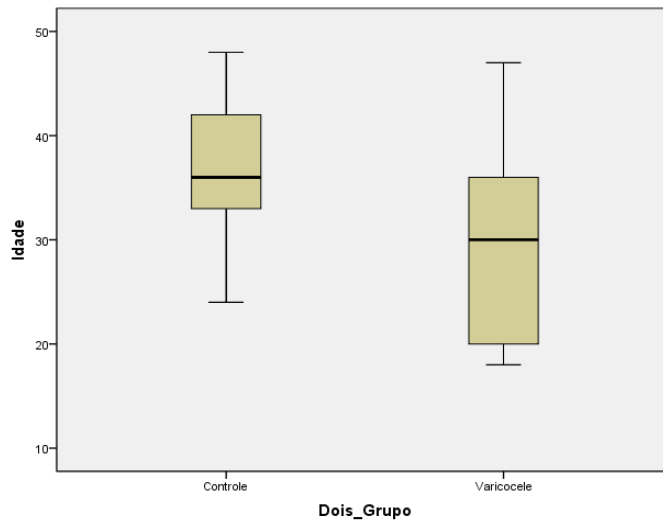


Gráfico 15. Total de móveis – Comparação em dois grupos

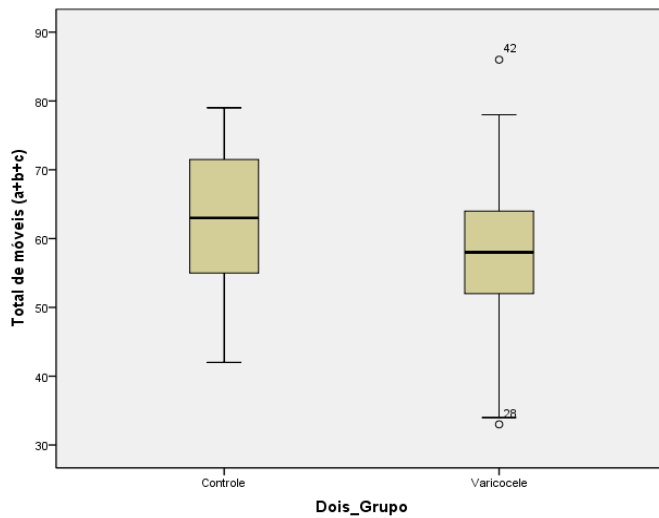
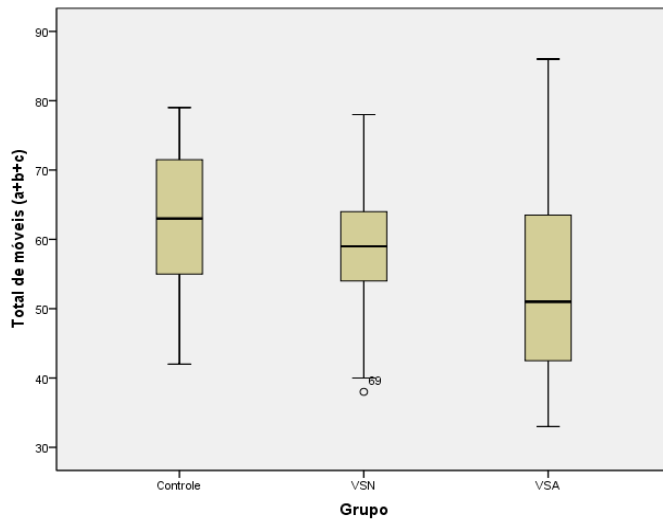


Gráfico 16. Total de móveis – Comparação em três grupos



Ao comparar os parâmetros clínicos entre os dois grupos, observou-se diferença significativa nos parâmetros de idade e índice de massa corporal (IMC). Verificou-se que no quesito idade o grupo com varicocele foi menor, conforme ilustrado no gráfico 14. Essa diferença significativa pode introduzir um viés nos resultados, uma vez que a idade do indivíduo tem sido considerada como um fator capaz de afetar a qualidade do sêmen. Embora a relação entre idade e qualidade seminal ainda não esteja totalmente estabelecida na literatura, estudos indicam que a idade avançada masculina pode impactar aspectos do sêmen, como volume, concentração, motilidade e morfologia (59–61). Além disso, mostra-se que o aumento da idade possa ocasionar aumento nos danos de DNA espermático e ocorrência de doenças genéticas na prole (61).

Ao comparar os parâmetros clínicos em três grupos, foram identificadas diferenças significativas nos seguintes parâmetros: idade, altura, concentração de espermatozoides, contagem total de espermatozoides, motilidade não progressiva, imobilidade, total de espermatozoides móveis, vitalidade e morfologia normal. No entanto, é importante ressaltar que a diferença observada nos parâmetros altura, motilidade não progressiva e imobilidade durante a análise de variância (ANOVA) não se manteve estatisticamente significativa no teste *post-hoc*, podendo ser considerados falsos positivos. Além disso, ao realizar a comparação entre os dois grupos, verificou-se uma diminuição na idade em ambos os grupos de varicocele em relação ao grupo controle. Além disso, os grupos de varicocele apresentaram uma diminuição significativa na concentração de espermatozoides, na morfologia, no total

de espermatozoides móveis e na contagem total de espermatozoides, sendo que essa diminuição foi ainda mais expressiva no grupo de varicocele com sêmen alterado.

5 DISCUSSÃO

Neste estudo, foram realizadas comparações entre os metabólitos presentes no plasma seminal dos indivíduos de duas maneiras distintas. Inicialmente, foram utilizados dois grupos de comparação, sendo eles o grupo controle e o grupo com varicocele. Posteriormente, o grupo com varicocele foi subdividido em varicocele sêmen normal e varicocele sêmen alterado, permitindo assim a comparação entre três grupos distintos. Além disso, foram avaliados os parâmetros clínicos dos pacientes.

Conforme demonstrado na Tabela 4, foram identificados metabólitos com diferenças significativas quando comparados os dois grupos de análise: fenilacetaldéido (N_phenylacetaldehyde), ureia (N_urea), serina (N_serine), treitol (N_threitol), ácido piroglutâmico (N_pyroglutamic acid), ribose (N_ribose) e N-acetilmanosamina (N_N-acetyl-D-mannosamine). Observa-se no Gráfico 7 que o fenilacetaldéido apresentou um aumento no grupo controle em relação à comparação entre os dois grupos analisados. No entanto, o papel específico desse metabólito no plasma seminal ainda não está completamente compreendido. Além disso, não foram observadas diferenças significativas quando realizada a comparação entre os três grupos de análise (51,62).

A ureia foi um metabólito que se mostrou aumentado no grupo controle em relação a ambos os grupos de varicocele, conforme ilustrado nos Gráficos 1 e 8. No contexto do sêmen, a ureia desempenha um papel crucial na osmorregulação e na viabilidade dos espermatozoides. A varicocele é uma condição caracterizada pela dilatação anormal das veias eferentes do testículo, que pode causar um aumento da pressão sanguínea na região testicular. Essa pressão elevada pode resultar em danos nos tecidos testiculares e afetar a função das células produtoras de espermatozoides. Em resposta a esse estresse no tecido testicular, pode ocorrer uma disfunção na regulação osmótica, levando a uma maior concentração de ureia no sêmen. A ureia desempenha um papel importante na osmorregulação, ajudando a manter o equilíbrio osmótico necessário para a sobrevivência e função adequada dos espermatozoides. Portanto, um aumento na concentração de ureia pode ser uma resposta adaptativa do organismo para compensar os efeitos da varicocele nos espermatozoides e na função testicular (63–65).

O ácido piroglutâmico, também conhecido como ácido 5-oxoproline, é um metabólito presente no organismo humano e desempenha diversas funções fisiológicas. No entanto, informações específicas sobre o papel do ácido piroglutâmico no sêmen ainda são limitadas. Embora tenha sido observada uma diferença estatisticamente significativa na análise de dois grupos, ao observar a distribuição dos dados no Gráfico 11, percebe-se que essa diferença entre os grupos é considerada mínima em termos práticos. Além disso, não foram encontradas diferenças significativas ao realizar a comparação entre os três grupos de análise (66–68).

A ribose estava maior no grupo controle ao realizar a comparação entre apenas dois grupos de análise, conforme ilustrado no Gráfico 12. Esse metabólito desempenha um papel essencial na síntese de moléculas de RNA (ácido ribonucleico) e ATP (adenosina trifosfato). Tanto o RNA quanto o ATP desempenham funções vitais no organismo, estando envolvidos em processos bioquímicos fundamentais, como a regulação genética e o fornecimento de energia celular (69,70). Em relação à N-acetilmanosamina, também foi observada uma diferença significativa apenas na comparação entre os dois grupos de análise, com um leve aumento também no grupo controle. No contexto do sêmen, esse metabólito está presente nos fluidos seminais e desempenha diversas funções, como a síntese de glicoconjugados, a proteção e a estabilidade dos espermatozoides, e a regulação da resposta imunológica (71).

A Tabela 3 apresenta os metabólitos que apresentaram alterações significativas ao realizar a comparação entre três grupos de análise. Esses metabólitos incluem ureia (N_urea), serina (N_serine), ácido aspártico (N_aspartic acid), treitol (N_threitol), manitol (N_mannitol/sorbitol) e maltose (N_maltose/cellobiose). É importante destacar que a ureia demonstrou diferença no teste de análise de variância (ANOVA), mas não nos testes *post-hoc*, o que pode indicar a possibilidade de um resultado falso positivo.

Conforme demonstrado no Gráfico 3, o ácido aspártico revelou-se aumentado no grupo de varicocele ao realizar a comparação entre três grupos de análise. O ácido aspártico, também conhecido como ácido aspartato, é um aminoácido não essencial que ocorre naturalmente no corpo humano e em diversas partes do organismo, inclusive no sêmen. O ácido aspártico desempenha um papel crucial ao fornecer intermediários metabólicos essenciais para a produção de ATP,

contribuindo, assim, para a provisão da energia necessária para a motilidade e a função adequada dos espermatozoides. Além disso, a presença do ácido aspártico no sêmen pode estar associada à regulação da atividade neuronal envolvida no controle da motilidade e da função dos espermatozoides. Sua presença pode influenciar os processos neuronais responsáveis por coordenar a movimentação dos espermatozoides e garantir a adequada execução das funções reprodutivas. É importante ressaltar que a elevação observada no nível de ácido aspártico no grupo de varicocele indica possíveis alterações metabólicas e funcionais relacionadas à patologia. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar completamente os mecanismos subjacentes e o impacto específico do ácido aspártico no contexto da varicocele e da função espermática (72–74).

O manitol foi observado em níveis elevados em ambos os grupos de varicocele, conforme evidenciado pelo Gráfico 5 quando utilizado o método de comparação de três grupos. O manitol é um composto químico classificado como um álcool de açúcar ou poliol. Ele é comumente utilizado como um agente diurético, osmótico e redutor. No entanto, informações científicas concretas sobre o papel específico do manitol no sêmen ainda são escassas. Ao realizar a comparação entre apenas dois grupos de análise, não foram identificadas diferenças estatisticamente significativas no nível de manitol. Portanto, apesar do aumento observado nos grupos de varicocele, é necessário conduzir pesquisas adicionais para elucidar o papel preciso do manitol no contexto do sêmen (75–77).

Conforme evidenciado pelo Gráfico 6, ao empregar a comparação entre três grupos, observou-se um aumento significativo da maltose em ambos os grupos de varicocele. No sêmen, a maltose desempenha um papel de relevância como uma fonte de energia para os espermatozoides. Classificada como um carboidrato, a maltose pode ser metabolizada pelos espermatozoides por meio do processo de glicólise, no qual é decomposta em glicose para gerar energia na forma de ATP (trifosfato de adenosina). Essa energia é essencial para a motilidade dos espermatozoides e para a realização das reações bioquímicas necessárias durante a fertilização. Além de seu papel como fonte de energia, a maltose também pode estar envolvida na regulação osmótica do sêmen, contribuindo para a manutenção do equilíbrio osmótico essencial à sobrevivência e à função adequada dos espermatozoides. Assim, a presença aumentada de maltose nos grupos de

varicocele sugere uma possível alteração no metabolismo energético e na regulação osmótica do sêmen nesses indivíduos (78–80).

Os dois metabólitos que demonstraram uma diferença estatisticamente significativa em ambas as abordagens de comparação foram os seguintes: (i) serina, que apresentou um aumento consistente nos grupos varicocele (Gráficos 2 e 9), e (ii) treitol (Gráficos 4 e 10), que também apresentou um aumento significativo nos grupos varicocele.

A serina é um aminoácido que desempenha múltiplos papéis no organismo humano, inclusive no contexto do sêmen. No sêmen, a serina desempenha funções essenciais, tais como a regulação do metabolismo energético e celular, uma vez que é convertida em fosfato de serina, um componente fundamental na produção de ATP (trifosfato de adenosina), a principal molécula de energia celular. Adicionalmente, devido à sua natureza de aminoácido essencial, a serina desempenha um papel crucial no processo de síntese proteica. Além disso, a serina exerce um papel relevante na proteção dos espermatozoides contra danos oxidativos. Especificamente, ela atua como um precursor de antioxidantes endógenos, como o glutathione. A varicocele pode afetar o ambiente testicular, alterando as condições metabólicas e hormonais no local. Essas alterações podem levar a mudanças nos níveis de diferentes metabólitos, incluindo a serina. É possível que a varicocele cause disfunções na produção, transporte ou metabolismo da serina no sistema reprodutivo masculino, resultando em níveis aumentados desse aminoácido no sêmen (3,81–83).

O treitol, também referido como 1,2-etanodiol ou etilenoglicol, é um composto químico cujo papel no sêmen ainda não foi completamente elucidado. Esse composto desempenha diversas funções, como o emprego como solvente em produtos farmacêuticos, sua utilização como estabilizador e conservante, bem como suas propriedades antissépticas e desinfetantes. Além disso, destaca-se sua atuação como agente redutor no organismo humano. O treitol manifesta propriedades redutoras, as quais conferem a capacidade de doar elétrons a outras substâncias químicas. Essa habilidade redutora revela-se vantajosa em uma ampla gama de reações químicas e processos biológicos, incluindo a redução de agentes oxidantes e a regeneração de enzimas. A capacidade do treitol de agir como agente redutor é relevante para a manutenção do equilíbrio redox nas células e tecidos (84–88).

Conforme mencionado anteriormente, existem evidências que indicam que a varicocele está associada ao acúmulo de radicais livres e espécies reativas de oxigênio nos testículos. Essas espécies reativas de oxigênio têm a capacidade de provocar danos nas células testiculares e no DNA, resultando em um estado de estresse oxidativo. O estresse oxidativo, por sua vez, pode exercer um impacto negativo na função testicular e na qualidade dos espermatozoides. Especificamente, pode levar a uma redução na produção de espermatozoides, um aumento nos danos no DNA espermático e uma diminuição na motilidade dos espermatozoides. Tal redução na motilidade dos espermatozoides foi observada neste estudo, onde constatou-se uma diminuição significativa no número total de espermatozoides móveis nos grupos de pacientes com varicocele, em especial no grupo de varicocele com alterações no sêmen (Gráficos 15 e 16).

É relevante salientar que tanto a serina quanto o treitol desempenham um papel significativo como agentes antioxidantes, sendo ambos encontrados em níveis elevados em indivíduos com varicocele. A serina atua como precursora de um antioxidante endógeno fundamental denominado glutationa. A glutationa é uma molécula tripeptídica composta pelos aminoácidos glicina, cisteína e, justamente, serina. A serina fornece o grupo amino necessário para a síntese da glutationa. Essa substância age diretamente na neutralização dos radicais livres, contribuindo para a redução dos danos oxidativos e a proteção celular contra o estresse oxidativo. Além de sua participação na síntese de glutationa, a serina também pode exibir efeitos antioxidantes independentes. Pesquisas sugerem que a serina pode ter a capacidade de diminuir a produção de espécies reativas de oxigênio, agindo diretamente como um antioxidante (81–83).

A presença elevada de serina e treitol em pacientes com varicocele pode ser interpretada como uma possível resposta adaptativa do organismo para mitigar os efeitos do estresse oxidativo ocasionado pela doença. A presença aumentada de serina nos pacientes com varicocele pode indicar uma tentativa do organismo em aumentar a produção desses antioxidantes para combater o estresse oxidativo. O treitol, por sua vez, é um composto que possui propriedades antioxidantes e pode atuar na neutralização de EROs, contribuindo para a redução do estresse oxidativo. O aumento de treitol nos pacientes com varicocele pode ser interpretado como uma resposta adaptativa do organismo para fornecer uma defesa antioxidante adicional. No entanto, é importante ressaltar que a relação entre a varicocele, o estresse

oxidativo e o aumento de serina e treitol ainda requer uma investigação mais aprofundada. Estudos adicionais são necessários para elucidar completamente os mecanismos subjacentes e a relevância clínica dessas alterações metabólicas em pacientes com varicocele (46,51,77,81–83,88).

6 CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

Ao analisarmos os grupos de varicocele com sêmen normal, varicocele com sêmen alterado e pacientes normozoospermicos, observamos que homens com varicocele apresentam metaboloma com maior atividade oxirredutiva quando comparados com paciente sem varicocele e normozoospermicos.

Referências

1. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen [Internet]. [citado 3 de novembro de 2022]. Disponível em: <https://www.who.int/publications-detail-redirect/9789240030787>
2. Unraveling the sperm proteome and post-genomic pathways associated with sperm nuclear DNA fragmentation - PMC [Internet]. [citado 26 de outubro de 2022]. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3800528/>
3. Anamthakulaporn P, Winuthayanon W. Mechanism of semen liquefaction and its potential for a novel non-hormonal contraception†. *Biology of Reproduction*. 4 de agosto de 2020;103(2):411–26.
4. Silva L, Petersen C, Oliveira J, Mauri A, Massaro F, Cavagna M, et al. Male age: Semen quality and fertility: Age X male semen quality. *Jornal Brasileiro de Reproducao Assistida*. 1º de janeiro de 2012;16:91–5.
5. Félix KC, Almeida RJ de. Perspectiva de casais em relação à infertilidade e reprodução assistida: uma revisão sistemática. *Reprodução & Climatério*. 1º de maio de 2016;31(2):105–11.
6. Redmon JB, Carey P, Pryor JL. Varicocele--the most common cause of male factor infertility? *Hum Reprod Update*. fevereiro de 2002;8(1):53–8.
7. Benoff S, Gilbert BR. Varicocele and male infertility: Part I. *Human Reproduction Update*. 1º de janeiro de 2001;7(1):47–54.
8. Jarow JP. Effects of varicocele on male fertility. *Human Reproduction Update*. 1º de janeiro de 2001;7(1):59–64.
9. Brugh VM, Lipshultz LI. Male factor infertility: evaluation and management. *Med Clin North Am*. março de 2004;88(2):367–85.
10. Alsaikhan B, Alrabeeah K, Delouya G, Zini A. Epidemiology of varicocele. *Asian J Androl*. abril de 2016;18(2):179–81.
11. Masson P, Brannigan RE. The varicocele. *Urol Clin North Am*. fevereiro de 2014;41(1):129–44.
12. Hauser R, Paz G, Botchan A, Yogev L, Yavetz H. Varicocele: effect on sperm functions. *Hum Reprod Update*. outubro de 2001;7(5):482–5.
13. Riba LW. Excision of the internal spermatic vein for varicocele. *J Urol*. maio de 1947;57(5):889–96.
14. Tulloch WS. A Consideration of Sterility Factors in the Light of Subsequent Pregnancies. II. Subfertility in the Male. *Edinb Med J*. março de 1952;59(3):T29–34.

15. Tulloch WS. Varicocele in Subfertility. *Br Med J*. 6 de agosto de 1955;2(4935):356–8.
16. Marte A. The history of varicocele: from antiquity to the modern ERA. *Int braz j urol*. junho de 2018;44:563–76.
17. (PDF) A consideration of sterility factors in the light of subsequent pregnancies. I. Factors in the female. (Tr. Edinburgh Obst. Soc. Session 104) [Internet]. [citado 3 de novembro de 2022]. Disponível em: https://www.researchgate.net/publication/260235393_A_consideration_of_sterility_factors_in_the_light_of_subsequent_pregnancies_I_Factors_in_the_female_Tr_Edinburgh_Obst_Soc_Session_104
18. Cozzolino DJ, Lipshultz LI. Varicocele as a progressive lesion: positive effect of varicocele repair. *Hum Reprod Update*. fevereiro de 2001;7(1):55–8.
19. Marmar JL. Varicocele and male infertility: Part II: The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. *Human Reproduction Update*. 1º de setembro de 2001;7(5):461–72.
20. Shiraishi K, Matsuyama H, Takihara H. Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. *Int J Urol*. junho de 2012;19(6):538–50.
21. Fretz PC, Sandlow JI. Varicocele: current concepts in pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Urol Clin North Am*. novembro de 2002;29(4):921–37.
22. Guido C, Perrotta I, Panza S, Middea E, Avena P, Santoro M, et al. Human sperm physiology: estrogen receptor alpha (ER α) and estrogen receptor beta (ER β) influence sperm metabolism and may be involved in the pathophysiology of varicocele-associated male infertility. *J Cell Physiol*. dezembro de 2011;226(12):3403–12.
23. Cocuzza MAS. Avaliação do impacto da varicocele clínica no volume testicular, parâmetros seminais e níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen de homens com fertilidade comprovada [Internet] [Doutorado em Urologia]. [São Paulo]: Universidade de São Paulo; 2011 [citado 3 de novembro de 2022]. Disponível em: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/5/5153/tde-27102011-153419/>
24. Blumer CG, Restelli AE, Giudice PTD, Soler TB, Fraietta R, Nichi M, et al. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. *BJU International*. 2012;109(2):259–65.
25. Mitropoulos D, Deliconstantinos G, Zervas A, Villiotou V, Dimopoulos C, Stavrides J. Nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities in the spermatic vein of patients with varicocele: a potential role for nitric oxide and peroxynitrite in sperm dysfunction. *J Urol*. dezembro de 1996;156(6):1952–8.
26. Ozbek E, Turkoz Y, Gokdeniz R, Davarci M, Ozugurlu F. Increased nitric oxide production in the spermatic vein of patients with varicocele. *Eur Urol*. fevereiro de 2000;37(2):172–5.

27. Tawadrous GA, Aziz AA, Mostafa T. Seminal Soluble Fas Relationship With Oxidative Stress in Infertile Men With Varicocele. *Urology*. 1º de outubro de 2013;82(4):820–3.
28. Cannarella R, Crafa A, Barbagallo F, Mongioì LM, Condorelli RA, Aversa A, et al. Seminal Plasma Proteomic Biomarkers of Oxidative Stress. *Int J Mol Sci*. 30 de novembro de 2020;21(23):E9113.
29. Wang J, Wang J, Zhang HR, Shi HJ, Ma D, Zhao HX, et al. Proteomic analysis of seminal plasma from asthenozoospermia patients reveals proteins that affect oxidative stress responses and semen quality. *Asian J Androl*. julho de 2009;11(4):484–91.
30. Agarwal A, Baskaran S, Panner Selvam MK, Barbăroşie C, Master K. Unraveling the Footsteps of Proteomics in Male Reproductive Research: A Scientometric Approach. *Antioxid Redox Signal*. 10 de março de 2020;32(8):536–49.
31. Camargo M, Intasqui Lopes P, Del Giudice PT, Carvalho VM, Cardozo KHM, Andreoni C, et al. Unbiased label-free quantitative proteomic profiling and enriched proteomic pathways in seminal plasma of adult men before and after varicocelectomy. *Hum Reprod*. janeiro de 2013;28(1):33–46.
32. Cedenho AP, Spaine DM, Barradas V, Srougi M, Oehninger S. Adolescents with varicocele have an impaired sperm-zona pellucida binding capacity. *Fertil Steril*. dezembro de 2002;78(6):1339–40.
33. Hauser R, Paz G, Botchan A, Yogev L, Yavetz H. Varicocele and male infertility: Part II: Varicocele: effect on sperm functions. *Human Reproduction Update*. 1º de setembro de 2001;7(5):482–5.
34. Vivas-Acevedo G, Lozano JR, Camejo MI. Effect of varicocele grade and age on seminal parameters. *Urol Int*. 2010;85(2):194–9.
35. Lacerda JI, Del Giudice PT, da Silva BF, Nichi M, Fariello RM, Fraietta R, et al. Adolescent varicocele: improved sperm function after varicocelectomy. *Fertil Steril*. 1º de março de 2011;95(3):994–9.
36. Report on varicocele and infertility: a committee opinion. *Fertility and Sterility*. 1º de dezembro de 2014;102(6):1556–60.
37. Schlegel PN. Is assisted reproduction the optimal treatment for varicocele-associated male infertility? a cost-effectiveness analysis. *Urology*. 1º de janeiro de 1997;49(1):83–90.
38. Nieschlag E, Hertle L, Fishedick A, Abshagen K, Behre HM. Update on treatment of varicocele: counselling as effective as occlusion of the vena spermatica. *Hum Reprod*. agosto de 1998;13(8):2147–50.
39. Madgar I, Weissenberg R, Lunenfeld B, Karasik A, Goldwasser B. Controlled trial of high spermatic vein ligation for varicocele in infertile men**Supported by the special Programme of Research, Development and Research Training in Human

- Reproduction, World Health Organization, Geneva, Switzerland. Fertility and Sterility. 1º de janeiro de 1995;63(1):120–4.
40. Hamada A, Esteves SC, Nizza M, Agarwal A. Unexplained Male infertility: diagnosis and Management. *Int braz j urol.* outubro de 2012;38:576–94.
 41. Bracke A, Peeters K, Punjabi U, Hoogewijs D, Dewilde S. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reprod Biomed Online.* março de 2018;36(3):327–39.
 42. Guzik DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, et al. Sperm Morphology, Motility, and Concentration in Fertile and Infertile Men. *New England Journal of Medicine.* 8 de novembro de 2001;345(19):1388–93.
 43. Kovac JR, Pastuszak AW, Lamb DJ. The use of genomics, proteomics, and metabolomics in identifying biomarkers of male infertility. *Fertil Steril.* 15 de março de 2013;99(4):998–1007.
 44. Zhang A, Sun H, Wang P, Han Y, Wang X. Recent and potential developments of biofluid analyses in metabolomics. *J Proteomics.* 2 de fevereiro de 2012;75(4):1079–88.
 45. Stevens VL, Hoover E, Wang Y, Zanetti KA. Pre-Analytical Factors that Affect Metabolite Stability in Human Urine, Plasma, and Serum: A Review. *Metabolites.* 25 de julho de 2019;9(8):E156.
 46. Rattray NJW, Deziel NC, Wallach JD, Khan SA, Vasiliou V, Ioannidis JPA, et al. Beyond genomics: understanding exposotypes through metabolomics. *Hum Genomics.* 26 de janeiro de 2018;12(1):4.
 47. Čuperlović-Culf M, Barnett DA, Culf AS, Chute I. Cell culture metabolomics: applications and future directions. *Drug Discovery Today.* 1º de agosto de 2010;15(15):610–21.
 48. Newgard CB. Metabolomics and Metabolic Diseases: Where Do We Stand? *Cell Metab.* 10 de janeiro de 2017;25(1):43–56.
 49. Newgard CB. Metabolomics and Metabolic Diseases: Where Do We Stand? *Cell Metab.* 10 de janeiro de 2017;25(1):43–56.
 50. Wishart DS, Jewison T, Guo AC, Wilson M, Knox C, Liu Y, et al. HMDB 3.0--The Human Metabolome Database in 2013. *Nucleic Acids Res.* janeiro de 2013;41(Database issue):D801-807.
 51. Guo H, Li X, Zhang Y, Li J, Yang J, Jiang H, et al. Metabolic characteristics related to the hazardous effects of environmental arsenic on humans: A metabolomic review. *Ecotoxicology and Environmental Safety.* 1º de maio de 2022;236:113459.
 52. Panner Selvam MK, Finelli R, Agarwal A, Henkel R. Proteomics and metabolomics - Current and future perspectives in clinical andrology. *Andrologia.* março de 2021;53(2):e13711.

53. Nicholson JK, Lindon JC, Holmes E. "Metabonomics": understanding the metabolic responses of living systems to pathophysiological stimuli via multivariate statistical analysis of biological NMR spectroscopic data. *Xenobiotica*. novembro de 1999;29(11):1181–9.
54. Xu Y, Lu H, Wang Y, Zhang Z, Wu Q. Comprehensive metabolic profiles of seminal plasma with different forms of male infertility and their correlation with sperm parameters. *J Pharm Biomed Anal*. 5 de janeiro de 2020;177:112888.
55. Erben V, Bhardwaj M, Schrotz-King P, Brenner H. Metabolomics Biomarkers for Detection of Colorectal Neoplasms: A Systematic Review. *Cancers (Basel)*. 27 de julho de 2018;10(8):246.
56. Ruiz-Canela M, Hruby A, Clish CB, Liang L, Martínez-González MA, Hu FB. Comprehensive Metabolomic Profiling and Incident Cardiovascular Disease: A Systematic Review. *J Am Heart Assoc*. 28 de setembro de 2017;6(10):e005705.
57. Minai-Tehrani A, Jafarzadeh N, Gilany K. Metabolomics: a state-of-the-art technology for better understanding of male infertility. *Andrologia*. 2016;48(6):609–16.
58. Amelar RD, Dubin L, Schoenfeld C. Semen analysis: An office technique. *Urology*. 1º de dezembro de 1973;2(6):605–11.
59. Cavalcante MB, Rocha M de P, Dias MLCM, Dias OJQ, Souza DO de A, Roberto IG. Interferência da idade sobre a qualidade seminal. *Rev Bras Ginecol Obstet*. novembro de 2008;30:561–5.
60. Silva LFI da [UNESP. Efeito da idade do homem na avaliação do sêmen pela Motile Sperm Organelle Morphology Examination (MSOME). *Aleph*. 29 de fevereiro de 2012;60 f.
61. Gomes DA, De AP, Da SC, Barbosa F, Tonelli M, Mól PA. O EFEITO DA IDADE PATERNA AVANÇADA NA FERTILIDADE E NA GRAVIDEZ. 2021;
62. Kozłowska L, Janasik B, Nowicka K, Wąsowicz W. A urinary metabolomics study of a Polish subpopulation environmentally exposed to arsenic. *Journal of Trace Elements in Medicine and Biology*. 1º de julho de 2019;54:44–54.
63. Dietz RW, Flipse RJ. Metabolism of Bovine Semen. XX. Role of ammonia in interactions between the citric acid and urea cycles1. *Biology of Reproduction*. 1º de junho de 1969;1(2):200–6.
64. Correlation of Uric Acid, Urea, Ammonia and Creatinine of Seminal Plasma With Semen Parameters and Fertilization Rate in Infertile Couples [Internet]. [citado 19 de junho de 2023]. Disponível em: <https://ajmb.umsha.ac.ir/Article/ajmb-122>
65. Influence of urea on semen quality. [Internet]. [citado 19 de junho de 2023]. Disponível em: <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/19621406338>
66. Abraham GN, Podell DN. Pyroglutamic acid. *Mol Cell Biochem*. 1º de janeiro de 1981;38(1):181–90.

67. Chelius D, Jing K, Lueras A, Rehder DS, Dillon TM, Vizek A, et al. Formation of Pyroglutamic Acid from N-Terminal Glutamic Acid in Immunoglobulin Gamma Antibodies. *Anal Chem.* 1º de abril de 2006;78(7):2370–6.
68. Pyroglutamic acid: throwing light on a lightly studied metabolite on JSTOR [Internet]. [citado 19 de junho de 2023]. Disponível em: <https://www.jstor.org/stable/24083854>
69. Lapwood KR, Martin ICA, Entwistle KW. The fertility of Merino ewes artificially inseminated with semen diluted in solutions based on skim milk, glucose or ribose. *Aust J Agric Res.* 1972;23(3):457–66.
70. Mann T, Rottenberg DA. THE CARBOHYDRATE OF HUMAN SEMEN. *Journal of Endocrinology.* 1º de fevereiro de 1966;34(2):257-NP.
71. ENZYMATIC PHOSPHORYLATION OF N-ACETYL-D-MANNOSAMINE* | PNAS [Internet]. [citado 19 de junho de 2023]. Disponível em: <https://www.pnas.org/doi/abs/10.1073/pnas.47.7.955>
72. Di Fiore MM, Boni R, Santillo A, Falvo S, Gallo A, Esposito S, et al. D-Aspartic Acid in Vertebrate Reproduction: Animal Models and Experimental Designs ‡. *Biomolecules.* setembro de 2019;9(9):445.
73. Macchia G, Topo E, Mangano N, D’Aniello E, Boni R. dl-Aspartic acid administration improves semen quality in rabbit bucks. *Animal Reproduction Science.* 1º de abril de 2010;118(2):337–43.
74. Brown-Woodman PDC, White IG. Amino Acid Composition of Semen and the Secretions of the Male Reproductive Tract. *Aust Jnl Of Bio Sci.* 1974;27(4):415–22.
75. Clark JBK, Graham EF, Lewis BA, Smith F. d-MANNITOL, ERYTHRITOL AND GLYCEROL IN BOVINE SEMEN. *Reproduction.* 1º de abril de 1967;13(2):189–97.
76. Verberckmoes S, Van Soom A, Dewulf J, De Pauw I, De Kruif A. Storage of Fresh Bovine Semen in a Diluent Based on the Ionic Composition of Cauda Epididymal Plasma. *Reproduction in Domestic Animals.* 2004;39(6):410–6.
77. King TE, Mann TRR. Sorbitol metabolism in spermatozoa. *Proceedings of the Royal Society of London Series B Biological Sciences.* janeiro de 1997;151(943):226–43.
78. Pfannmuller J, Noë A. Enzymatic Synthesis of Higher Carbohydrates from Dextrose. *Science.* 29 de fevereiro de 1952;115(2983):240–1.
79. Sinowatz F, Gabius HJ, Amselgruber W. Surface sugar binding components of bovine spermatozoa as evidenced by fluorescent neoglycoproteins. *Histochemistry.* 1º de maio de 1988;88(3):395–9.
80. Giese AC, Wells PH. Protective Effect of Glycine on Sperm Exposed to Light. *Science.* 29 de fevereiro de 1952;115(2983):239–40.

81. Anamthakul P, Erickson JA, Winuthayanon W. Blocking serine protease activity prevents semenogelin degradation leading to hyperviscous semen in humans. *Biology of Reproduction*. 1º de maio de 2022;106(5):879–87.
82. Emami N, Diamandis EP. Potential role of multiple members of the kallikrein-related peptidase family of serine proteases in activating latent TGF β 1 in semen. 1º de janeiro de 2010;391(1):85–95.
83. Thananurak P, Chuaychu-noo N, Th  lie A, Phasuk Y, Vongpralub T, Blesbois E. Different concentrations of cysteamine, ergothioneine, and serine modulate quality and fertilizing ability of cryopreserved chicken sperm. *Poultry Science*. 1º de fevereiro de 2020;99(2):1185–98.
84. Simpson GLW, Ortwerth BJ. The non-oxidative degradation of ascorbic acid at physiological conditions. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 15 de abril de 2000;1501(1):12–24.
85. Maret W, Auld DS. ACS Publications. American Chemical Society; 2002 [citado 19 de junho de 2023]. Purification and characterization of human liver sorbitol dehydrogenase. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/pdf/10.1021/bi00405a035>
86. Pitkänen E. The conversion of d-xylose into d-threitol in patients without liver disease and in patients with portal liver cirrhosis. *Clinica Chimica Acta*. 1º de outubro de 1977;80(1):49–54.
87. Miller LK, Smith JS. Production of threitol and sorbitol by an adult insect: association with freezing tolerance. *Nature*. dezembro de 1975;258(5535):519–20.
88. A General Strategy for the Discovery of Metabolic Pathways: d-Threitol, l-Threitol, and Erythritol Utilization in *Mycobacterium smegmatis* | *Journal of the American Chemical Society* [Internet]. [citado 19 de junho de 2023]. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jacs.5b08968>