

Matheus Ferreira Gröner

**VARICOCELE NA ADOLESCÊNCIA: AVALIAÇÃO DOS
EFEITOS A LONGO PRAZO EM PACIENTES TRATADOS E
NÃO TRATADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de São Paulo – Escola Paulista de Medicina, para obtenção do título de Doutor em Ciências.

São Paulo
2023

Matheus Ferreira Gröner

**VARICOCELE NA ADOLESCÊNCIA: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS A
LONGO PRAZO EM PACIENTES TRATADOS E NÃO TRATADOS**

Tese apresentada à Universidade Federal de
São Paulo – Escola Paulista de Medicina,
para obtenção do título de Doutor em
Ciências.

Orientador:

Prof. Dr. Renato Fraietta

São Paulo

2023

Ferreira Gröner, Matheus

Varicocele na adolescência: avaliação dos efeitos a longo prazo em pacientes tratados e não tratados

/ Matheus Ferreira Gröner. - São Paulo, 2023.

XIV, 50f.

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

Título em inglês: Adolescent varicocele: Long-term evaluation in treated and untreated patients

1. varicocele. 2. adolescência. 3. análise do sêmen. 4. infertilidade.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO PAULO
ESCOLA PAULISTA DE MEDICINA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA (UROLOGIA)

Chefe da Disciplina:

Prof. Dr. Fernando Gonçalves de Almeida

Coordenadora do Programa de Pós-graduação:

Profa. Dra. Mariana Pereira Antoniassi

Matheus Ferreira Gröner

**VARICOCELE NA ADOLESCÊNCIA: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS A
LONGO PRAZO EM PACIENTES TRATADOS E NÃO TRATADOS**

Presidente da Banca:

Prof. Dr. Renato Fraietta

Banca Examinadora:

Profa. Dra. Mariana Camargo

Prof. Dr. Sidney Glina

Prof. Dr. José Iran de Medeiros Lacerda

Profa. Dra. Larissa Berlofa Belardin

Data da defesa: 28/11/2023

Dedicatória

Dedico este trabalho à toda equipe de pesquisa do Setor integrado de Reprodução Humana que há décadas tem se mostrado forte e atuante na importância da avaliação e tratamento de adolescentes para melhora do potencial fértil futuro destes homens

Agradecimentos

Na realização da presente dissertação, contei com o apoio direto ou indireto de múltiplas pessoas e instituições às quais estou profundamente grato. Correndo o risco de injustamente não mencionar algum dos contributos quero deixar expresso os meus agradecimentos:

Ao orientador desta dissertação o Prof. Dr. Renato Fraietta, pela orientação prestada, pelo seu incentivo, disponibilidade e apoio que sempre demonstrou. Aqui lhe exprimo a minha gratidão.

Ao Prof. Dr. Ricardo Pimenta Bertolla, pelo apoio na elaboração deste trabalho e disponibilidade para auxiliar em diversas fases do projeto.

À Mestra Renata de Carvalho, por me apresentar ao mundo da análise funcional dos espermatozoides e me auxiliar no ganho de conhecimento e técnicas na área.

À Dra. Valéria Barradas e à Mestra Carolina Homsy pela disponibilidade e exímia avaliação seminal realizada dos pacientes desse projeto; foram peças fundamentais para realização dessa pesquisa.

À minha família e amigos que sempre acreditaram em mim e me deram forças a seguir firme naquilo que queria, pela paciência e atenção que prestaram em momentos menos fáceis.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES),
pelo apoio a esse projeto de pesquisa.

**“Há verdadeiramente duas coisas diferentes: saber e crer que se sabe.
A ciência consiste em saber; em crer que se sabe reside a ignorância.”
(Hipócrates)**

Resumo

Objetivo: A varicocele tem início na adolescência e seus efeitos deletérios podem diminuir o potencial fértil progressivamente, sendo bem documentado que seu tratamento pode melhorar esse potencial a curto prazo, porém, ainda são escassas as evidências de melhora a longo prazo. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial fértil, a longo prazo, de pacientes com diagnóstico de varicocele tratados e não tratados durante a adolescência. **Método:** O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP, sendo elaborado um desenho longitudinal de coorte retrospectivo em que os pacientes foram convocados e avaliados no Setor Integrado de Reprodução Humana da UNIFESP, durante a adolescência, então diagnosticados com varicocele grau II ou III. Neste momento inicial esses pacientes foram observados (Grupo não operado) ou operados pela técnica de Marmar (Grupo operado) se apresentassem indicação clínica. Durante o desenvolvimento do projeto, foram reavaliados clinicamente e através de análise seminal e de avaliação funcional dos espermatozoides através de análise de Integridade do DNA espermático, atividade mitocondrial e integridade do acrossoma, para determinar o atual potencial fértil. **Resultados:** Foram avaliados 33 pacientes, sendo 14 do grupo não operado e 19 do grupo operado. Foram excluídos 4 pacientes do grupo operado devido à recidiva. O intervalo entre as avaliações foi em média de 10 anos. Quanto à análise seminal, no grupo não operado, houve uma diminuição significativa da motilidade progressiva ($p = 0,009$). No grupo operado houve aumento significativo da concentração espermática ($p = 0,003$), do número total de espermatozoides móveis (TSM) ($p = 0,003$) e do número total de espermatozoides móveis morfolologicamente normais (TSMMN) ($p = 0,004$). Na avaliação funcional dos espermatozoides, não houve diferença estatisticamente significativa. **Conclusões:** O tratamento da varicocele na adolescência pode impactar positivamente no potencial fértil, sendo observada uma melhora significativa e progressiva dos parâmetros seminais no grupo operado, mantida após 10 anos de tratamento. Há indícios de uma piora na motilidade progressiva em adolescentes não operados, potencialmente sem relevância clínica.

Descritores: Adolescência; Varicocele; Análise do Sêmen; Infertilidade.

Abstract

Objective: Varicocele onset is from the beginning of adolescence and its deleterious effects can reduce fertility potential. It is well documented that its treatment leads to a short-term improvement, but there is still low evidence of long-term improvement after treatment. The objective of this study is to evaluate the long-term fertility potential of patients diagnosed with varicocele, treated and untreated during adolescence.

Methods: This study was approved by the Research Ethics Committee and a longitudinal retrospective cohort study was carried out in patients evaluated during adolescence who were recruited, and were then diagnosed with varicocele. At this initial moment, these patients were observed (non-operated group) or operated by the Marmar technique (operated group). During the development of the project, they were reassessed clinically and through semen analysis and sperm functional evaluation to determine the current fertility potential, excluding patients with other fertility loss factors or recurrent varicocele. For statistical analysis in this study an alpha error of 0.05 ($p < 0.05$) was adopted. **Results:** Thirty-three patients were evaluated, 14 from the non-operated group and 19 from the operated group. 4 patients were excluded from the operated group because they had clinical recurrence. The interval between evaluations was on average 10 years. As for the seminal analysis, in the non-operated group, when comparing the initial and current seminal analysis, there was a significant decrease in progressive motility ($p = 0.009$). In the operated group, there was a significant increase in sperm concentration ($p = 0.003$), total motile sperm count ($p = 0.003$) and total motile sperm count with normal morphology ($p = 0.004$). In terms of the sperm functional evaluation, there was no significant difference when comparing the current groups or the initial and final evaluation of the operated group. **Conclusions:** We observed that the non-operated group, after 10 years, presented a progressive motility decrease in semen analysis, but potentially with no clinical relevance. In the operated group, there was a long-term improvement in fertility potential, even with no significant improvement in short-term reevaluation, after 10 years the semen analysis of the operated group is similar to patients without varicocelectomy indication.

Keywords: Adolescence; Varicocele; Seminal analysis; Infertility.

Sumário

Dedicatória	v
Agradecimentos	vi
Resumo	ix
Abstract	x
Lista de figuras	xii
Lista de tabelas.....	xiii
Lista de abreviaturas, siglas e símbolos.....	xiv
1 INTRODUÇÃO	1
2 OBJETIVOS.....	4
2.1 Objetivo geral.....	5
2.2 Objetivos específicos	5
3 MÉTODOS	6
3.1 Pacientes e coleta de amostra.....	7
3.2 Avaliação Clínica	8
3.3 Análise Seminal	8
3.4 Avaliação funcional dos espermatozoides	9
3.4.1 Análise de fragmentação do DNA espermático.....	9
3.4.2 Análise da integridade do acrossoma do espermatozoide	10
3.4.3 Análise da atividade mitocondrial do espermatozoide.....	11
3.5 Análise Estatística.....	12
4 RESULTADOS	14
4.1 Análise seminal do grupo não operado	16
4.2 Análise do grupo operado	17
4.2.1 Análise seminal do grupo operado.....	17
4.2.2 Avaliação seminal em 3 tempos do grupo operado.....	18
4.2.3 Avaliação funcional dos espermatozoides do grupo operado.....	19
4.3 Análise entre grupos operados e não operados.....	21
4.3.1 Análise seminal entre os grupos	21
4.3.2 Avaliação funcional dos espermatozoides entre os grupos	23
5 DISCUSSÃO	24
6 CONCLUSÕES.....	31
7 REFERÊNCIAS	33
ANEXOS	41

Lista de figuras

Figura 1 - Fragmentação do DNA dos espermatozoides realizada pelo Ensaio Cometa Alcalino. Classificação dos espermatozoides em classes de I a IV.	10
Figura 2 - Integridade do acrossoma realizada pela técnica de PNA-FITC. Classificado em acrossoma íntegro (A) e acrossoma não íntegro (B).....	11
Figura 3 - Atividade mitocondrial dos espermatozoides realizada por coloração DAB. Classificação dos espermatozoides em classes de I a IV.	12
Figura 4 - Análise de Pacientes	15
Figura 5 – Média do TSM entre grupos na adolescência e atualmente	27
Figura 6 – Média do TSMMN entre grupos na adolescência e atualmente	28

Lista de tabelas

Tabela 1 – Análise seminal dos pacientes não operados, na adolescência e atualmente. Os dados foram comparados pelo teste de Wilcoxon.....	16
Tabela 2 - Análise seminal dos pacientes operados, na adolescência e atualmente. Os dados foram comparados pelo teste de Wilcoxon.....	17
Tabela 3 – Análise seminal dos pacientes operados, na adolescência, pós-operatório curto prazo e atualmente. Os dados foram comparados pelo teste de ANOVA Medidas Repetidas.	18
Tabela 4 - Análise de atividade mitocondrial dos espermatozoides de pacientes operados, na adolescência e atualmente. Os dados foram comparados pelo teste de Wilcoxon.....	19
Tabela 5 - Análise de integridade do DNA espermático de pacientes operados, na adolescência e atualmente. Os dados foram comparados pelo teste de Wilcoxon.	20
Tabela 6 - Análise seminal atualmente entre os grupos. Os dados foram comparados pelo teste t de Student para amostras independentes.	21
Tabela 7 - Análise seminal na adolescência entre os grupos. Os dados foram comparados pelo teste t de Student para amostras independentes.	22
Tabela 8 – Análise de provas funcionais atualmente entre os grupos. Os dados foram comparados pelo teste t de Student para amostras independentes.	23

Lista de abreviaturas, siglas e símbolos

ASRM	<i>American Society for Reproductive Medicine</i>
AUA	<i>American Urological Association</i>
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DP	Desvio Padrão
ECA	Estatuto da Criança e do Adolescente
IC	Intervalo de confiança
OMS	Organização Mundial da Saúde
mL	mililitros
PAWS	<i>Predictive Analytics Software</i>
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i>
PNA-FITC	<i>Peanut agglutinin</i> – isoticianato de fluoresceína
PR	Progressiva
RP	Ranqueamento Positivo (<i>Positive Rank</i>)
RN	Ranqueamento Negativo (<i>Negative Rank</i>)
SPSS	<i>Statistical Package for Social Science for Windows</i>
T	Empate (<i>Ties</i>)
TBE	TRIS / Borato / EDTA
TSM	Número total de espermatozoides móveis
TSMMN	Número total de espermatozoides móveis morfológicamente normais
UNIFESP	Universidade Federal de São Paulo

1 INTRODUÇÃO

A Adolescência é o período de transição entre a infância e a vida adulta, caracterizada pelos impulsos do desenvolvimento físico, mental, emocional, sexual e social (1), e seus limites cronológicos são definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) entre 10 e 19 anos (2). No Brasil, a lei 8.069 de 1990 do Estatuto da Criança e do Adolescente (ECA) considera criança a pessoa até 12 anos de idade incompletos e define a adolescência como a faixa etária de 12 a 18 anos de idade (3).

A varicocele é definida como a dilatação anormal das veias espermáticas internas do plexo pampiniforme, associada a refluxo local (4), possui como padrão ouro para o diagnóstico o próprio exame físico em ortostase, com iluminação e temperatura adequadas, e é classificada em: grau I – não visibilizada e não palpada em repouso, mas palpada em manobra de Valsalva; grau II – não visibilizada, mas palpada em repouso; grau III – visibilizada em repouso (5,6). Ocorre em 15% da população masculina adulta com aparecimento desde o início da adolescência, mantendo um platô a partir dos 15 anos de idade durante toda a vida adulta (7). Neste período, os efeitos deletérios da varicocele podem diminuir o potencial fértil destes homens progressivamente (8).

A infertilidade é definida como ausência de gestação, após 12 meses de relações sexuais, bem distribuídas ao longo do ciclo menstrual da mulher, sem uso de método contraceptivo possuindo um diagnóstico clínico retrospectivo (9). Fora deste contexto de casal infértil, podemos tentar inferir a fertilidade de cada indivíduo através de uma avaliação clínica e exames subsidiários para determinar seu potencial fértil.

Nos adolescentes podemos utilizar a assimetria testicular, estando bem documentado que a diminuição do volume testicular ipsilateral à varicocele está associada à piora dos parâmetros seminais (10). Outro método que pode ser utilizado é a análise seminal convencional, especialmente a utilização de valores como número total de espermatozoides móveis (TSM) e o número total de espermatozoides móveis morfolologicamente normais (TSMMN) que são bons preditores de fertilidade (11,12,13).

Apesar da análise seminal continuar sendo uma ferramenta essencial na avaliação do potencial fértil masculino, ela possui diversas limitações e variações e, nos últimos anos, outras análises funcionais dos espermatozoides têm surgindo com destaque à integridade do DNA espermático (14). Neste teste são avaliados danos no DNA espermático que não são corrigidos como deveriam, inferindo um sistema de

reparo celular disfuncional (15). Já existem evidências da associação entre o aumento de fragmentação do DNA espermático e infertilidade, piores desfechos reprodutivos e abortamento habitual (16).

Já está bem descrito na literatura o efeito deletério da varicocele no potencial fértil dos adolescentes (17,18). Dessa forma, a Associação Americana de Urologia (AUA) e a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM) sugerem que seja ofertado o tratamento para adolescentes com varicocele em caso de assimetria ou atraso de crescimento testicular ou frente a alterações seminais (19,20), sendo também reconhecida a melhora desse potencial pós tratamento quanto à recuperação de crescimento testicular (21), de melhora seminal e dos parâmetros funcionais dos espermatozoides a curto prazo (18,22,23). Porém, ainda são escassas as evidências de melhora do potencial fértil a longo prazo, assim como melhora nas taxas de paternidade destes pacientes (24,25).

Dessa forma, acreditamos que a manutenção de varicocele clínica desde a adolescência, ou o seu tratamento nesta faixa etária, podem impactar no potencial fértil e na paternidade futura, sendo que a manutenção da doença traria impacto negativo e sua correção, nesse período, poderia trazer um impacto positivo nesses desfechos.

2.1 Objetivo geral

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial fértil, a longo prazo, de pacientes com diagnóstico de varicocele tratados e não tratados cirurgicamente durante a adolescência.

2.2 Objetivos específicos

Visando entender o papel da manutenção e do tratamento da varicocele desde a adolescência nos desfechos reprodutivos - potencial fértil e paternidade, tivemos como objetivos específicos avaliar:

- Evolução do potencial fértil em pacientes tratados e não tratados na adolescência;
- Presença e facilidade ou dificuldade em alcançar a paternidade no momento atual.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de São Paulo – UNIFESP (CAAE: 94100818.6.0000.5505), sem auxílio de financiamento (ANEXO 1).

3.1 Pacientes e coleta de amostra

Foi elaborado um estudo longitudinal de coorte retrospectivo em que convocamos pacientes previamente avaliados no Setor Integrado de Reprodução Humana da UNIFESP, durante a adolescência, então diagnosticados com varicocele. Neste momento inicial esses pacientes foram observados ou operados pela técnica microcirúrgica subinguinal (fator de exposição). Durante o desenvolvimento do trabalho, foram reavaliados clinicamente e através de análise seminal e de avaliação funcional dos espermatozoides para determinar o atual potencial fértil (desfecho).

Durante as últimas décadas nosso grupo de pesquisa realizou diversos estudos com adoscentes e varicocele, trazendo uma janela de oportunidade de reavaliação a longo prazo dessa população. A amostra foi composta por conveniência, sendo elegíveis a participarem do estudo os pacientes avaliados previamente no Setor Integrado de Reprodução Humana da UNIFESP, com desenvolvimento sexual Tanner IV e V e com ao menos duas análises seminais durante a adolescência, assim categorizados:

- Grupo Sem Varicocele: Pacientes com varicocele ausente ou Grau I avaliados dos 14 aos 19 anos;
- Grupo Não Operado: Pacientes com varicocele Grau II e Grau III avaliados dos 14 aos 19 anos, sem indicação cirúrgica e, portanto, não operados;
- Grupo Operado: Pacientes com varicocele Grau II e Grau III avaliados e submetidos à varicocelectomia microcirúrgica subinguinal pela técnica de Marmar dos 14 aos 19 anos, devido à presença de assimetria testicular e/ou alteração seminal.

Estes pacientes foram convocados, por contato postal e/ou telefônico, e os que aceitaram participar do projeto, após serem orientados e assinarem o termo de consentimento livre e esclarecido (ANEXO 2), foram avaliados no Setor Integrado de Reprodução Humana da UNIFESP, através de avaliação clínica, análise seminal e avaliação funcional dos espermatozoides.

3.2 Avaliação Clínica

Foi realizada consulta ambulatorial no Setor Integrado de Reprodução Humana, com levantamento de variáveis que pudessem influenciar na fertilidade, com preenchimento de ficha de avaliação (ANEXO 3). Foram excluídos do trabalho pacientes com fatores de grande importância na perda de potencial fértil, sendo eles: doença aguda moderada ou grave nos últimos 3 meses, criptorquidia, orquite viral, quimioterapia, radioterapia pélvica, uso de anabolizantes e Obesidade graus II ou III.

Foi avaliado também desejo atual e sucesso de gestação neste período, assim como necessidade de procura a serviço de reprodução humana e tratamentos realizados.

No exame físico, foi realizado todo o exame genital masculino com reavaliação clínica da varicocele, sob iluminação adequada e temperatura de sala controlada entre 22° a 24° centígrados, graduando-a de I a III e aferição de tamanho testicular com orquidômetro de Prader.

Os pacientes do grupo operado que apresentaram recidiva clínica de doença, diagnosticada por presença de refluxo no exame físico e confirmada com mesmo achado em ultrassonografia doppler de bolsa testicular (26), foram excluídos da análise.

3.3 Análise Seminal

Os pacientes foram encaminhados para coleta de 2 amostras seminais, em dias diferentes, através de masturbação, no Laboratório de Andrologia do Setor de Reprodução Humana da UNIFESP, com prévia orientação de 3 a 5 dias de abstinência ejaculatória, utilizando a média das duas aferições como resultado. Após liquefação seminal, sua análise foi feita de acordo com critérios da OMS 2010 (27), sendo considerados como valores de referência: Volume $\geq 1,5\text{mL}$, Concentração $\geq 15 \times 10^6/\text{mL}$, motilidade progressiva (PR) $\geq 32\%$ e morfologia normal $\geq 4\%$. Foram utilizados também parâmetros numéricos de TSM através da multiplicação da Concentração x Volume x Motilidade PR e TSMMN através da multiplicação do TSM pelo valor da morfologia de Kruger.

3.4 Avaliação funcional dos espermatozoides

Foi obtida uma alíquota de cada coleta seminal dos pacientes para avaliação de:

3.4.1 Análise de fragmentação do DNA espermático

Para avaliar os níveis de fragmentação de DNA dos espermatozoides, utilizamos o método Ensaio Cometa Alcalino. Duas lâminas de microscopia (Precision Glass Line, China) foram previamente preparadas com 1000 µL de *agarose normal melting point* (GE Healthcare, Amersham, Inglaterra) 1% (p:v) em TBE (0,1 M Tris [GE Healthcare, Amersham Place, Reino Unido]; 0,083 M ácido bórico; 0,001 M Na₂-EDTA [Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, França]). Em cada lâmina, foram adicionados 100 µL de sêmen devidamente diluído em *agarose low melting point* (GE Healthcare, Amersham, Inglaterra) 0,75% (p:v) em TBE, obtendo assim uma concentração final de 1x10⁶ espermatozoides/mL; em seguida as lâminas foram cobertas por lamínulas (Precision Glass Line, China) e deixadas a 4°C por 10 minutos para a agarose solidificar. Após este período, retiramos as lamínulas e adicionamos 300 µL de *agarose low melting point* 0,75% (p:v) em TBE; as lamínulas foram novamente adicionadas e as lâminas permaneceram por mais 10 minutos à temperatura de 4°C. Ao final deste tempo, as lamínulas foram devidamente descartadas e adicionamos 2 mL de solução de lise gelada (100 mM Na₂-EDTA, 10 mM Tris, 2,5 M NaCl, 2% [v:v] Triton X-100, 4 mM DTT [ditiotreitól – GE Healthcare, Amersham Place, Reino Unido], pH11,0) que ali permaneceu por 2 horas distribuídas em 1mL a cada hora em uma temperatura de 4°C. Passado esse tempo, as lâminas foram lavadas duas vezes com água Milli-Q em intervalos de cinco minutos com o objetivo de remover os sais. Devidamente lavadas, as lâminas foram imersas em solução alcalina de eletroforese (300 mM NaOH [Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, França], 1 mM Na₂-EDTA, pH>13) por 20 minutos no escuro objetivando-se a desnaturação da dupla fita da cadeia de DNA e logo em seguida iniciamos a eletroforese a 1,5 V/cm e a uma corrente inicial máxima de 220 mA. Finalizado o processo, as lâminas foram lavadas com TBE duas vezes em intervalos de 3 minutos e então fixadas primeiramente com álcool 70%

uma vez e após álcool 100% (LabSynth, São Paulo, Brasil) duas vezes em intervalos de 5 minutos. Para avaliar os espermatozoides, as lâminas foram coradas com Sybr® Green (SYBR® Green II RNA gel stain, 10.000 vezes em DMSO) diluído 1:10.000 em TBE durante 40 minutos. Logo após, foram lavadas com TBE com o objetivo de remover a coloração de fundo. Utilizando microscopia de epifluorescência (Olympus BX-51 – Olympus, Japão) com filtro de excitação de 490 nm e emissão de 520 nm em uma magnificação de 400 vezes em óleo de imersão, foram analisadas um total de 100 células, que foram classificadas em 4 classes de acordo com a fragmentação de DNA apresentada (Figura 1): **Classe I:** espermatozoide com DNA altamente íntegro (sem migração); **Classe II:** espermatozoide com baixa fragmentação do DNA (pouca migração); **Classe III:** espermatozoide com fragmentação do DNA aumentada (núcleo da célula pouco observado e evidente sinal de migração do DNA); **Classe IV:** espermatozoide com alta fragmentação do DNA (núcleo da célula não observado e intensa migração do DNA) (28).

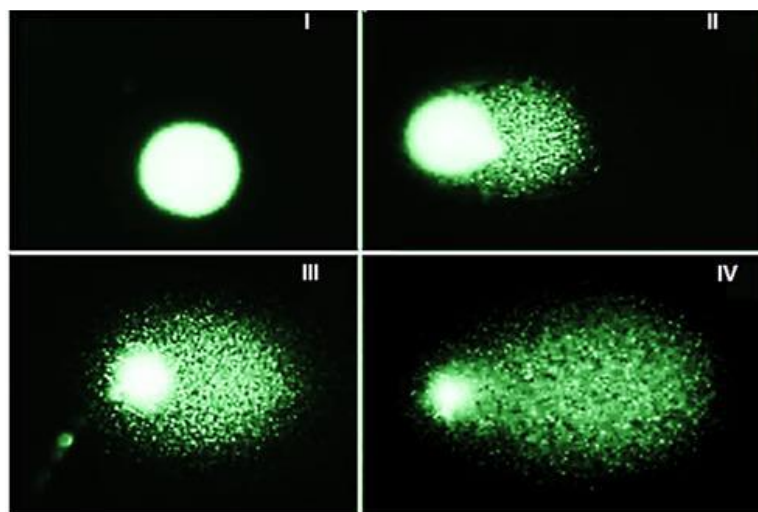


Figura 1 - Fragmentação do DNA dos espermatozoides realizada pelo Ensaio Cometa Alcalino. Classificação dos espermatozoides em classes de I a IV.

3.4.2 Análise da integridade do acrossoma do espermatozoide

Com o objetivo de avaliarmos a integridade do acrossoma dos espermatozoides, utilizamos a técnica PNA-FITC (*Peanut agglutinin* – isoticianato de fluoresceína) na qual a lecitina do amendoim junto ao fluorocromo se liga a

glicoproteínas da membrana acrossomal externa, indicando-nos sua integridade. Foram preparados dois esfregaços com 15 μL de sêmen em lâminas de microscopia (Precision Glass Line, China), os quais permaneceram em temperatura ambiente para secagem da amostra. Após, as lâminas foram fixadas em metanol 100% (Merck Millipore, Massachusetts, EUA) por 15 minutos e novamente deixadas à temperatura ambiente para secarem. Com as lâminas devidamente fixadas e secas, depositamos em cada uma 60 $\mu\text{g/mL}$ de solução de PNA (Life Technologies, Califórnia, EUA) em PBS (tampão de fosfato alcalino - 137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na_2HPO_4 , 1,8 mM KH_2PO_4) e as mantivemos no escuro por 30 minutos. Logo em seguida, as lâminas foram lavadas com água Milli-Q. Para analisar cada acrossoma, utilizamos microscópio de fluorescência com excitação de 494 nm e emissão de 512 nm (Olympus BX-51, Olympus, Japão). Foram avaliadas 200 células em magnificação de 1000 vezes com óleo de imersão e classificadas em acrossoma íntegro (acrossoma se apresenta coberto por uma homogênea fluorescência verde) e não íntegro (acrossoma possui falhas de coloração) (Figura 2) (29).

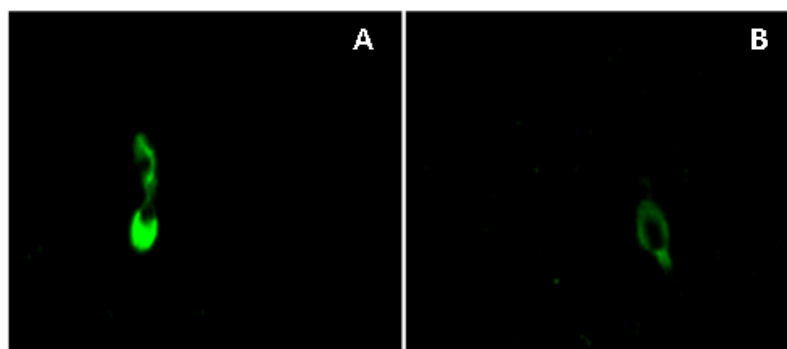


Figura 2 - Integridade do acrossoma realizada pela técnica de PNA-FITC. Classificado em acrossoma íntegro (A) e acrossoma não íntegro (B).

3.4.3 Análise da atividade mitocondrial do espermatozoide

A atividade mitocondrial dos espermatozoides foi analisada pelo método de coloração por 3,3' – diaminobenzidina (DAB) (Sigma-Aldrich, Sant Louis, EUA). Tal técnica baseia-se na oxidação do DAB pelo complexo do citocromo c, como a enzima citocromo c oxidase, e posterior polimerização e deposição do reagente na bainha mitocondrial localizada na peça intermediária do espermatozoide, gerando assim uma coloração castanha. O método se iniciou com a diluição de uma alíquota de sêmen

fresco em solução de DAB 1 mg/mL em PBS; a proporção da diluição amostra/DAB foi determinada pela concentração de espermatozoides variando entre 1:1 a 1:5. Tal solução foi então incubada por uma hora em banho-maria a 37°C no escuro. Ao fim do período de incubação, foram realizados dois esfregaços com 15 µL em lâminas de microscopia (Precision Glass Line, China). Após período de secagem natural das lâminas, foram fixadas com formaldeído (Carlo Erba Reagents, Val de Reuil, França) 10% (v:v) por 10 minutos e deixadas novamente à temperatura ambiente para secarem. Foram analisadas 200 células em microscópio de contraste de fase (PH3) (Olympus BX-51, Olympus, Japão) em magnificação de 1000 vezes com óleo de imersão. Cada espermatozoide foi classificado de acordo com a coloração de sua peça intermediária, de modo que quanto maior era a coloração, maior a atividade mitocondrial presente (Figura 3): **Classe I:** 100% da peça intermediária corada; **Classe II:** mais de 50% da peça intermediária corada; **Classe III:** menos de 50% da peça intermediária corada; **Classe IV:** ausência de coloração na peça intermediária (30).

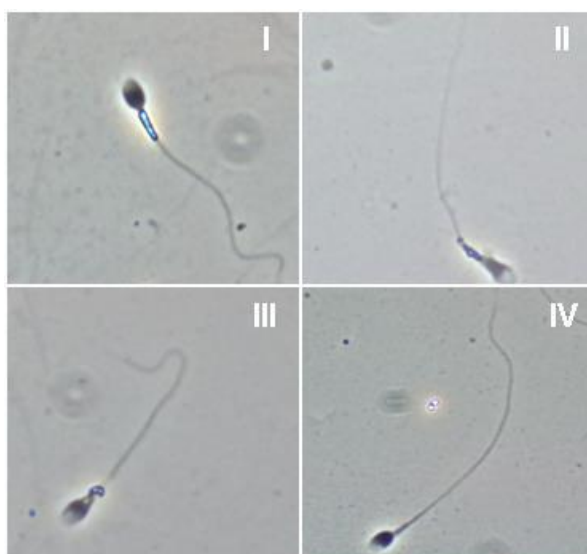


Figura 3 - Atividade mitocondrial dos espermatozoides realizada por coloração DAB. Classificação dos espermatozoides em classes de I a IV.

3.5 Análise Estatística

Para análise estatística deste estudo, foi utilizado o *software* SPSS / PASW 18.0. Com o objetivo de verificar a normalidade de todas as variáveis analisadas foi

aplicado o teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Para as variáveis que apresentaram distribuição normal, aplicou-se o teste paramétrico T de *Student* para amostras independentes ou pareadas, conforme apropriado; já para aquelas que não indicaram normalidade, o teste não paramétrico *Mann-Whitney* foi utilizado para amostras não pareadas e de *Wilcoxon* para amostras pareadas. Foi realizado teste de ANOVA medidas repetidas na avaliação seriada de análise seminal.

Os resultados foram considerados estatisticamente significantes quando o p se apresentou menor que 0,05 ($p < 0,05$), sendo apresentados em média, desvio padrão e intervalo de confiança para variáveis de distribuição normal e em média e desvio padrão para variáveis de distribuição não normal acrescentando os valores de ranqueamento positivo, negativo e empate em caso de significância estatística no teste de *Wilcoxon* (31).

Um total de 147 adolescentes foram avaliados clinicamente e com análise seminal durante os últimos 20 anos pelo nosso grupo de pesquisa, porém, devido a mudanças de contato no passar desse tempo, foi conseguido contato direto com 45 pacientes. Destes, 11 recusaram participar do estudo, 6 devido à falta de interesse e 5 devido à indisponibilidade pela carga horária de trabalho. Deste total, 6 pertenciam ao grupo não operado e 5 ao grupo operado. Ao fim, finalizaram a pesquisa um total de 34 pacientes, sendo 1 do grupo sem varicocele, 14 do grupo não operado e 19 do grupo operado. Devido ao baixo número de pacientes no grupo sem varicocele ou varicocele grau I, este foi excluído da análise do trabalho. Nenhum paciente avaliado preencheu critério para exclusão do estudo no grupo não operado e 4 pacientes avaliados no grupo operado (21%) apresentaram recidiva clínica e foram excluídos, totalizando ao final 29 pacientes analisados (Figura 4).

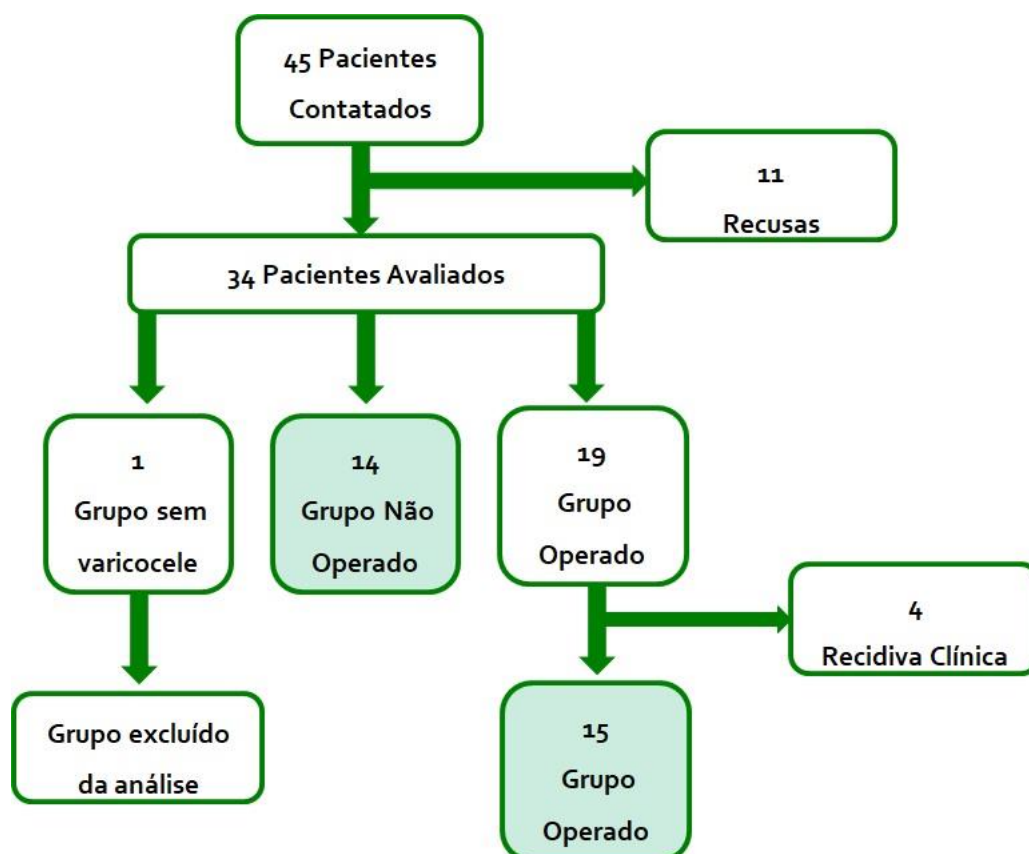


Figura 4 - Análise de Pacientes

Os pacientes foram inicialmente avaliados entre 2010-2016 e 2006-2013 respectivamente no grupo não operado e operado. A média de idade do grupo não operado foi de 15,8 anos (IC 95% [15,3 – 16,3]) na avaliação inicial e de 25,1 (IC 95% [23,9 – 26,3]) na avaliação atual, enquanto do grupo operado foi de 15,8 anos (IC 95%

[15,1 – 16,6]) na avaliação inicial e de 25,9 (IC 95% [24,10 – 27,76]) na avaliação atual, com média de 9,2 anos e 10,1 anos entre as avaliações respectivamente para cada grupo, sem diferença estatística entre os grupos utilizando teste de *Mann-Whitney* ($p = 0,572$).

No grupo operado, dos 15 pacientes avaliados, em 6 a indicação de tratamento foi devido à alteração seminal, enquanto em 9 por assimetria testicular. Na avaliação atual 4 pacientes do grupo operado haviam iniciado tentativa de paternidade, e todos alcançaram-na em menos de 6 meses de tentativas; no grupo não operado nenhum paciente avaliado havia iniciado tentativas de gestar.

4.1 Análise seminal do grupo não operado

Com intuito de avaliar a evolução do potencial fértil, foi feita análise de cada grupo comparando os dados da adolescência e atualmente. Na análise do grupo não operado, observamos uma queda na motilidade progressiva ($p = 0,009$), sem alterações significativas nos outros parâmetros (Tabela 1). Nenhum paciente encontra-se atualmente com alteração seminal de acordo com valores de referência do manual da OMS (26).

Tabela 1 – Análise seminal dos pacientes não operados, na adolescência e atualmente. Os dados foram comparados pelo teste de Wilcoxon.

	Adolescência (N = 14)	Atualmente (N = 14)	p
Volume (mL)			
Média; DP	2,9; 1,07	3,1; 1,27	0,379
Concentração (milhões/mL)			
Média; DP	78,7; 56,64	101,4; 51,51	0,064
Motilidade PR (%)			
Média; DP	60,4; 8,65	51,5; 7,93	0,009*
RP; RN; T	3,7; 8,5; 0		
Morfologia (%)			
Média; DP	7,5; 2,75	6,7; 2,30	0,194
TSM (milhões)			
Média; DP	136,4; 84,33	154,2; 89,52	0,221
TSMMN (milhões)			
Média; DP	11,3; 9,07	10,9; 7,31	0,638

N: número de indivíduos

DP: desvio padrão

RP: Ranqueamento Positivo; RN: Ranqueamento Negativo; T: Empates

TSM: total de espermatozoides móveis

TSMMN: total de espermatozoides móveis morfológicamente normais

*Diferença significativa ($p < 0,05$)

Não havia dados de avaliação funcional dos espermatozoides do grupo não operado durante a adolescência.

4.2 Análise do grupo operado

4.2.1 Análise seminal do grupo operado

Na análise do grupo operado, observamos um aumento do volume ($p = 0,011$), concentração ($p = 0,003$), TSM ($p = 0,003$) e TSMMN ($p = 0,004$) atualmente ao comparar com os dados durante a adolescência (Tabela 2). De forma categórica, todos os 6 pacientes que estavam com valores abaixo da referência encontram-se normozoospermicos atualmente de acordo com manual da OMS (26).

Tabela 2 - Análise seminal dos pacientes operados, na adolescência e atualmente. Os dados foram comparados pelo teste de Wilcoxon.

	Adolescência (N = 15)	Atualmente (N = 15)	p
Volume (mL)			
Média; DP	2,1; 0,86	2,7; 1,04	0,011*
RP; RN; T	12,2; 5,2; 0		
Concentração (milhões/mL)			
Média; DP	40,9; 39,48	88,3; 61,60	0,003*
RP; RN; T	11,3; 5,0; 0		
Motilidade PR (%)			
Média; DP	54,3; 11,13	51,7; 3,85	0,344
Morfologia (%)			
Média; DP	5,7; 2,81	6,0; 2,46	0,442
TSM (milhões)			
Média; DP	46,7; 55,61	128,7; 113,29	0,003*
RP; RN; T	12,1; 4,2; 0		
TSMMN (milhões)			
Média; DP	3,1; 4,27	9,6; 10,20	0,004*
RP; RN; T	10,4; 7,7; 0		

N: número de indivíduos

DP: desvio padrão

RP: Ranqueamento Positivo; RN: Ranqueamento Negativo; T: Empates

TSM: total de espermatozoides móveis

TSMMN: total de espermatozoides móveis morfolologicamente normais

*Diferença significativa ($p < 0,05$)

4.2.2 Avaliação seminal em 3 tempos do grupo operado

Dos 15 pacientes avaliados, 9 possuíam análise seminal a curto prazo, com uma média de 9 meses após varicocelectomia. Não houve diferença estatisticamente significativa ao comparar as variáveis seminais neste curto período, porém, houve uma melhora em concentração ao comparar a análise na adolescência e a longo prazo ($p = 0,039$) e ao comparar a análise em curto e a longo prazo ($p = 0,017$) (Tabela 3).

Tabela 3 – Análise seminal dos pacientes operados, na adolescência, pós-operatório curto prazo e atualmente. Os dados foram comparados pelo teste de ANOVA Medidas Repetidas.

	Adolescência (N = 9)	Curto prazo (N = 9)	Atualmente (N = 9)	p
Volume (mL)				
Média; DP	2,4; 0,31	2,8; 0,44	2,9; 0,39	
IC 95%	[1,65-3,08]	[1,74-3,78]	[2,00-3,80]	
Concentração (milhões/mL)				
Média; DP	44,3; 16,63	51,8; 15,72	85,4; 19,60	*0,320
IC 95%	[5,94-82,7]	[15,56-88,08]	[40,22-130,64]	**0,039 ***0,017
Motilidade PR (%)				
Média; DP	52,3; 3,24	49,4; 4,14	50,61; 1,46	
IC 95%	[44,82-59,74]	[39,85-58,93]	[47,23-53,99]	
Morfologia (%)				
Média; DP	4,6; 0,93	5,3; 0,77	5,5; 0,79	
IC 95%	[2,46-6,77]	[3,55-7,11]	[3,74-7,37]	
TSM (milhões)				
Média; DP	51,6; 23,06	71,7; 34,65	140,3; 44,54	
IC 95%	[-1,55-104,82]	[-8,15-151,65]	[37,64-243,05]	
TSMMN (milhões)				
Média; DP	3,1; 1,80	5,4; 3,25	10,2; 3,99	
IC 95%	[-1,02-7,29]	[-2,09-12,90]	[0,97-19,36]	

N: número de indivíduos

DP: desvio padrão

IC: intervalo de confiança de 95% da média

TSM: total de espermatozoides móveis

TSMMN: total de espermatozoides móveis morfolologicamente normais

*Ao comparar adolescência e curto prazo

**Ao comparar adolescência e longo prazo

***Ao comparar curto e longo prazo

4.2.3 Avaliação funcional dos espermatozoides do grupo operado

Ao avaliar as provas funcionais, poucos indivíduos desse grupo tinham essa avaliação na época da adolescência; dos 15 pacientes: 1 tinha avaliação da integridade do acrossoma espermático, 5 tinham análise da atividade mitocondrial dos espermatozoides e 6 tinham análise da integridade do DNA espermático. Devido ao baixo número de dados, não foi comparada a avaliação da integridade do acrossoma espermático. Observamos uma diminuição na porcentagem de espermatozoides com 100% de suas mitocôndrias ativas (DAB Classe I) ($p = 0,027$) (Tabela 4)

Tabela 4 - Análise de atividade mitocondrial dos espermatozoides de pacientes operados, na adolescência e atualmente. Os dados foram comparados pelo teste de Wilcoxon.

	Adolescência (N = 5)	Atualmente (N = 5)	p
DAB Classe I (%)			
Média; DP	11,8; 2,70	2,5; 1,54	0,027*
RP; RN; T		0; 3,5; 0	
DAB Classe II (%)			
Média; DP	61,9; 2,91	71,2; 9,51	0,249
DAB Classe III (%)			
Média; DP	18,2; 4,71	24,0; 8,25	0,345
DAB Classe IV (%)			
Média; DP	8,1; 2,59	2,3; 2,27	0,075

N: número de indivíduos

DP: desvio padrão

RP: Ranqueamento Positivo; RN: Ranqueamento Negativo; T: Empates

*Diferença significativa ($p < 0,05$)

Ao analisar a integridade do DNA espermático, houve uma diminuição do Cometa Classe I ($p = 0,028$) e IV ($p = 0,046$) e aumento do Cometa Classe II ($p = 0,018$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Análise de integridade do DNA espermático de pacientes operados, na adolescência e atualmente. Os dados foram comparados pelo teste de Wilcoxon.

	Adolescência (N = 6)	Atualmente (N = 6)	p
Cometa Classe I (%)			
Média; DP	41,8; 27,16	19,9; 11,03	0,028*
RP; RN; T	1,0; 4,5; 0		
Cometa Classe II (%)			
Média; DP	37,2; 20,31	67,6; 10,76	0,018*
RP; RN; T	4,0; 0; 0		
Cometa Classe III (%)			
Média; DP	14,5; 9,39	11,5; 9,22	0,933
Cometa Classe IV (%)			
Média; DP	6,5; 5,64	1,0; 3,28	0,046*
RP; RN; T	1,0; 4,0; 0		

N: número de indivíduos

DP: desvio padrão ;

RP: Ranqueamento Positivo; RN: Ranqueamento Negativo; T: Empates

*Diferença significativa ($p < 0,05$)

Com intuito de avaliar o significado clínico desses achados, realizamos a comparação entre a taxa de baixa atividade mitocondrial (DAB III + DAB IV / TOTAL) e taxa de alta fragmentação espermática (Cometa III + Cometa IV / TOTAL). Nesta comparação não houve diferença estatisticamente significativa para atividade mitocondrial ($p = 0,310$) ou fragmentação espermática ($p = 0,753$), tendo sido utilizado teste de Wilcoxon.

4.3 Análise entre grupos operados e não operados

Visando nosso objetivo geral, foi realizada análise entre os grupos nos diferentes momentos de avaliação.

4.3.1 Análise seminal entre os grupos

Na análise seminal atual, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos (Tabela 6).

Tabela 6 - Análise seminal atualmente entre os grupos. Os dados foram comparados pelo teste t de Student para amostras independentes.

	Não Operados (N = 14)	Operados (N = 15)	p
Volume (mL)			
Média; DP	3,1; 1,27	2,7; 1,05	0,444
IC 95%	[2,39-3,86]	[2,10-3,27]	
Concentração (milhões/mL)			
Média; DP	101,4; 51,51	88,3; 61,60	0,336
IC 95%	[71,65-131,14]	[54,18-122,41]	
Motilidade PR (%)			
Média; DP	51,5; 7,93	51,7; 3,86	0,759
IC 95%	[46,95-56,12]	[49,53-53,81]	
Vitalidade (%)			
Média; DP	82,7; 8,30	85,4; 4,67	0,584
IC 95%	[77,95-87,54]	[82,84-88,02]	
Morfologia (%)			
Média; DP	6,7; 2,30	6,0; 2,45	0,392
IC 95%	[5,38-8,05]	[4,60-7,32]	
TSM (milhões)			
Média; DP	154,2; 89,52	128,7; 113,29	0,190
IC 95%	[102,51-205,88]	[66,01-191,48]	
TSMMN (milhões)			
Média; DP	10,9; 7,31	9,6; 10,20	0,336
IC 95%	[6,69-15,13]	[3,95-15,25]	

N: número de indivíduos

DP: desvio padrão

IC: intervalo de confiança de 95% da média

TSM: total de espermatozoides móveis

TSMMN: total de espermatozoides móveis morfológicamente normais

Na análise seminal entre os grupos durante a adolescência, havia uma diminuição de volume ($p = 0,014$), concentração ($p = 0,008$), TSM ($p = 0,001$) e TSMMN ($p = 0,002$) no grupo operado ao ser comparado com o grupo não operado (Tabela 7).

Tabela 7 - Análise seminal na adolescência entre os grupos. Os dados foram comparados pelo teste t de Student para amostras independentes.

	Não Operados (N = 14)	Operados (N = 15)	p
Volume (mL) Média; DP	2,9; 1,07	2,1; 0,86	0,014*
IC 95%	[2,36-3,60]	[1,61-2,56]	
Concentração (milhões/mL) Média; DP	78,7; 56,64	40,9; 39,48	0,008*
IC 95%	[46,07-111,48]	[19,01-62,74]	
Motilidade PR (%) Média; DP	60,4; 8,65	54,4; 11,13	0,189
IC 95%	[55,46-65,46]	[48,20-60,53]	
Vitalidade (%) Média; DP	75,5; 12,70	75,85; 14,07	0,830
IC 95%	[62,16-88,83]	[62,84-88,87]	
Morfologia (%) Média; DP	7,5; 2,75	5,66; 2,81	0,096
IC 95%	[5,94-9,12]	[4,11-7,22]	
TSM (milhões) Média; DP	136,4; 84,33	46,7; 54,61	0,003*
IC 95%	[87,75-185,14]	[16,42-76,90]	
TSMMN (milhões) Média; DP	11,3; 9,07	3,1; 4,27	0,002*
IC 95%	[6,09-16,58]	[0,70-5,44]	

N: número de indivíduos

DP: desvio padrão

IC: intervalo de confiança de 95% da média

TSM: total de espermatozoides móveis

TSMMN: total de espermatozoides móveis morfológicamente normais

*Diferença significativa ($p < 0,05$)

4.3.2 Avaliação funcional dos espermatozoides entre os grupos

Na análise atual dessa avaliação entre os grupos, não observamos diferenças estatisticamente significativas (Tabela 8).

Tabela 8 – Análise de provas funcionais atualmente entre os grupos. Os dados foram comparados pelo teste t de Student para amostras independentes.

	Não Operados (N = 14)	Operados (N = 15)	p
Acrossoma íntegro (%)			
Média; DP	74,7; 8,54	76,2; 5,09	0,965
IC 95%	[69,78-79,64]	[73,35-78,99]	
DAB Classe I (%)			
Média; DP	1,7; 1,43	2,5; 1,54	0,148
IC 95%	[0,90-2,55]	[1,70-3,40]	
DAB Classe II (%)			
Média; DP	67,5; 10,15	71,2; 9,51	0,238
IC 95%	[61,67-73,39]	[65,97-76,50]	
DAB Classe III (%)			
Média; DP	25,5; 8,58	24,0; 8,25	0,600
IC 95%	[20,56-30,47]	[19,45-28,59]	
DAB Classe IV (%)			
Média; DP	5,2; 5,31	2,2; 2,27	0,182
IC 95%	[2,14-8,28]	[0,94-3,46]	
Cometa Classe I (%)			
Média; DP	16,9; 11,03	19,9; 9,19	0,419
IC 95%	[10,50-23,25]	[14,86-25,04]	
Cometa Classe II (%)			
Média; DP	67,3; 10,76	67,6; 8,96	0,965
IC 95%	[61,14-73,57]	[62,67-72,60]	
Cometa Classe III (%)			
Média; DP	13,3; 9,21	11,5; 3,54	0,710
IC 95%	[7,95-18,59]	[9,52-13,44]	
Cometa Classe IV (%)			
Média; DP	2,5; 3,28	0,9; 0,66	0,208
IC 95%	[0,60-4,40]	[0,57-1,30]	

N: número de indivíduos

DP: desvio padrão

IC: intervalo de confiança de 95% da média

Da mesma forma, realizamos a comparação entre a taxa de baixa atividade mitocondrial (DAB III + DAB IV / TOTAL) e taxa de alta fragmentação espermática (Cometa III + Cometa IV / TOTAL). Nesta comparação não houve diferença estatisticamente significativa para atividade mitocondrial ($p = 0,183$) ou fragmentação espermática ($p = 0,895$), tendo sido utilizado teste de Wilcoxon.

Durante a adolescência ocorre a ativação dos mecanismos neuro-hormonais do eixo hipotalâmico-hipofisário-adrenal-gonadal que levarão à completa maturação e capacidade de fecundação, através da proliferação do tecido testicular e início da espermatogênese (1). Neste período, a presença da varicocele pode afetar o crescimento testicular e levar a um declínio do potencial fértil desses homens (17).

A patogenia da varicocele está associada a diversas teorias (32,33). Inicialmente devido ao padrão anatômico da drenagem venosa associado à incompetência ou ausência de válvulas venosas inicia-se o processo de refluxo e estase sanguínea nas veias espermáticas internas (34,35,36). Esta alteração vascular favorece o aumento de espécies reativas de oxigênio, estando associadas ao aumento da fragmentação do DNA espermático com impacto negativo na espermatogênese (37); ao acúmulo de sangue na microcirculação local resultando em lesão celular isquêmica (38,39) e à hipertermia testicular que leva a alterações metabólicas com menor produção de enzimas associadas ao reparo celular tais como: topoisomerase I, DNA polimerase e *heat shock proteins* (40,41), podendo desfavorecer o desenvolvimento testicular desses adolescentes.

Dessa forma, a AUA e ASRM sugerem que mesmo que não haja indícios de dano tecidual, assimetria testicular ou alteração seminal, os adolescentes com varicocele mantenham um seguimento clínico anual visando identificar precocemente esses efeitos deletérios caso ocorram e, dessa forma, ofertar tratamento (20).

No cuidado aos adolescentes, não nos deparamos com quadros de infertilidade, mas sim de danos ao seu potencial fértil, cabendo ao médico propor medidas e tratamentos a fim de melhorar esse potencial e, dessa forma, preservar a fertilidade dessa população. O critério mais utilizado para avaliar a perda de potencial fértil neste cenário, e, portanto, a indicação de tratamento da varicocele, é a hipotrofia testicular (20, 27), porém, essa consequência clínica já pode demonstrar estado avançado de prejuízo da espermatogênese (42).

Outra forma de avaliar este potencial é através da análise seminal, porém, seu valor na avaliação do adolescente é duvidoso. A OMS atualiza periodicamente os valores de referência dessa análise através de estudos populacionais em pacientes adultos sabidamente férteis (27,43), o que não contempla os pacientes adolescentes e, dessa forma, não temos valores de referência para esta fase de desenvolvimento sexual, principalmente em caso de pacientes com Tanner \leq III. Além disso, pode haver

alguns entraves ético-culturais devido à necessidade de coleta por masturbação nessa população jovem.

Estudo prospectivo prévio demonstrou que adolescentes com varicocele graus II e III tiveram pior qualidade seminal quando comparados a adolescentes com varicocele grau I ou sem varicocele, mesmo que ainda dentro dos valores de referência (17). Uma metanálise realizada posteriormente manteve este achado para parâmetros específicos de concentração, motilidade e morfologia na análise seminal (18). Para além dos valores de referência podemos utilizar os dados numéricos do espermograma para predizer esse potencial fértil, assim o TSM e o TSMMN vêm se demonstrando como marcadores importantes com forte correlação com taxa de gravidez, seja natural ou por reprodução assistida (10,11,44,45).

Até o momento, existem poucos estudos de avaliação a longo prazo de adolescentes com varicocele, tratados ou não. Neste estudo pudemos observar que o grupo não operado, após 10 anos, apresentou queda de motilidade progressiva estatisticamente significativa na análise seminal. Esse grupo não tinha indicação cirúrgica no momento da avaliação inicial; eram adolescentes com varicocele, mas sem assimetria testicular ou alteração seminal; mesmo assim, foi observado esse efeito deletério. Cabe ressaltar que, apesar deste achado significativo, a média de motilidade progressiva se manteve dentro dos parâmetros de referência e não houve piora do TSM, sendo assim, este achado potencialmente não possui uma relevância clínica.

Existem diferentes técnicas para o tratamento da varicocele, sendo elas: embolização, laparoscópica retroperitoneal e abertas por via retroperitoneal, inguinal ou subinguinal com ou sem auxílio de magnificação com microscópio cirúrgico, sendo a mais indicada a varicocelectomia subinguinal microcirúrgica, ou técnica de Marmar, por possuir melhores desfechos e menores índices de complicações em adultos (46). Neste estudo todos os pacientes foram operados por esta técnica. Em adolescentes, uma metanálise demonstra que devem ser utilizados métodos poupadores de linfáticos para evitar hidrocele como complicação, porém, não traz evidências sobre melhor técnica a ser utilizada nessa população (25).

Da mesma forma que para diagnóstico, a resposta ao tratamento da varicocele em adolescentes pode ser avaliada de acordo com a melhora do tamanho testicular e/ou dos parâmetros seminais. Uma Metanálise demonstrou um incremento no

tamanho testicular de adolescentes após tratamento (21). Porém, alguns autores advogam que esse *catch-up* testicular possa ser devido a edema intersticial, sem ganho real de função testicular (47). O tratamento da varicocele em adolescentes tem demonstrado melhora nos parâmetros seminais e dos parâmetros de avaliação funcional espermática (22,23). Uma Metanálise também analisou melhora nos parâmetros seminais a curto prazo dos adolescentes após tratamento, principalmente em concentração e motilidade (18).

Neste estudo, no grupo operado houve melhora dos parâmetros seminais de volume, concentração, TSM e TSMMN na reavaliação após 10 anos de tratamento, apesar de não observados inicialmente na avaliação a curto prazo. Essa melhora pode ter acontecido de forma progressiva pois o tratamento foi instituído ainda na fase de desenvolvimento sexual desses pacientes, sendo que, todos os pacientes que possuíam valores fora dos valores de referência encontram-se normozoospermicos atualmente. Nas figuras abaixo podemos observar que o aumento significativo do TSM (Figura 5) e do TSMMN (Figura 6) trouxeram os valores do grupo operado a serem comparáveis aos do grupo não operado.

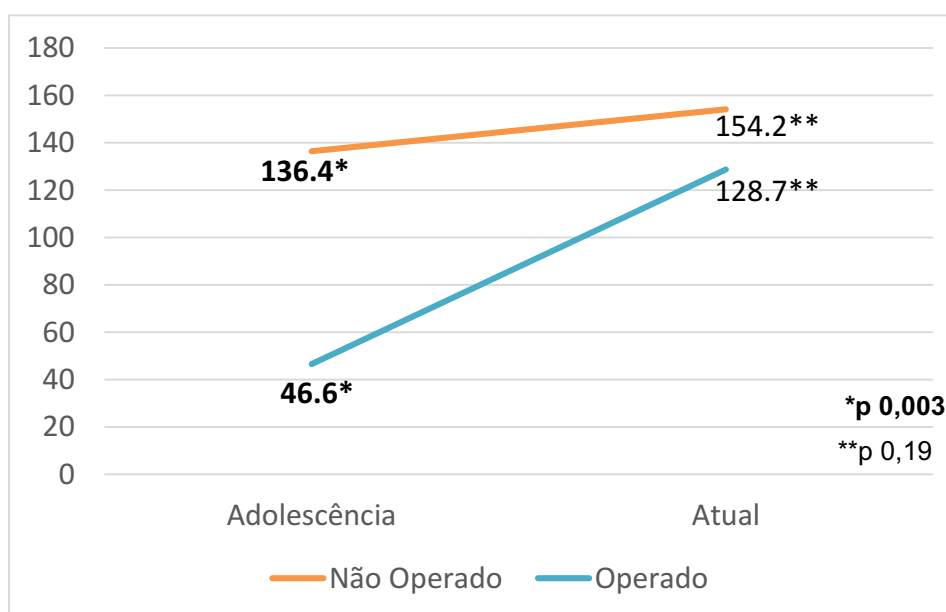


Figura 5 – Média do TSM entre grupos na adolescência e atualmente

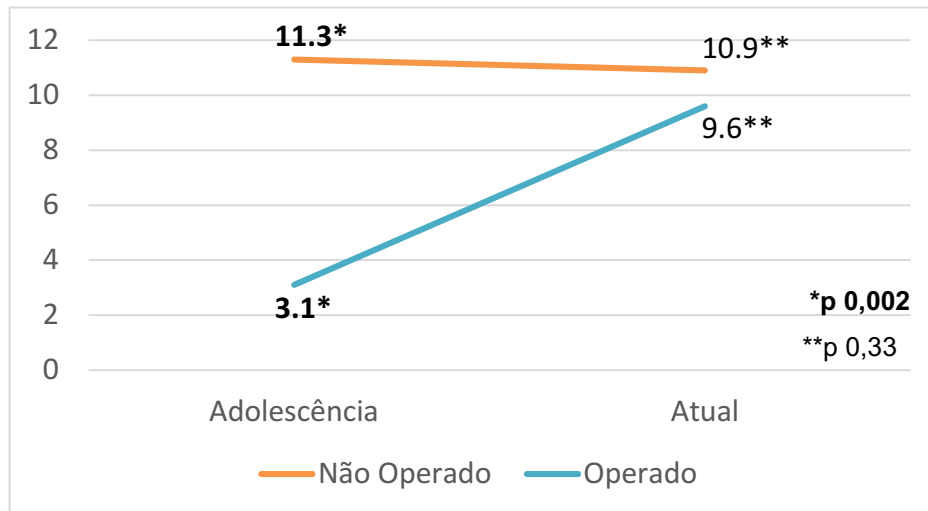


Figura 6 – Média do TSMMN entre grupos na adolescência e atualmente

As análises funcionais dos espermatozoides também auxiliam na avaliação do potencial fértil, com evidências da associação entre o aumento de fragmentação do DNA espermático e infertilidade, piores desfechos reprodutivos e abortamento habitual, porém, ainda tal teste não é recomendado na rotina clínica devido à baixa qualidade de evidência (13,15,16). Existem ao menos cinco diferentes métodos para essa avaliação e cada laboratório deve determinar e validar seus próprios valores de referência (43), o que aumenta a heterogeneidade e dificulta o ganho de evidência nos estudos.

Quanto à análise de atividade mitocondrial e atividade do acrossoma, estudos já demonstraram a associação da varicocele e piores resultados dessas análises funcionais, mesmo mantendo parâmetros seminais inalterados, potencialmente demonstrando um efeito deletério inicial que pode progressivamente piorar o potencial fértil desses homens (48).

As poucas diferenças observadas na análise das provas funcionais espermáticas do grupo operado não possuem uma significância clínica, tendo em vista a ausência de diferença nas taxas de baixa atividade mitocondrial e de alta fragmentação espermática, acrescidos do pequeno número de pacientes comparados, pois tivemos poucas amostras coletadas durante a adolescência para comparação atual e, também, possível viés associado a diferentes avaliadores no passado e agora. Na avaliação atual entre grupos não houve diferença estatisticamente significativa mantendo o achado de potencial fértil atual do grupo

operado semelhante ao grupo de adultos com varicocele, mas sem indicação cirúrgica na adolescência.

Um estudo retrospectivo com *follow-up* de 1 e 5 anos comparou grupos de adolescentes operados e não operados, em que todos tinham indicação de cirurgia: varicocele grau II ou III com alteração seminal e assimetria testicular, tendo sido demonstrada uma melhora da concentração, motilidade e integridade do DNA espermático no grupo operado (49).

Até o momento deste estudo, poucos pacientes iniciaram tentativas de gestação, impossibilitando análise de paternidade. Estudo realizado através de questionário para paternidade pós-tratamento ou observação de varicocele na adolescência não encontrou diferença estatisticamente significativa entre os grupos tratados e não tratados na adolescência. Apesar de concluir que o tratamento destes pacientes não alterou a taxa de paternidade futura, o estudo possui algumas limitações, como por exemplo: tratamento por embolização, desenho retrospectivo, 53% de resposta aos questionários e avaliação superficial a partir de questionários passíveis de erro de interpretação (50). Outros dois estudos encontraram boas taxas de paternidade no grupo operado; o primeiro, prospectivo, com acompanhamento de 9 a 11 anos, identificou 77% de taxa de paternidade ao comparar com 48% do grupo não operado (OR 3,63) (51); o segundo retrospectivo com acompanhamento de 5 anos observou 80% de paternidade no grupo operado comparado com 36% no grupo não operado (49).

Neste estudo, a taxa de recidiva clínica foi de 21% - 4 pacientes do total de 19 avaliados, não podendo afirmar se são casos de recidivas ou persistência, visto não possuímos dados da reavaliação clínica a curto prazo. Existe grande variação na literatura em poucos estudos com seguimento a longo prazo, com taxas variando de 0 a 31% de recidiva entre 6 a 36 meses; a maior parte dos estudos traz 1-2% recidiva, porém, com apenas até 12 meses de seguimento (52,53,54). Estudo com seguimento de 2 a 5 anos de adolescentes operados por técnica modificada de Ivanissevich (inguinal) demonstrou 14% de recidiva ou persistência (55).

Destaco como limitações desse estudo o baixo número de pacientes avaliados, principalmente devido a alguns complicadores como a baixa adesão dessa população a seguimentos de longo prazo, dificuldade de contatos telefônicos mantidos com o passar dos anos e necessidade de avaliação presencial e coleta seminal durante a

pandemia da COVID-19. Também reiteramos que, para uma análise ideal de comparação entre grupos, seria melhor um controle com adolescentes com indicação de varicocele e que não foram operados, assim, haveria maior determinação do papel do tratamento cirúrgico nessa população. São pontos fortes do trabalho o tratamento feito pela técnica de Marmar por uma mesma equipe, o seguimento a longo prazo e a reavaliação clínico-laboratorial de todos os pacientes em um mesmo serviço.

O tratamento da varicocele na adolescência impacta positivamente no potencial fértil, sendo observada uma melhora significativa e progressiva dos parâmetros seminais em pacientes operados após uma média de 10 anos de tratamento. Há indícios de piora na motilidade progressiva no grupo de adolescentes não operados, com duvidosa relevância clínica.

1. Tanner JM. Growth and maturation during adolescence. *Nutr Rev.* 1981 Feb;39(2):43-55. doi: 10.1111/j.1753-4887.1981.tb06734.x. PMID: 7010232
2. Young people's health--a challenge for society. Report of a WHO Study Group on young people and "Health for All by the Year 2000". *World Health Organ Tech Rep Ser.* 1986;731:1-117. PMID: 3085358.
3. Brasil. Ministério da Saúde. Estatuto da Criança e do Adolescente / Ministério da Saúde. – 3. ed. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2008. 96 p. – (Série E. Legislação de Saúde) ISBN 85-334-1058-1
4. Gat Y, Bachar GN, Zukerman Z, Belenky A, Gornish M. Varicocele: a bilateral disease. *Fertil Steril.* 2004 Feb;81(2):424-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2003.08.010. PMID: 14967384.
5. Belay RE, Huang GO, Shen JK, Ko EY. Diagnosis of clinical and subclinical varicocele: how has it evolved? *Asian J Androl.* 2016 Mar-Apr;18(2):182-5. doi: 10.4103/1008-682X.169991. PMID: 26780869; PMCID: PMC4770483.
6. Dubin L, Amelar RD. Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. *Fertil Steril.* 1970 Aug;21(8):606-9. doi: 10.1016/s0015-0282(16)37684-1. PMID: 5433164.
7. Steeno O, Knops J, Declerck L, Adimoelja A, van de Voorde H. Prevention of fertility disorders by detection and treatment of varicocele at school and college age. *Andrologia.* 1976;8(1):47-53. doi: 10.1111/j.1439-0272.1976.tb01645.x. PMID: 986121.
8. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. *World Health Organization. Fertil Steril.* 1992 Jun;57(6):1289-93. PMID: 1601152.
9. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2013 Jan;99(1):63. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.09.023. Epub 2012 Oct 22. PMID: 23095139.
10. Sigman M, Jarow JP. Ipsilateral testicular hypotrophy is associated with decreased sperm counts in infertile men with varicoceles. *J Urol.* 1997 Aug;158(2):605-7. PMID: 9224376.
11. Hamilton JA, Cissen M, Brandes M, Smeenk JM, de Bruin JP, Kremer JA, Nelen WL, Hamilton CJ. Total motile sperm count: a better indicator for the

- severity of male factor infertility than the WHO sperm classification system. *Hum Reprod.* 2015 May;30(5):1110-21. doi: 10.1093/humrep/dev058. Epub 2015 Mar 18. PMID: 25788568.
12. Borges E Jr. Total motile sperm count: a better way to rate the severity of male factor infertility? *JBRA Assist Reprod.* 2016 May 1;20(2):47-8. doi: 10.5935/1518-0557.20160012. PMID: 27244760.
 13. Lam MT, Li HWR, Wong CYG, Yeung WSB, Ho PC, Ng EHY. Women's age and total motile normal morphology sperm count predict fecundability: a prospective cohort study. *BMJ Sex Reprod Health.* 2020 Oct;46(4):279-286. doi: 10.1136/bmjsexrh-2020-200639. Epub 2020 Jul 27. PMID: 32718983.
 14. Farkouh A, Salvio G, Kuroda S, Saleh R, Vogiatzi P, Agarwal A. Sperm DNA integrity and male infertility: a narrative review and guide for the reproductive physicians. *Transl Androl Urol.* 2022 Jul;11(7):1023-1044. doi: 10.21037/tau-22-149. PMID: 35958895; PMCID: PMC9360512.
 15. Panner Selvam MK, Ambar RF, Agarwal A, Henkel R. Etiologies of sperm DNA damage and its impact on male infertility. *Andrologia.* 2021 Feb;53(1):e13706. doi: 10.1111/and.13706. Epub 2020 Jun 19. PMID: 32559347.
 16. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. The clinical utility of sperm DNA integrity testing: a guideline. *Fertil Steril.* 2013 Mar 1;99(3):673-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.12.049. Epub 2013 Feb 1. Erratum in: *Fertil Steril.* 2014 Mar;101(3):884. PMID: 23391408.
 17. Mori MM, Bertolla RP, Fraietta R, Ortiz V, Cedenho AP. Does varicocele grade determine extent of alteration to spermatogenesis in adolescents? *Fertil Steril.* 2008 Nov;90(5):1769-73. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.09.052. Epub 2007 Dec 31. PMID: 18166185.
 18. Nork JJ, Berger JH, Crain DS, Christman MS. Youth varicocele and varicocele treatment: a meta-analysis of semen outcomes. *Fertil Steril.* 2014 Aug;102(2):381-387.e6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.04.049. Epub 2014 Jun 4. PMID: 24907913.
 19. Male Infertility Best Practice Policy Committee of the American Urological Association; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Report on optimal evaluation of the infertile male. *Fertil Steril.* 2006

- Nov;86(5 Suppl 1):S202-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2006.08.029. PMID: 17055823.
20. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine; Society for Male Reproduction and Urology. Report on varicocele and infertility: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2014 Dec;102(6):1556-60. doi: 10.1016/j.fertnstert.2014.10.007. Epub 2014 Nov 25. PMID: 25458620.
21. Li F, Chiba K, Yamaguchi K, Okada K, Matsushita K, Ando M, Yue H, Fujisawa M. Effect of varicocelectomy on testicular volume in children and adolescents: a meta-analysis. *Urology*. 2012 Jun;79(6):1340-5. doi: 10.1016/j.urology.2012.02.022. Epub 2012 Apr 17. PMID: 22516359.
22. Agarwal A, Deepinder F, Cocuzza M, Agarwal R, Short RA, Sabanegh E, Marmar JL. Efficacy of varicocelectomy in improving semen parameters: new meta-analytical approach. *Urology*. 2007 Sep;70(3):532-8. doi: 10.1016/j.urology.2007.04.011. PMID: 17905111.
23. Lacerda JI, Del Giudice PT, da Silva BF, Nichi M, Fariello RM, Fraietta R, Restelli AE, Blumer CG, Bertolla RP, Cedenho AP. Adolescent varicocele: improved sperm function after varicocelectomy. *Fertil Steril*. 2011 Mar 1;95(3):994-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2010.10.031. Epub 2010 Nov 12. PMID: 21074153.
24. Locke JA, Noparast M, Afshar K. Treatment of varicocele in children and adolescents: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *J Pediatr Urol*. 2017 Oct;13(5):437-445. doi: 10.1016/j.jpuro.2017.07.008. Epub 2017 Aug 9. PMID: 28851509.
25. Silay MS, Hoen L, Quadackaers J, Undre S, Bogaert G, Dogan HS, Kocvara R, Nijman RJM, Radmayr C, Tekgul S, Stein R. Treatment of Varicocele in Children and Adolescents: A Systematic Review and Meta-analysis from the European Association of Urology/European Society for Paediatric Urology Guidelines Panel. *Eur Urol*. 2019 Mar;75(3):448-461. doi: 10.1016/j.eururo.2018.09.042. Epub 2018 Oct 10. PMID: 30316583.
26. (n1) Lund L, Roebuck DJ, Lee KH, Sørensen HT, Yeung CK. Clinical assessment after varicocelectomy. *Scand J Urol Nephrol*. 2000 Apr;34(2):119-22. doi: 10.1080/003655900750016733. PMID: 10903073.

-
27. World Health Organization. (2010). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th ed. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/44261>
 28. Bertolla RP, Cedenho AP, Hassun Filho PA, Lima SB, Ortiz V, Srougi M. Sperm nuclear DNA fragmentation in adolescents with varicocele. *Fertil Steril*. 2006 Mar;85(3):625-8. doi: 10.1016/j.fertnstert.2005.08.032. PMID: 16500329.
 29. Blumer CG, Restelli AE, Giudice PT, Soler TB, Fraietta R, Nichi M, Bertolla RP, Cedenho AP. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. *BJU Int*. 2012 Jan;109(2):259-65. doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10240.x. Epub 2011 May 18. PMID: 21592296.
 30. Blumer CG, Fariello RM, Restelli AE, Spaine DM, Bertolla RP, Cedenho AP. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. *Fertil Steril*. 2008 Nov;90(5):1716-22. doi: 10.1016/j.fertnstert.2007.09.007. Epub 2007 Dec 26. PMID: 18155699.
 31. DePuy, V., Berger, V.W. and Zhou, Y. (2014). Wilcoxon-Mann-Whitney Test: Overview. In *Wiley StatsRef: Statistics Reference Online* (eds N. Balakrishnan, T. Colton, B. Everitt, W. Piegorisch, F. Ruggeri and J.L. Teugels). <https://doi.org/10.1002/9781118445112.stat06547>.
 32. Miyaoka R, Esteves SC. A critical appraisal on the role of varicocele in male infertility. *Adv Urol*. 2012;2012:597495. doi: 10.1155/2012/597495. Epub 2011 Nov 28. PMID: 22162682; PMCID: PMC3228353.
 33. Clavijo RI, Carrasquillo R, Ramasamy R. Varicoceles: prevalence and pathogenesis in adult men. *Fertil Steril*. 2017 Sep;108(3):364-369. doi: 10.1016/j.fertnstert.2017.06.036. PMID: 28865534.
 34. Asala S, Chaudhary SC, Masumbuko-Kahamba N, Bidmos M. Anatomical variations in the human testicular blood vessels. *Ann Anat*. 2001 Nov;183(6):545-9. doi: 10.1016/S0940-9602(01)80064-9. PMID: 11766526.
 35. Dennison AR, Tibbs DJ. Varicocele and varicose veins compared. A basis for logical surgery. *Urology*. 1986 Sep;28(3):211-7. doi: 10.1016/0090-4295(86)90045-2. PMID: 2944270.

-
36. Vanlangenhove P, Dhondt E, Van Maele G, Van Waesberghe S, Delanghe E, Defreyne L. Internal Spermatic Vein Insufficiency in Varicoceles: A Different Entity in Adults and Adolescents? *AJR Am J Roentgenol*. 2015 Sep;205(3):667-75. doi: 10.2214/AJR.14.14085. PMID: 26295656.
 37. Lopes S, Jurisicova A, Sun JG, Casper RF. Reactive oxygen species: potential cause for DNA fragmentation in human spermatozoa. *Hum Reprod*. 1998 Apr;13(4):896-900. doi: 10.1093/humrep/13.4.896. PMID: 9619544.
 38. Gat Y, Zukerman Z, Chakraborty J, Gornish M. Varicocele, hypoxia and male infertility. Fluid Mechanics analysis of the impaired testicular venous drainage system. *Hum Reprod*. 2005 Sep;20(9):2614-9. doi: 10.1093/humrep/dei089. Epub 2005 Jun 2. PMID: 15932914.
 39. Chakraborty J, Hikim AP, Jhunjhunwala JS. Stagnation of blood in the microcirculatory vessels in the testes of men with varicocele. *J Androl*. 1985 Mar-Apr;6(2):117-26. doi: 10.1002/j.1939-4640.1985.tb00826.x. PMID: 3988623.
 40. Hosseinifar H, Gourabi H, Salekdeh GH, Alikhani M, Mirshahvaladi S, Sabbaghian M, Modarresi T, Gilani MA. Study of sperm protein profile in men with and without varicocele using two-dimensional gel electrophoresis. *Urology*. 2013 Feb;81(2):293-300. doi: 10.1016/j.urology.2012.06.027. PMID: 23374786.
 41. Fujisawa M, Yoshida S, Kojima K, Kamidono S. Biochemical changes in testicular varicocele. *Arch Androl*. 1989;22(2):149-59. doi: 10.3109/01485018908986765. PMID: 2665680.
 42. Zylbersztejn DS, Andreoni C, Del Giudice PT, Spaine DM, Borsari L, Souza GHMF, Bertolla RP, Fraietta R. Proteomic analysis of seminal plasma in adolescents with and without varicocele. *Fertil Steril*. 2013 Jan;99(1):92-98. doi: 10.1016/j.fertnstert.2012.08.048. Epub 2012 Oct 1. PMID: 23036805.
 43. World Health Organization. (2021). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 6th ed. World Health Organization. <https://apps.who.int/iris/handle/10665/343208>. Licença: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
 44. Nikbakht R, Saharkhiz N. The influence of sperm morphology, total motile sperm count of semen and the number of motile sperm inseminated in sperm

- samples on the success of intrauterine insemination. *Int J Fertil Steril*. 2011 Oct;5(3):168-73. Epub 2011 Dec 22. PMID: 25101161; PMCID: PMC4122832.
45. Borges E Jr, Setti AS, Braga DP, Figueira RC, Iaconelli A Jr. Total motile sperm count has a superior predictive value over the WHO 2010 cut-off values for the outcomes of intracytoplasmic sperm injection cycles. *Andrology*. 2016 Sep;4(5):880-6. doi: 10.1111/andr.12199. Epub 2016 May 6. PMID: 27152971.
46. Blumer CG, Restelli AE, Giudice PT, Soler TB, Fraietta R, Nichi M, Bertolla RP, Cedenho AP. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. *BJU Int*. 2012 Jan;109(2):259-65. doi: 10.1111/j.1464-410X.2011.10240.x. Epub 2011 May 18. PMID: 21592296.
47. Baazeem A, Belzile E, Ciampi A, Dohle G, Jarvi K, Salonia A, Weidner W, Zini A. Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. *Eur Urol*. 2011 Oct;60(4):796-808. doi: 10.1016/j.eururo.2011.06.018. Epub 2011 Jul 5. PMID: 21733620.
48. Kocvara R, Dolezal J, Hampl R, Povýsil C, Dvoráček J, Hill M, Díte Z, Stanek Z, Novák K. Division of lymphatic vessels at varicocelectomy leads to testicular oedema and decline in testicular function according to the LH-RH analogue stimulation test. *Eur Urol*. 2003 Apr;43(4):430-5. doi: 10.1016/s0302-2838(03)00051-4. PMID: 12667726.
49. Patil N, Javali T. Varicocelectomy in adolescents - Does it safeguard future fertility? A single centre experience. *J Pediatr Urol*. 2022 Feb;18(1):5.e1-5.e10. doi: 10.1016/j.jpuro.2021.11.020. Epub 2021 Dec 5. PMID: 34980555.
50. Bogaert G, Orye C, De Win G. Pubertal screening and treatment for varicocele do not improve chance of paternity as adult. *J Urol*. 2013 Jun;189(6):2298-303. doi: 10.1016/j.juro.2012.12.030. Epub 2012 Dec 20. PMID: 23261480.
51. Çayan S, Şahin S, Akbay E. Paternity Rates and Time to Conception in Adolescents with Varicocele Undergoing Microsurgical Varicocele Repair vs Observation Only: A Single Institution Experience with 408 Patients. *J Urol*. 2017 Jul;198(1):195-201. doi: 10.1016/j.juro.2017.01.066. Epub 2017 Jan 31. PMID: 28153511.

-
52. Paduch DA, Niedzielski J. Repair versus observation in adolescent varicocele: a prospective study. *J Urol*. 1997 Sep;158(3 Pt 2):1128-32. doi: 10.1097/00005392-199709000-00111. PMID: 9258155.
53. Mohseni MJ, Nazari H, Amini E, Javan-Farazmand N, Baghayee A, Farzi H, Kajbafzadeh AM. Shunt-type and stop-type varicocele in adolescents: prognostic value of these two different hemodynamic patterns. *Fertil Steril*. 2011 Nov;96(5):1091-6. doi: 10.1016/j.fertnstert.2011.08.024. Epub 2011 Sep 15. PMID: 21924715.
54. Shiraishi K, Oka S, Matsuyama H. Surgical comparison of subinguinal and high inguinal microsurgical varicocelectomy for adolescent varicocele. *Int J Urol*. 2016 Apr;23(4):338-42. doi: 10.1111/iju.13050. Epub 2016 Jan 20. PMID: 26790833.
55. Misseri R, Gershbein AB, Horowitz M, Glassberg KI. The adolescent varicocele. II: the incidence of hydrocele and delayed recurrent varicocele after varicocelectomy in a long-term follow-up. *BJU Int*. 2001 Apr;87(6):494-8. doi: 10.1046/j.1464-410x.2001.00110.x. PMID: 1129804

ANEXO 1 – Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: VARICOCELE NA ADOLESCENCIA: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS A LONGO PRAZO

EM PACIENTES TRATADOS E NÃO TRATADOS

Pesquisador: MATHEUS FERREIRA GRONER

Área Temática: Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas):
(Reprodução Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 94100818.6.0000.5505

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.009.882

Apresentação do Projeto:

Projeto CEP/UNIFESP n: 0840/2018 (PARECER FINAL)

Enquanto o objetivo do tratamento no adulto é reestabelecer a fertilidade, no adolescente o objetivo é preservá-la. Um melhor entendimento da história natural da varicocele e sua relação com a função testicular, análise seminal e fertilidade facilitaria o manejo destes pacientes. O Objetivo deste projeto é Avaliar a fertilidade, a longo prazo, de pacientes com diagnóstico de varicocele na adolescência tratados e não tratados.

-HIPÓTESE: A manutenção de varicocele clínica desde a adolescência, ou o seu tratamento, impactam no potencial fértil e na paternidade futura? - Pacientes com varicocele não tratados pioraram seus parâmetros seminais - Pacientes com varicocele tratados melhoraram seus parâmetros seminais - Pacientes com varicocele tratados possuem parâmetros seminais melhores que os pacientes com varicocele não tratados Pacientes com varicocele tratados possuem melhora índice de paternidade do que os pacientes com varicocele não tratados.

Objetivo da Pesquisa:

- OBJETIVO PRIMÁRIO: Avaliar a fertilidade, a longo prazo, de pacientes com diagnóstico de varicocele na adolescência tratados e não tratados.

- OBJETIVO SECUNDÁRIO: Avaliar se há piora progressiva dos parâmetros seminais em pacientes com varicocele na adolescência, não tratados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em relação aos riscos e benefícios, o pesquisador declara:

-RISCOS: Constrangimento de coleta de sêmen por masturbação em laboratório específico.

-BENEFÍCIOS: Avaliar fertilidade masculina dos pacientes

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de projeto de mestrado de MATHEUS FERREIRA GRONER. Orientador: Prof. Dr. Renato Fraietta. Projeto vinculado ao Departamento de Cirurgia, Campus São Paulo, Escola Paulista de Medicina, UNIFESP.

TIPO DE ESTUDO: Elaboração de um estudo de coorte retrospectivo através da avaliação clínica, análise seminal e avaliação funcional espermática atual de pacientes previamente diagnosticados com varicocele quando adolescentes, tratados e não tratados na época.

LOCAL: Setor Integrado de Reprodução Humana do Hospital São Paulo;

PARTICIPANTES: participarão 400 pacientes. A amostra será composta por conveniência e serão elegíveis a participarem do estudo os pacientes avaliados previamente por este serviço, assim categorizados:

- Grupo I: Pacientes sem varicocele e com varicocele Grau I avaliados com 14 a 18 anos nos anos de 2001-2003 – 260 pacientes;
- Grupo II: Pacientes com varicocele Grau II e Grau III avaliados com 14 a 18 anos nos anos de 2001-2003 – 100 pacientes;
- Grupo III: Pacientes com varicocele Grau II e Grau III avaliados e submetidos a varicocelectomia microcirúrgica com 14 a 19 anos de 2006-2013 – 57 pacientes;

PROCEDIMENTOS:

-Os pacientes serão convocados, por contato postal e/ou telefônico, e os que aceitarem participar do projeto, serão avaliados no Setor Integrado de Reprodução Humana; 1-Coleta de dados:

a)-Avaliação Clínica: Consulta ambulatorial com levantamento de variáveis que possam influenciar na fertilidade e avaliação clínica da varicocele graduando-a de I a III, aferição de tamanho testicular com orquidômetro de Prader e avaliação de assimetria.

b)-Variáveis clínicas: Ocupação, Criptorquidia, Torção testicular, Orquite viral, Tabagismo, Etilismo, Drogas, Medicamentos, Anabolizantes, Cirurgias prévias, Obesidade (IMC).

c)-Análise seminal: Coleta de 2 amostras seminais, através de masturbação, com 3 a 5 dias de abstinência.

A análise será feita de acordo com critérios da Organização Mundial de Saúde.

d)- Avaliação de Provas funcionais: - Integridade de DNA; Atividade Mitocondrial; Integridade de Acrossoma; 2- Será feita a comparação dos dados avaliados dos grupos nos diferentes momentos (adolescência e vida adulta) assim como entre grupos com varicocele clínica tratados e não tratados, afim de avaliar o papel da doença e de seu tratamento na evolução do potencial fértil destes pacientes. (mais informações, ver projeto detalhado).

-DESFECHO PRIMÁRIO: Piora da fertilidade em pacientes com varicocele não tratados na adolescência (Grupo 2) em comparação aos tratados (Grupo 3).

-DESFECHO SECUNDÁRIO: Piora dos parâmetros seminais em pacientes não operados durante adolescência (Grupo 2) Melhor parâmetros seminais do grupo dos operados (Grupo 3) em comparação com os com varicocele não operados (Grupo 2).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

1- Foram apresentados os principais documentos: folha de rosto; projeto completo; cópia do cadastro CEP/UNIFESP, orçamento financeiro e cronograma apresentados adequadamente.

2-TCLE a ser aplicado aos participantes

3- outros documentos importantes anexados na Plataforma Brasil:

a)- autorização da coep (Pasta: outros- Submissão 2; Documento: CoEP_Aceite.jpg)

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Respostas as pendências do parecer nº 2908205 de 23 de setembro de 2018. As novas pendências apontadas por este relator quanto ao TCLE na versão anterior foram todas atendidas.

PROJETO APROVADO.

2-Em relação ao TCLE:

a)- No item 12 – Despesas e compensações:

o pesquisador informa no TCLE que “não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames, procedimentos, consultas e hospitalização cobertas pelo sistema único de saúde. Não haverá compensação financeira relacionada à sua participação neste estudo”. É regra que o SUS não deve ser onerado com a realização de pesquisas, favor adequar a redação. Ainda, o participante não deverá ter despesas com transporte, alimentação, nem qualquer outro custo por participar da pesquisa, e isto deve estar claro no TCLE.

RESPOSTA: Adequado e Redigido da seguinte forma:

12 – Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Não haverá compensação financeira relacionada à sua participação neste estudo.

e)- no TCLE está redigido: “Em caso de dano pessoal, você tem direito a tratamento médico na UNIFESP – Hospital São Paulo, bem como às indenizações legalmente estabelecidas. Não haverá compensação de nossa parte por perda de dia de trabalho, desconto de salário ou perdas indiretas por eventuais danos causados por esta pesquisa”. Novamente, no caso de qualquer dano causado pela pesquisa que gere perdas indiretas (dia de trabalho, desconto de salário ou perdas indiretas) ao participante, este deverá ser ressarcido. Favor adequar.

RESPOSTA: Alterado item 13 e excluído: “Não haverá compensação de nossa parte por perda de dia de trabalho, desconto de salário ou perdas indiretas por eventuais danos causados por esta pesquisa.”

Considerações Finais a critério do CEP:

O CEP informa que a partir desta data de aprovação, é necessário o envio de relatórios parciais (semestralmente), e o relatório final, quando do término do estudo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	11/10/2018		Aceito

Página 04 de

Básicas do Projeto	ETO_1077973.pdf	14:32:36		Aceito
Outros	Respondendo_pendencias_ao_CEP2.doc	11/10/2018 14:31:43	MATHEUS FERREIRA	Aceito

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_v3.doc	11/10/2018 14:31:16	MATHEUS FERREIRA GRONER	Aceito
Outros	CoEP_Aceite.jpg	19/07/2018 12:57:22	MATHEUS FERREIRA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.docx	28/06/2018 18:42:47	MATHEUS FERREIRA GRONER	Aceito
Folha de Rosto	Groner.pdf	28/06/2018 18:34:47	MATHEUS FERREIRA	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 08 de Novembro de 2018

**Assinado por:
Miguel Roberto Jorge
(Coordenador(a))**

ANEXO 2 – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Termo de Consentimento livre e Esclarecido

1 – Título do projeto: **VARICOCELE NA ADOLESCÊNCIA: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS A LONGO PRAZO EM PACIENTES TRATADOS E NÃO TRATADOS**

2 – **Informações Iniciais:** Para que um indivíduo possa participar de uma pesquisa envolvendo novos procedimentos, este deve dar o seu consentimento livre e esclarecido de tal participação. Esse consentimento deve se basear na compreensão da natureza e do risco do tratamento, aparelho ou procedimento. É responsabilidade do coordenador da pesquisa fornecer ao indivíduo que fará parte da pesquisa as informações necessárias para esta compreensão.

Essas informações estão sendo fornecidas a você para sua participação neste estudo, que tem como objetivo avaliar a fertilidade, a longo prazo, de pacientes com diagnóstico de varicocele na adolescência tratados e não tratados.

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. A sua recusa em participar não prejudicará o seu tratamento futuro ou os benefícios oferecidos pela Instituição. Você é livre para deixar de participar deste estudo a qualquer momento, sem que haja qualquer penalidade ou prejuízo no tratamento médico. Assim, pedimos por meio deste o seu consentimento para participação neste estudo.

3 – **Quem pode participar do estudo?** Serão incluídos no estudo pacientes que já foram avaliados no Setor Integrado de Reprodução Humana, vinculado à Disciplina de Urologia, da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), durante a adolescência para investigação de varicocele.

4 – **Procedimentos que serão realizados:** Será realizada avaliação clínica destes pacientes com o intuito de identificar fatores de agravo a fertilidade, assim como avaliar desejo e sucesso em conceber. Será também solicitado a coleta de sêmen, para realização do espermograma e análises funcionais dos espermatozoides.

5 – Relação dos **procedimentos rotineiros** e como são realizados:

Será realizada a avaliação clínica através de atendimento médico no Setor Integrado de Reprodução Humana previamente agendada, realizada pelo próprio pesquisador. Durante a avaliação será feita coleta da história clínica e realização de exame físico genital.

A coleta de sêmen será feita pelo próprio participante, por masturbação, após um período de 2 a 5 dias de abstinência ejaculatória, em área anexa ao Laboratório de Andrologia do Setor de Reprodução Humana da UNIFESP. Em seguida, será feito o espermograma e a avaliação funcional dos espermatozoides de cada amostra.

6 – **Desconfortos e riscos esperados:** A coleta de sêmen deve ser realizada por masturbação em um recipiente plástico estéril. Este procedimento não oferece nenhum risco, mas pode causar certo desconforto, uma vez que a coleta de sêmen na sala anexa ao Laboratório de Andrologia pode ser constrangedora. Sua participação será inteiramente voluntária. Não existe risco de que a amostra de sêmen que você irá produzir possa gerar filhos. A amostra será utilizada somente para análise em laboratório.

7 – **Benefícios:** Se durante sua avaliação for encontrado alguma necessidade de tratamento clínico ou cirúrgico, o mesmo será oferecido neste setor de acordo com as normas estabelecidas pelo Serviço Único de Saúde - SUS. Se não condizentes com a especialidade da urologia, serão encaminhados para serviço apropriado por vias convencionais de encaminhamento SUS.

8 – **Procedimentos alternativos:**

Não há procedimentos alternativos.

9 – **Garantia de acesso:** em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os pesquisadores principais são **Matheus Ferreira Gröner** e **Dr. Renato Fraietta**, que podem ser encontrados no endereço **Rua Botucatu, 725**, pelo telefone **5576-4488** ou e-mail **drmgroner@gmail.com**. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Prof. Francisco de Castro, n: 55, - 04020-050, Tel: 5571-1062, FAX: 5539-7162 – E-mail: **CEP@unifesp.edu.br**

10 – É garantida a **liberdade da retirada de consentimento** a qualquer momento e a desistência de participação do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

11 – **Direito de confidencialidade** – As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as de outros voluntários, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

12 – **Despesas e compensações:** não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo. Não haverá compensação financeira relacionada à sua participação neste estudo.

13 – Em caso de **dano pessoal**, você tem direito a tratamento médico na UNIFESP – Hospital São Paulo, bem como às indenizações legalmente estabelecidas.

14 – **Compromisso do pesquisador:** O pesquisador Matheus Ferreira Gröner se compromete a utilizar os dados e o material coletado somente para pesquisa.

15 – Será disponibilizado este termo em 2 vias originais, uma destinada ao participante e outra ao pesquisador

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “VARICOCELE NA ADOLESCÊNCIA: AVALIAÇÃO DOS EFEITOS A LONGO PRAZO EM PACIENTES TRATADOS E NÃO TRATADOS”. Eu discuti com o mestrando Matheus Ferreira Gröner ou com o Dr. Renato Fraietta sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Nome do paciente/representante legal*	Assinatura do paciente/representante legal*
Nome do pesquisador	Assinatura do pesquisador

* Para casos de voluntários menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

Assinatura da testemunha

-----/----/----
Data

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Assinatura do responsável pelo estudo

-----/----/----
Data

ANEXO 3 – Ficha de Avaliação

Nome: _____ RH: _____

Idade: _____ Data do exame: ___ / ___ / ___ e-mail: _____

Telefones: _____ ID: _____ Grupo: _____

1. AVALIAÇÃO MASCULINA

- Varicocele: Não Sim (Técnica: _____ Data: _____)
- Doença: Não Sim (Tipo: _____)
- Q Agudo/Febre – 3mes Não Sim (Tipo: _____)
- DST: Não Sim (Especifique: _____)
- Orquiepididimite: Não Sim (Especifique: _____)
- Caxumba Não Sim (Idade: _____ Orquite: Não Sim – E/D/Bil _____)
- Lesão Testicular: Não Sim (Trauma/Torção: _____)
- Criptorquia: Não Sim (Tratamento: Não Sim Qual idade: _____)
- Outra Cirurgia: Não Sim (Especifique: _____)
- Tabagismo: Não Ex-fumante (há: _____) Sim (maço/dia: _____ Anos: _____)
- Fatores Ambientais: Não Sim (Especifique: _____)
- Uso de Medicamentos: Não Sim (Especifique: _____)
- Etilismo: Não Sim (Especifique: _____)
- Drogas de Abuso: Não Sim (Especifique: _____)
- Anabolizante: Não Sim (Especifique: _____)
- Alt no Desejo Sexual: Não Inadequada (Especifique: _____)
- Alt no Ereção: Não Inadequada (Especifique: _____)
- Alt na Ejaculação: Não Inadequada (Especifique: _____)
- Dor Testicular Não Sim - Leve Moderada Intensa - E/D/Bil _____ Freq: _____
- Filhos: Não Sim - Idades: _____
- ΔT p/ Gestação (meses) < 6 6 – 12 12 – 18 18 – 24 > 24
- Investigação/tratamento: _____

2. EXAME FÍSICO

- Altura: _____ m Peso: _____ kg IMC: _____
- Varicocele: Ausente Presente (Grau: E _____ D _____)
- Volume Testicular: E: _____ D: _____ Assimetria _____ %
- Testículos: Palpáveis Não-palpável (E/D: _____)
- Epidídimos: Normais Espessado (E/D: _____)
- Ectasiado (E/D: _____)
- Cisto (E/D: _____)
- Não-palpável (E/D: _____)
- Ductos Deferentes: Normais Espessado (E/D: _____)
- Ectasiado (E/D: _____)
- Não-palpável (E/D: _____)
- Aumento Escrotal: Nenhum Hidrocele (E/D: _____) Hérnia (E/D: _____)
- Exame Inguinal Normais Linfadenopatia (E/D: _____) Hérnia (E/D: _____)