
1. INTRODUÇÃO

Infertilidade atinge aproximadamente 15% dos casais em idade reprodutiva e afeta de maneira profunda a vida dessas pessoas. Estima-se que em 30% dos casos, a infertilidade é causada apenas por fatores masculinos, enquanto outros 20% têm causas masculinas e femininas em conjunto. A investigação diagnóstica e o tratamento médico devem ser iniciados pelo casal após 12 meses de relações sexuais sem o uso de métodos contraceptivos sem atingir uma gestação. A avaliação do homem é de fundamental importância, pois tem como objetivo descobrir condições médicas adversas não diagnosticadas, que comprometem o processo reprodutivo^{1, 2}. As causas de infertilidade masculina são multifatoriais e envolvem fatores congênitos e adquiridos. Os fatores congênitos mais comumente associados referem-se ao criptorquidismo e a anormalidades genéticas, como por exemplo, síndrome de Klinefelter e microdeleções do cromossomo Y. Quanto aos fatores adquiridos, estes relacionam-se aos traumas e torsões testiculares, orquites, epididimites, uso de drogas, tabagismo, dentre outros^{3, 4}.

A avaliação do homem infértil deve incluir história médica e reprodutiva cuidadosa, exame físico e análise do sêmen seguida de exames laboratoriais para avaliar o potencial fértil e a qualidade da espermatogênese⁵. A etiologia das falhas no processo de produção e função dos espermatozoides se deve a fatores pré-testiculares, testiculares e pós-testiculares. As causas pré-testiculares estão relacionadas a alterações endócrinas como hipogonadismo hipogonadotrófico, distúrbios sexuais, problemas vasculares, uso de medicamentos, entre outras. Os fatores testiculares estão associados à infecções, varicocele, azoospermia não-obstrutiva (NOA), exposição ao calor e à radiação, microdeleções do cromossomo Y e demais distúrbios genéticos. Por fim, as causas pós-testiculares ocorrem devido a obstruções em nível de epidídimo, vasectomia e infecções de glândulas acessórias^{3, 4}.

O tabagismo tem sido apontado como um fator de grande relevância na abordagem do homem infértil. O cigarro contém mais de 4000 substâncias químicas e seu uso resulta não apenas em complicações cardiorrespiratórias, mas também na diminuição da capacidade reprodutiva⁵. Classicamente, o tabagismo provoca redução da concentração e motilidade espermáticas, além de aumentar o número de morfologias anormais de espermatozoides. Estudos mostram que o cigarro é também capaz de afetar a atividade mitocondrial do gameta masculino e consequentemente comprometer a fertilidade⁶. Adicionalmente, várias classes de medicamentos incluindo anti-hipertensivos,

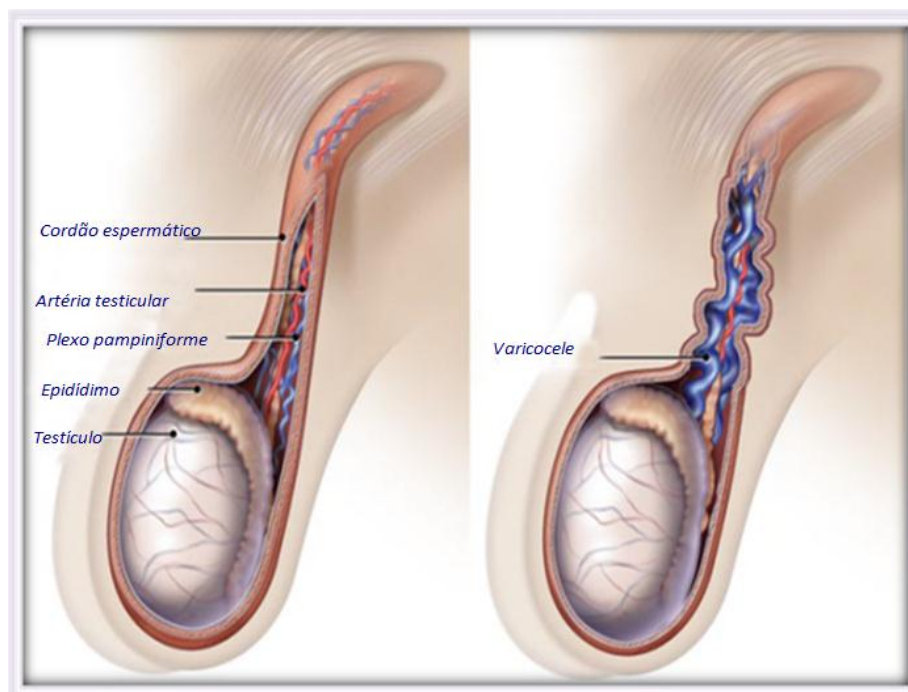
antibióticos, psicotrópicos e agentes quimioterápicos, exercem efeitos deletérios sobre a fertilidade⁷. Atualmente um medicamento que tem sido alvo de extensas investigações é a finasterida. Hallak e colaboradores, documentaram diminuição da espermatogênese, danos no processo de maturação de espermatozoides, redução dos níveis séricos de testosterona e aumento da concentração do hormônio luteinizante (LH), em pacientes que fazem uso diário de 1 mg de finasterida⁸. Drogas ilícitas são outras substâncias que contribuem negativamente para a fertilidade. Dentre estas, a maconha (marijuana) tem sido apontada como uma droga capaz de alterar o pH seminal, reduzir a concentração e a motilidade de espermatozoides, provocar declínio na morfologia espermática pelo critério da Organização Mundial de Saúde (OMS) e pelo critério estrito de Kruger⁹. O uso de anabolizantes é outro fator relevante que acarreta prejuízos do potencial reprodutivo. Segundo Souza e Hallak, azoospermia, oligozoospermia e anormalidades na motilidade e morfologia de espermatozoides, são consequências comuns observadas em atletas profissionais e recreacionais. Além disso, o quadro clínico subsequente ao uso dos anabolizantes é caracterizado por hipogonadismo hipogonadotrófico associado à atrofia testicular e danos na espermatogênese¹⁰.

A azoospermia é uma condição que afeta aproximadamente 1% dos homens na população geral e 10% a 20% dos homens que procuram tratamento para a infertilidade¹¹. Um dos principais recursos terapêuticos nos casos de NOA é a extração de espermatozoides testiculares seguida da injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). Na abordagem dos pacientes com NOA, criptozoospermicos e concomitantemente com varicocele, está indicada a correção cirúrgica da varicocele, uma vez que diversos estudos revelam benefícios diretos nos resultados da análise seminal, sobretudo na motilidade espermática¹¹. Também tem sido extensamente documentado que o tratamento da varicocele em pacientes azoospermicos não obstrutivos pode melhorar a atividade espermatogênica e renovar a produção de espermatozoides¹². Pacientes com azoospermia e oligoastenospermia grave após correção cirúrgica da varicocele melhoram aproximadamente em 40% a 60% dos casos^{12, 13, 14}.

1.1 Varicocele

Dentre as causas identificáveis de infertilidade masculina, a varicocele é a mais frequente e afeta aproximadamente 15% da população geral e até 40% dos homens inférteis ou sub-férteis¹⁵. Sua descoberta foi registrada por Celsius no primeiro século depois de Cristo, que observou a dilatação de veias do escroto e estabeleceu uma relação entre varicocele e atrofia testicular. Em 1856, Curling foi o primeiro a descrever a associação entre varicocele e infertilidade, e anos mais tarde, já no século XIX, cirurgiões descreveram a diminuição da concentração de espermatozoides e a subsequente melhora após a intervenção cirúrgica. Somente em 1955 é que foram descritos resultados favoráveis para o tratamento de infertilidade após a cirurgia da varicocele, que é hoje o procedimento rotineiramente adotado em todo o mundo¹⁶.

Anatomicamente, pode-se definir a varicocele como a dilatação das veias do plexo pampiniforme, que constituem a principal via de drenagem venosa dos testículos. As veias varicosas são incompetentes e desencadeiam refluxo sanguíneo e estase venosa no testículo^{17, 18} (Figura 1).



FONTE: Anawalt BD, 2013.

Figura 1. Ilustração do cordão espermático exibindo plexo pampiniforme normal (à esquerda) e plexo pampiniforme apresentando dilatação e tortuosidade (à direita).

O mecanismo fisiopatológico da varicocele é desconhecido, porém, é descrito na literatura que as substâncias provenientes do metabolismo renal e suprarrenal, bem como a elevação da temperatura do órgão, sejam alguns dos responsáveis pelos seus efeitos deletérios na saúde reprodutiva masculina. Estudos recentes têm atribuído ao estresse oxidativo testicular (desequilíbrio entre substâncias oxidantes e antioxidantes) grande parte do impacto negativo da varicocele à espermatogênese^{18, 19,20}. Além disso, tem sido extensamente documentado a participação adversa da varicocele na diminuição do volume e no comprometimento da homeostase testicular^{21, 22, 23}.

O diagnóstico da varicocele é realizado através da palpação cuidadosa do plexo pampiniforme com o paciente em posição ortostática. A manobra de Valsava é utilizada e destina-se à avaliação dos três graus de varicocele. A varicocele grau I é diagnosticada quando há dilatação das veias do plexo pampiniforme, palpável apenas mediante a manobra de Valsava; grau II, a dilatação é percebida sem o uso da manobra mencionada; e a varicocele grau III é diagnosticada pela dilatação volumosa do plexo pampiniforme, visível a olho nu. (Figura 2). Adicionalmente, a varicocele é considerada subclínica quando o refluxo do plexo pampiniforme é auscultado por Doppler dos testículos e anexos ou Doppler-estetoscópio²¹⁻²³.



FONTE: Sabanegh ES, 2011.

Figura 2: Fotografia de paciente com varicocele grau III.

A Figura 3 é uma fotografia do aparelho Doppler-estetoscópio utilizado no presente estudo para avaliação do refluxo venoso.

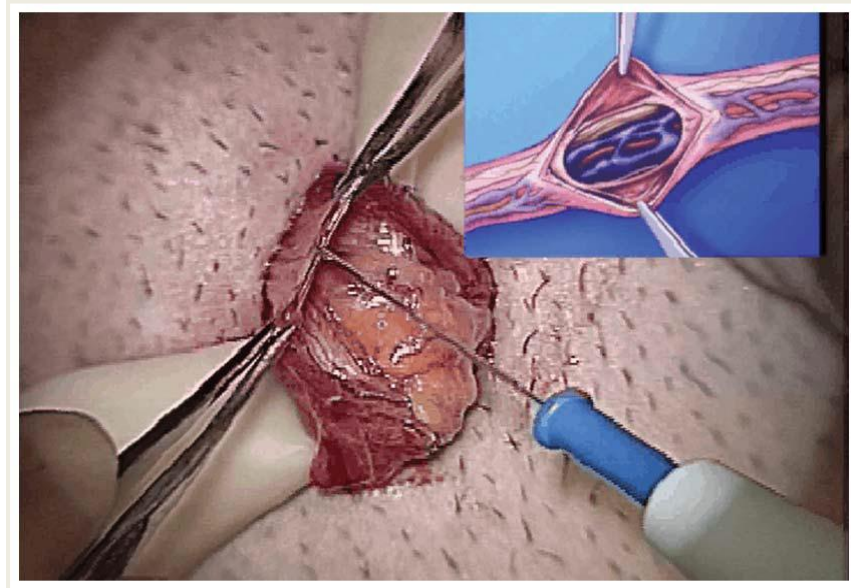


Figura 3: Doppler – estetoscópio. Fonte: autores.

1.2 Correção microcirúrgica de varicocele

A varicocelectomia consiste no procedimento cirúrgico de correção da varicocele no qual é realizada a ligação das veias varicosas que drenam os testículos. Na atualidade, a abordagem microcirúrgica tem sido amplamente empregada, cuja técnica envolve o uso de um microscópio de operação que permite a ampliação do campo cirúrgico de 6 a 25 x melhorando consideravelmente a acuidade visual do cirurgião e sua capacidade de precisão (Figura 4). A ampliação permite a identificação meticulosa e a consequente preservação de artérias testiculares, artérias cremastéricas, vasos linfáticos e veias testiculares funcionais, além de auxiliar na identificação de todas as rotas possíveis de retorno venoso, incluindo veias espermáticas externas, veias cremastéricas e gubernaculares. A varicocelectomia microcirúrgica pode ser realizada por meio de incisão inguinal ou subinguinal. Ambas as abordagens permitem a elevação do cordão espermático facilitando a visualização de suas estruturas, todavia, a incisão subinguinal

permite a abertura de qualquer camada fascial, que está associada a uma recuperação mais rápida, menos dolorosa e com menores taxas de recorrência^{24,25}.



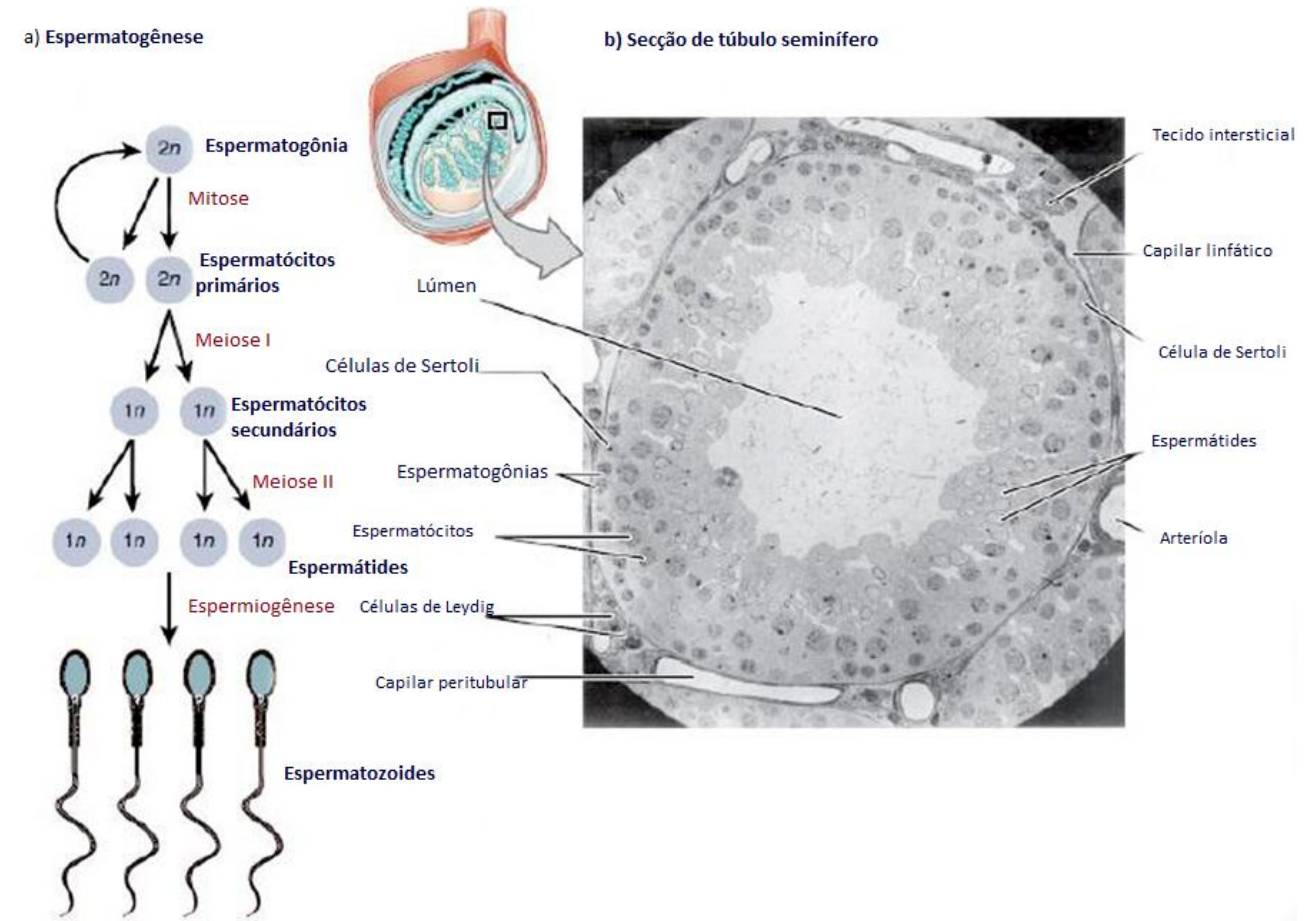
FONTE: Mehta e Goldstein, 2013.

Figura 4: Exposição do cordão espermático evidenciando veias espermáticas internas e externas. Imagem obtida utilizando-se microscópio de operação durante procedimento de varicocelectomia microcirúrgica.

1.3 Espermatogênese

O potencial reprodutivo de cada indivíduo está intimamente relacionado à qualidade da espermatogênese. Esta é iniciada na puberdade e pode ser definida como o processo de formação dos gametas masculinos (espermatozoides) a partir do epitélio dos túbulos seminíferos. O compartimento peritubular é a região do testículo onde se processa a espermatogênese e representa aproximadamente 60 a 80% do volume testicular total, sendo constituído por células peritubulares, células germinativas, células somáticas e células de Sertoli²⁶.

A Figura 5 é uma representação esquemática dos estágios da espermatogênese acompanhada de eletromicrografia de testículo humano.



FONTE: Openstax College, 2013.

Figura 5: Representação da espermatogênese. a) Mitose de uma célula tronco espermatogonial: uma única divisão celular resulta em duas células filhas diploides (espermatócitos primários). A Meiose se processa em duas divisões celulares. A primeira é caracterizada pela diferenciação de espermatócitos primários em espermatócitos secundários (haploides). A segunda divisão meiótica se processa pela diferenciação de espermatócitos secundários em espermátides, com a produção de quatro células filhas haploides. (b) Eletromicrografia de secção transversal de um túbulo seminífero exibindo o lúmen na área central da imagem. São identificados espermatogônias, espermatócitos primários, espermátides e células de Sertoli²⁷.

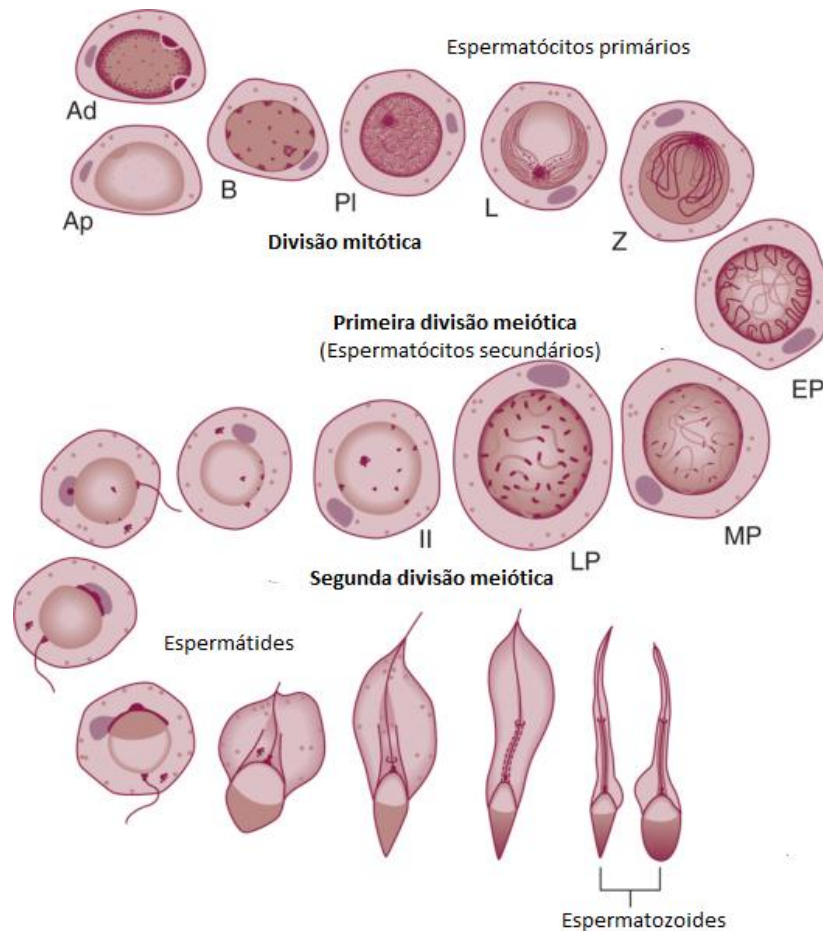
As células de Sertoli representam as células somáticas localizadas no epitélio dos túbulos seminíferos e se estendem desde a membrana basal peritubular até o lúmen. São consideradas células estruturais, pois estão envolvidas no suporte e sustentação do epitélio germinativo. Outras atribuições associadas a estas células estão a síntese e secreção de uma ampla variedade de substâncias, como por exemplo, proteínas,

citocinas, fatores de crescimento, prostaglandinas e moduladores da divisão celular, estando envolvidas também na nutrição das células germinativas²⁶.

A atividade espermatogênica se inicia com a divisão das células tronco germinativas e termina com a formação de espermatozoides maduros. Associações celulares com caracteres morfológicos específicos representam os variados estágios do processo de espermatogênese, que pode ser dividido em 4 fases:

1. Fase mitótica: proliferação e diferenciação de células germinativas diploides (espermatogônias).
2. Fase meiótica: divisão de células germinativas tetraploides (espermatócitos) por meiose, resultando em células germinativas haploides (espermátides).
3. Fase espermiogênica: transformação de espermátides em espermatozoides testiculares.
4. Fase de liberação: liberação de espermatozoides do epitélio germinativo ao lúmen tubular (espermição). As Figuras 5 e 6 demonstram esquematicamente todo o processo descrito^{26, 28}.

As espermatogônias localizam-se na base do epitélio seminífero e do ponto de vista fisiológico são classificadas em tipo A e tipo B. As do tipo A subdividem-se em Ad (*do inglês: "dark"*, que quer dizer escuro) e Ap (*do inglês: "pale"*, que quer dizer pálido). Ambas se diferenciam uma da outra em virtude da coloração de seus núcleos. As espermatogônias Ad não mostram atividade proliferativa em circunstâncias normais e acredita-se que raramente se dividem. Em contrapartida, as espermatogônias Ap sofrem mitose e se diferenciam em um novo conjunto de células Ap e também em espermatogônias do tipo B (Figura 6). Estas últimas originam os espermatócitos primários do tipo preleptóteno até o estágio de espermatócitos paquítenos antes ainda da divisão meiótica²⁶.



FONTE: Adaptado de Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S, 2010.

Figura 6: Representação esquemática da progressão das células germinativas presentes no epitélio dos túbulos seminíferos. Ad, Ap e B representam populações distintas de espermatogônias. As designadas de Ad são consideradas as células tronco testiculares, as espermatogônias Ap se diferenciam em espermatogônias B, que por sua vez, originam os espermatócitos em seus diferentes estágios de maturação. PL = espermatócito preleptóteno, L = espermatócito leptóteno, EP = espermatócito paquíteno. MP = Espermatócito paquíteno intermediário, LP= espermatócito paquíteno tardio. II = segunda divisão meiótica.

A primeira divisão meiótica caracteriza-se pela transição dos espermatócitos primários em seus variados estágios em espermatócitos secundários. Estas células apresentam material cromossômico haploide. Homens inférteis cuja interrupção do processo espermatogênico ocorre nesta fase, apresentam pior prognóstico para o sucesso das taxas de recuperação de espermatozoides testiculares. Após a segunda divisão meiótica os espermatócitos secundários dão origem às espermatídes (haploides)²⁷.

As espermatídes recém-produzidas são células redondas mitoticamente inativas que passam por notável transformação, nas quais resultam em espermatídes alongadas e conseqüentemente em espermatozoides maduros. Faz parte desse evento a condensação e a formação estrutural do núcleo da célula, bem como a formação do flagelo e expulsão

de grande parte do citoplasma celular. O referido processo é denominado espermiogênese. Todavia, a liberação dos espermatozoides ao lúmen tubular é designada de espermiacção^{27,28,29}.

1.4 Biópsia testicular

A biópsia testicular é uma ferramenta valiosa no estudo e na avaliação da fertilidade masculina, uma vez que testes endócrinos não são capazes de apontar precisamente possíveis prejuízos na espermatogênese. Sua aplicação na prática clínica iniciou-se em 1913 e começou ser amplamente utilizada a partir dos anos 40. Desde então, várias metodologias para obtenção do parênquima testicular foram propostas, sendo a biópsia testicular aberta e a biópsia testicular percutânea as mais utilizadas. A biópsia testicular percutânea é uma abordagem mais recente, cujo procedimento é relativamente simples e que pode ser realizado em ambulatório. Possui duas variantes, sendo a aspiração percutânea com agulha fina e aspiração percutânea com agulha grossa^{30, 31}.

1.4.1 Biópsia testicular percutânea por agulha grossa

A biópsia testicular percutânea por agulha grossa (traduzido do inglês: “*large-needle aspiration biopsy*” – LNAB) é uma técnica executada sob anestesia local utilizando-se 5 a 7 mL de lidocaína a 2% que é injetada no cordão espermático. Em seguida, o testículo é imobilizado manualmente (Figura 7). É inserida uma agulha de 18 ou 20 mm de diâmetro na superfície testicular por meio de perfuração da pele escrotal. Movimenta-se a agulha no interior do testículo em movimentos de “vai-e-vem” para que haja rompimento dos túbulos seminíferos. A agulha utilizada no procedimento é acoplada a uma seringa descartável de 20 a 30 mL. Deste modo, é possível a realização da aspiração em diferentes locais para que se obtenha a amostra testicular. O procedimento é realizado bilateralmente e tem como vantagem o uso de anestesia local e o retorno do paciente à sua rotina no dia seguinte. Além disso, outro benefício da

técnica é o baixo custo. Como desvantagem, o tamanho do fragmento testicular é limitado e conseqüentemente um menor número de túbulos seminíferos para análise histológica é obtido^{32,33,34}.



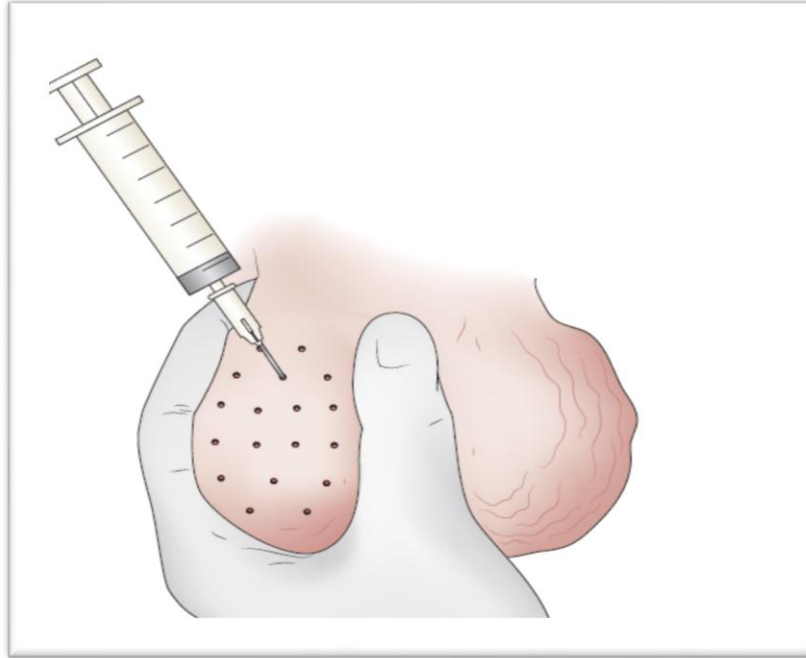
FONTE: Benoff SH *et al*, 2004.

Figura 7: Biópsia testicular percutânea por agulha grossa

1.4.2 Biópsia testicular percutânea por agulha fina

A biópsia testicular percutânea por agulha fina (traduzido do inglês: “*fine-needle aspiration biopsy*” – FNAB) é um procedimento semelhante ao descrito anteriormente. Depois de anestesiado, o testículo é puncionado com uma agulha fina de aproximadamente 14 mm de diâmetro acoplada a uma seringa especial. O diâmetro da agulha é variável, pois depende do volume testicular do paciente. São realizados movimentos repetidos de aspiração por diferentes locais até o momento da entrada do fragmento testicular na seringa (Figura 8). Todavia, a amostra colhida é menor quando comparada à aspiração percutânea com agulha grossa. A principal vantagem atribuída a esta técnica é o fato de ser minimamente invasiva e com menor desconforto para o

paciente na recuperação, entretanto, os fragmentos testiculares obtidos são menores, podendo implicar em prejuízos na avaliação histopatológica^{35, 36}.

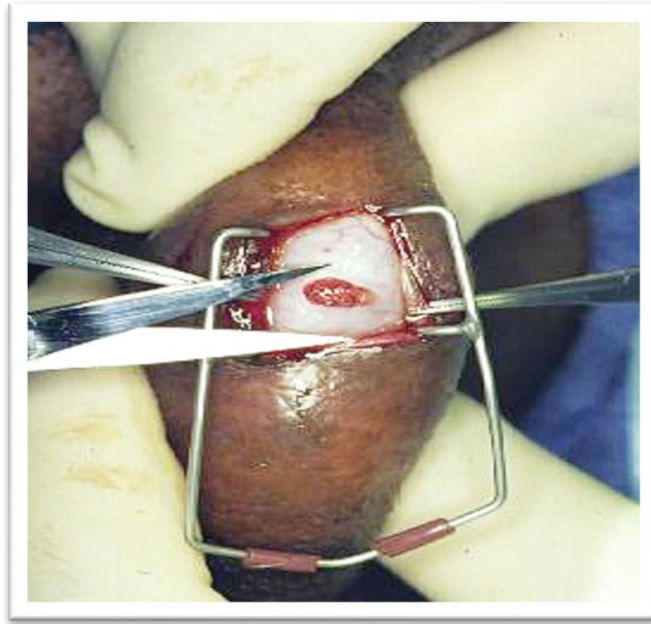


FONTE: Shin DH and Turek PJ, 2013.

Figura 8: Biópsia testicular percutânea por agulha fina.

1.4.3 Biópsia testicular aberta

A biópsia testicular aberta (traduzido do inglês: “*open biopsy*”) é um procedimento cirúrgico que deve ser realizado em ambiente hospitalar, utilizando-se anestesia raquidiana ou em alguns casos anestesia geral. Realiza-se uma incisão de 0,5 a 1,0 cm no escroto e em suas camadas subjacentes até a exposição da túnica vaginalis e túnica albugínea (Figura 9). O fragmento testicular é então extraído e enviado ao laboratório de anatomia patológica. É um procedimento de custo mais elevado e com recuperação mais lenta e dolorosa para o paciente, no entanto a qualidade do material extraído e o maior número de túbulos seminíferos visualizados na análise histológica é uma vantagem sobremaneira considerável, uma vez que reflete maior precisão do estado testicular^{37, 38}.



FONTE: Shin DH and Turek PJ, 2013.

Figura 9: Biópsia testicular aberta evidenciando túnica albugínea. Após a incisão da mesma, é exposto o parênquima testicular no qual se retira o fragmento para análise histopatológica.

1.5 Avaliação histopatológica

A avaliação histopatológica clássica do testículo inclui características gerais das células testiculares, observando-se a uniformidade e ou heterogeneidade dos caracteres histológicos, diâmetro dos túbulos seminíferos, presença ou ausência de fibrose, estágio de maturação das células espermáticas, avaliação das células de Sertoli e caracteres intersticiais como, por exemplo, a avaliação das células de Leydig^{30, 39,40}.

As classificações histológicas mais comumente empregadas se referem à espermatogênese normal, síndrome das células de Sertoli, parada de maturação e hipoespermatogênese^{29, 30}.

- I. Espermatogênese normal: os túbulos seminíferos apresentam calibre regular e túnica própria. São encontradas células de Sertoli, espermatogônias, espermatócitos primários e secundários, espermátides e espermatozoides maduros no tecido testicular^{30, 39} (Figura 10).

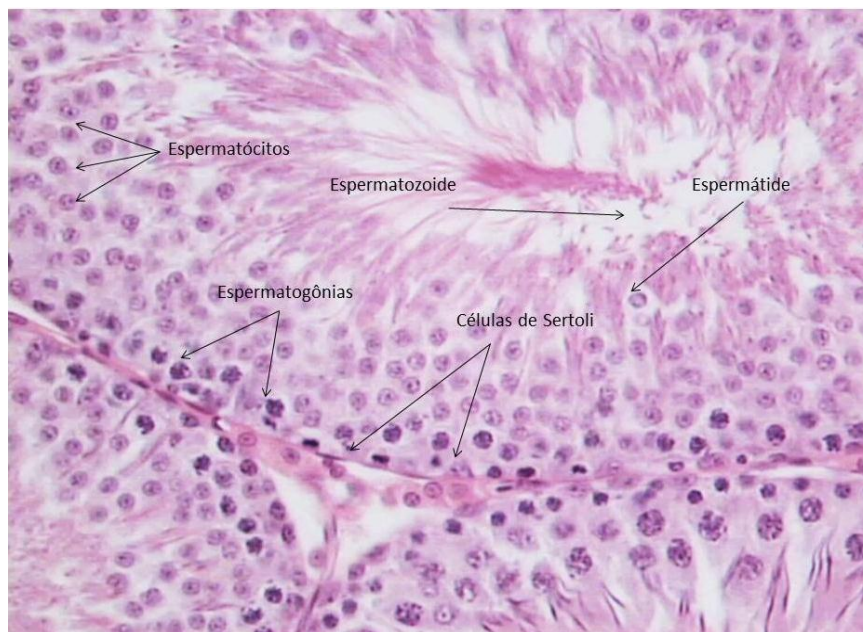


Figura 10: Fotomicrografia testicular evidenciando todas as células germinativas e lúmen com presença de espermatozoides (aumento: 100 x). Coloração: HE. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.

- II. Síndrome das células de Sertoli ou aplasia germinativa: é caracterizada por apresentar túbulos seminíferos revestidos apenas por células de Sertoli, com células germinativas ausentes^{30, 39} (Figura 11).

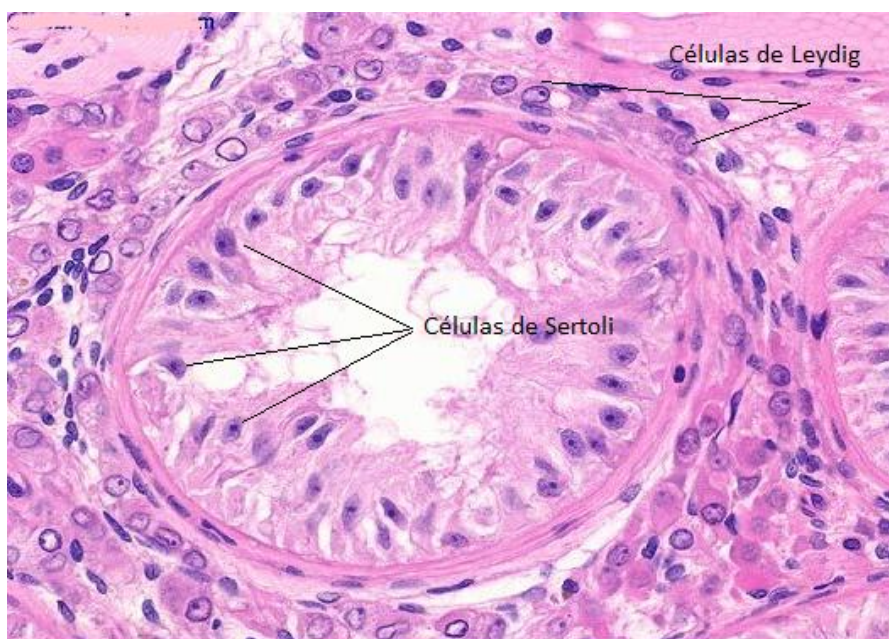


Figura 11: Túbulos seminíferos apresentando síndrome das células de Sertoli. Há completa ausência de células germinativas permanecendo apenas as células de Sertoli (aumento: 400 x). Coloração: HE. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.

III. CGA (do inglês: “*Cell Germ Arrest*” que quer dizer “*parada de maturação de células germinativas*”) é uma classificação histológica frequentemente encontrada em pacientes inférteis e é definida como a interrupção completa e uniforme da espermatogênese em todos os túbulos seminíferos (Figura 12). A parada de maturação pode ocorrer em nível de espermatogônias, espermatócitos secundários e espermatídes, porém, está classicamente associada a espermatócitos primários²⁹. Deficiência de gonadotrofinas, processos de quimioterapia e radioterapia relacionam-se à CGA ao nível de espermatogônias. Distúrbios cromossômicos durante a meiose correspondem às principais causas de CGA em espermatócitos primários e secundários. Quando a parada de maturação é reversível ao nível de espermatócitos primários, os principais fatores associados são infecções, exposição ao calor, desequilíbrio hormonal e deficiência nutricional. Quando CGA está presente em nível de espermatídes, fatores externos e ambientais são as causas mais comumente associadas^{39,40,41}. Segundo Cerilli e colaboradores, em 61 casos de biópsias com diagnóstico de CGA em espermatócitos primários, foram registradas taxas de sucesso de 14.3% na extração de espermatozoides testiculares. Quando a parada de maturação ocorre em nível de espermatócitos secundários, as taxas de sucesso se elevam para 46.1%, demonstrando, portanto, o papel fundamental da segunda divisão meiótica no sucesso dos tratamentos de infertilidade⁴².

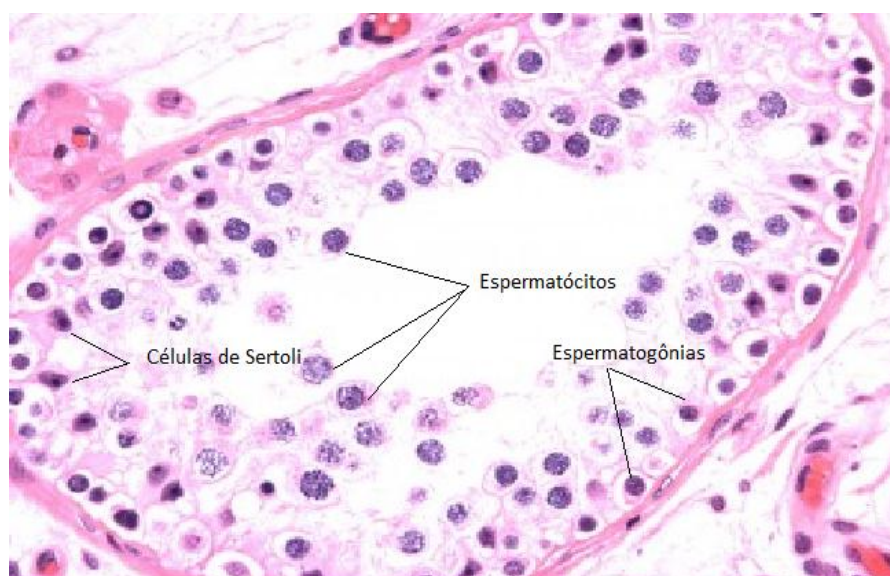


Figura 12: Túbulo seminífero exibindo parada de maturação em espermatócitos primários (aumento: 400 x). Coloração: HE. Devido ao curto estágio de diferenciação dos espermatócitos secundários, estes são raramente visualizados. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.

- IV. Hipoespermatogênese: achado histológico no qual se identifica todas as formas germinativas, até os estágios mais maduros (espermatozoides), porém em densidade reduzida. Há redução da espessura do epitélio germinativo^{39, 40} (Figura 13).

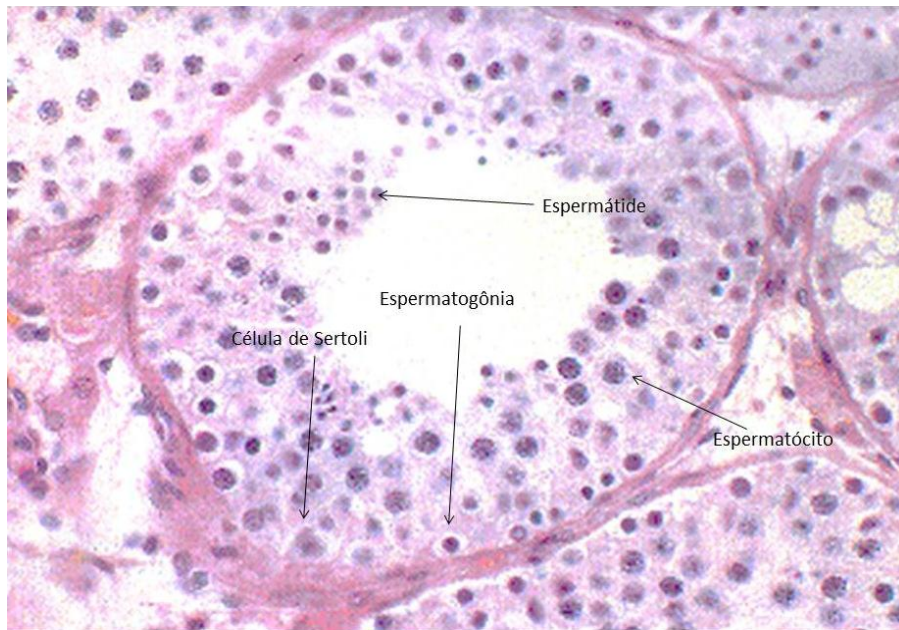


Figura 13: Túbulos seminíferos apresentando redução da atividade espermatogênicas, porém observa-se presença de todas as células germinativas (aumento: 400 x). Coloração: HE. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.

- V. Hialinização tubular: consiste na ausência de células germinativa e de células de Sertoli. Encontra-se frequentemente a presença de fibrose peritubular associada, além de material similar a membrana basal depositado no espaço peritubular. Os túbulos sofrem hipotrofia (redução do calibre), e sua luz é progressivamente preenchida por material amorfo. O epitélio germinativo é, portanto, afetado de maneira significativa^{39,40,43} (Figura 14).

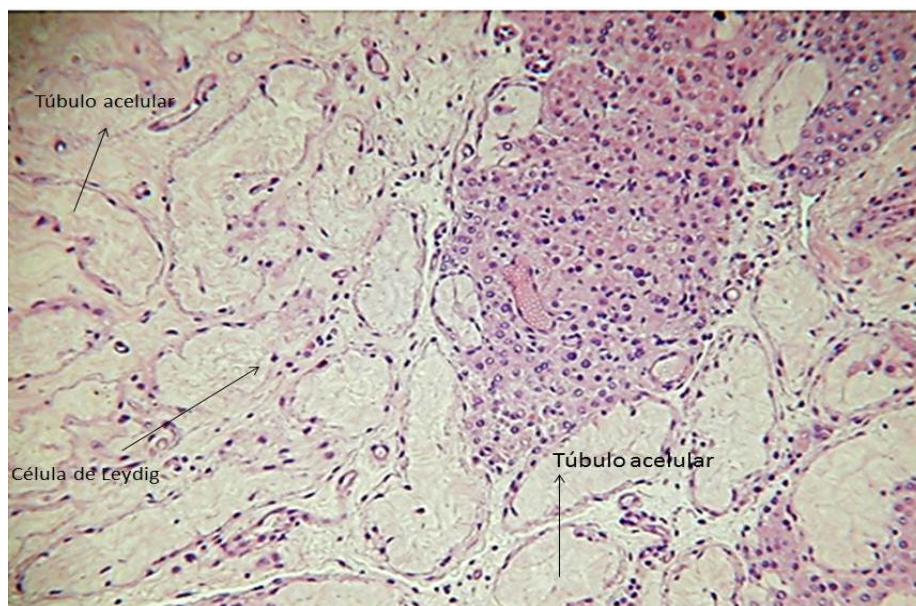


Figura 14: Fotomicrografia testicular exibindo túbulos hialinizados com completa ausência de células germinativas e células de Sertoli. Células de Leydig são vistas no espaço intersticial (aumento: 100 x). Coloração: HE. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.

Desde a aplicação da biópsia testicular na prática médica, diversas metodologias de avaliação e classificação histológica foram criadas. Silber e Rodriguez-Rigau criaram um sistema quantitativo e preditivo para avaliação da concentração de espermatozoides seminais, baseado na contagem de espermátides. Foi descrito que homens oligozoospermicos com presença de 4 a 6 espermátides por túbulo seminífero, são capazes de ejetar aproximadamente 3 milhões de espermatozoides por mL de sêmen. Pacientes com mais de 20 espermátides por túbulo, são passíveis de obter concentrações espermáticas acima de 10 milhões por mL. O método apesar de simples e de fácil execução, apresentou grande disparidade de resultados quando colocado em prática^{29, 43}.

Outros métodos de classificação histológicas estabelecidos e que ganharam grande reprodutibilidade, foram os critérios formulados por Svend Johnsen em 1979 e por McLachlan e colaboradores em 2007, conhecido popularmente como critério de Copenhague^{39, 40}. O método de Johnsen foi criado devido à falta de uniformidade das análises histológicas na época e à ausência de correlações da histologia testicular com os parâmetros seminais. Por outro lado, 28 anos depois, o critério de Copenhague estabeleceu uma abordagem atualizada em biópsias de testículo, enfatizando principalmente os casos de azoospermia não-obstrutiva, além de tentar

corrigir possíveis imperfeições no sistema de classificação baseado na fisiopatologia testicular em testículos disgenéticos. Johnsen propôs seu sistema de classificação baseado na hipótese de que a degeneração das células do epitélio germinativo, sempre ocorre de forma progressiva, ou seja, das células mais maduras (espermatozoides) até as células menos diferenciadas (espermatogônias). No entanto, o grupo de Copenhagen apresenta dados nos quais túbulos seminíferos com presença de espermátides alongadas, não apresentavam espermátides redondas e até mesmo espermatogônias, derrubando deste modo, a teoria de Johnsen^{39, 40}.

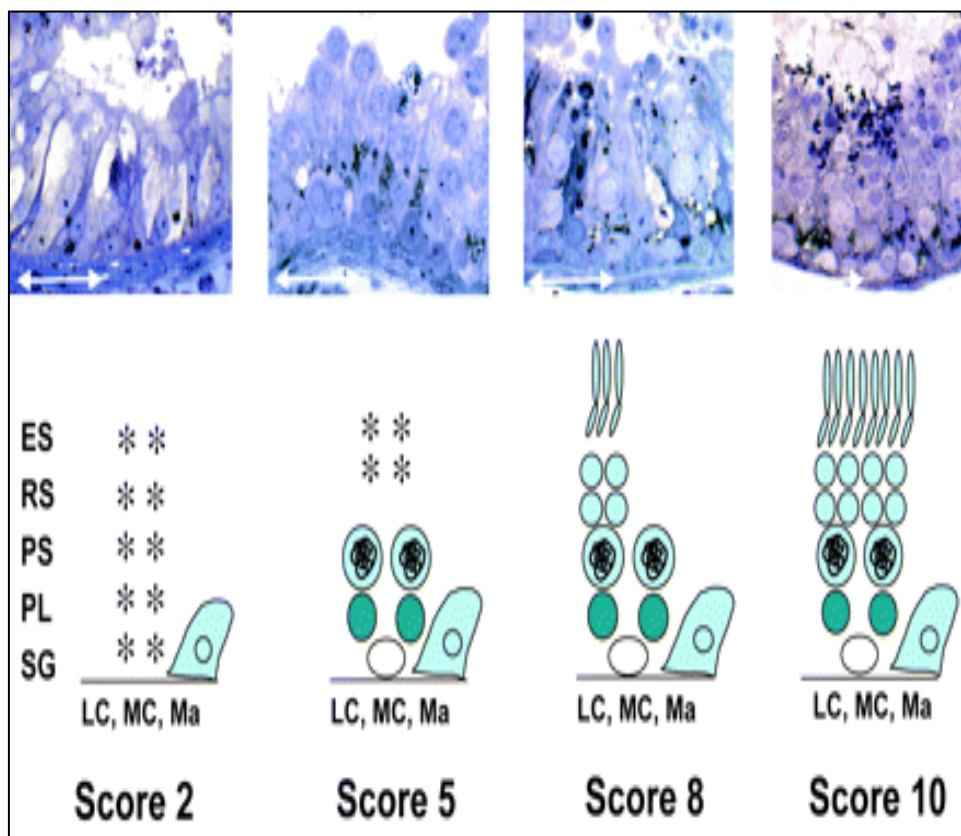
1.6. Score de Johnsen

O critério de Johnsen consiste de um sistema quantitativo para descrever a espermatogênese. O método é expresso através de um *score*, no qual são aferidas notas de 1 a 10, de acordo com o perfil das células encontradas ao longo dos túbulos seminíferos. O critério de Johnsen é prático e de fácil execução, visto que o autor procurou correlacionar os resultados das análises seminais aos resultados das biópsias testiculares³⁹.

A interpretação de cada *score* é apresentada na Figura 15 e na descrição a seguir:

- *Score* 10: espermatogênese completa com inúmeros espermatozoides. Epitélio germinativo organizado e com lúmen aberto;
- *Score* 9: presença de muitos espermatozoides, epitélio germinativo desorganizado com lúmen estreito ou obliterado;
- *Score* 8: poucos espermatozoides visualizados;
- *Score* 7: nenhum espermatozoide, porém com presença de inúmeras espermátides;
- *Score* 6: nenhum espermatozoide com poucas espermátides;
- *Score* 5: nenhum espermatozoide e nenhuma espermátide com presença de inúmeros espermatócitos;
- *Score* 4: apenas poucos espermatócitos;
- *Score* 3: somente espermatogônias;

- *Score 2*: somente células de Sertoli e nenhuma célula germinativa;
- *Score 1*: túbulo completamente acelular³¹.



FONTE: Feig *et al*, 2007.

Figura 15: Representação esquemática dos *scores* 2, 5, 8 e 10 de Johnsen em micrografia de secção semifina de amostra testicular. ES = espermátides alongadas e espermatozoides. RS = espermátides redondas; PS e PL= espermatócito em estágio de preleptóteno e paquíteno; SG =espermatogônia. LC = célula de Leydig; MC = macrófagos e Ma = células mioides³⁶.

Atribuindo-se determinado *score*, obtém-se uma graduação progressiva e intuitiva, que pode ou não se correlacionar com determinado tipo de desfecho clínico. O método de Johnsen apresenta grande especificidade para espermatogênese, permitindo avaliações prognósticas em indivíduos sub-férteis. No entanto, elementos relevantes na avaliação masculina global, como a distribuição e quantificação das células de Leydig e presença de anormalidades como granulomas ou microlitíase, acabam não sendo avaliados³⁹. As Figuras 16 a 25 são fotomicrografias de biópsias testiculares dos pacientes estudados e ilustram todos os *scores* do critério de Johnsen:



Figura 16: *Score 10.* Aumento: 400 x. Coloração HE. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.

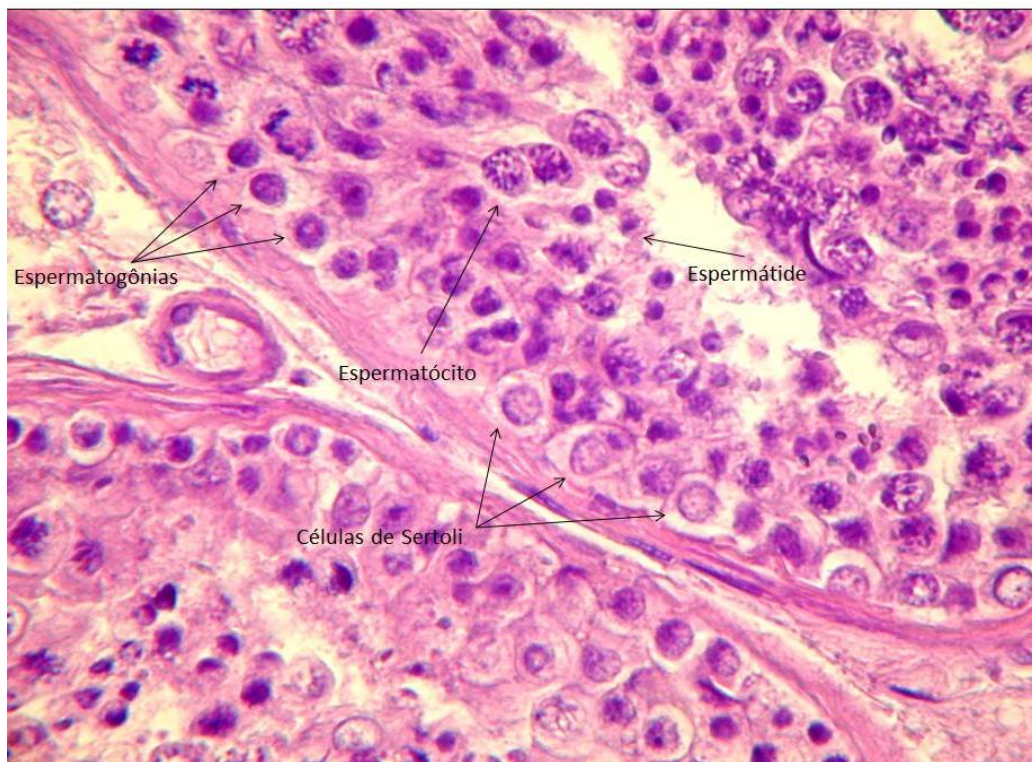


Figura 17: *Score 9.* Aumento: 400 x. Coloração HE. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.

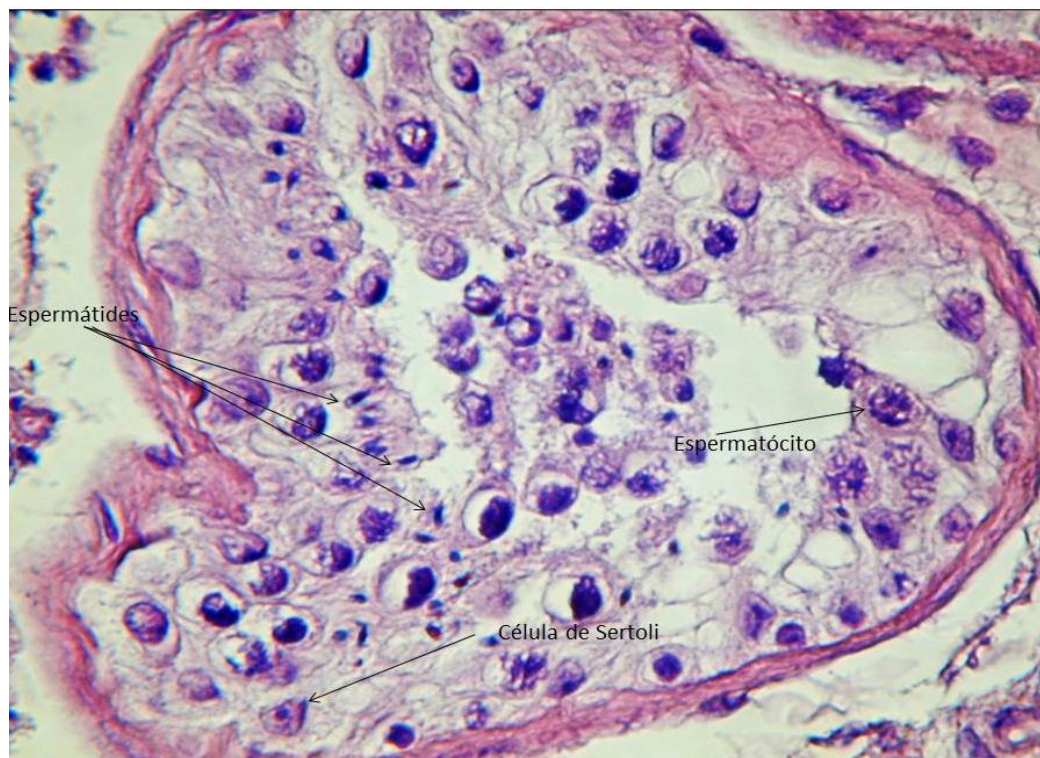


Figura 18: *Score 8.* Aumento: 400 x. Coloração HE. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.

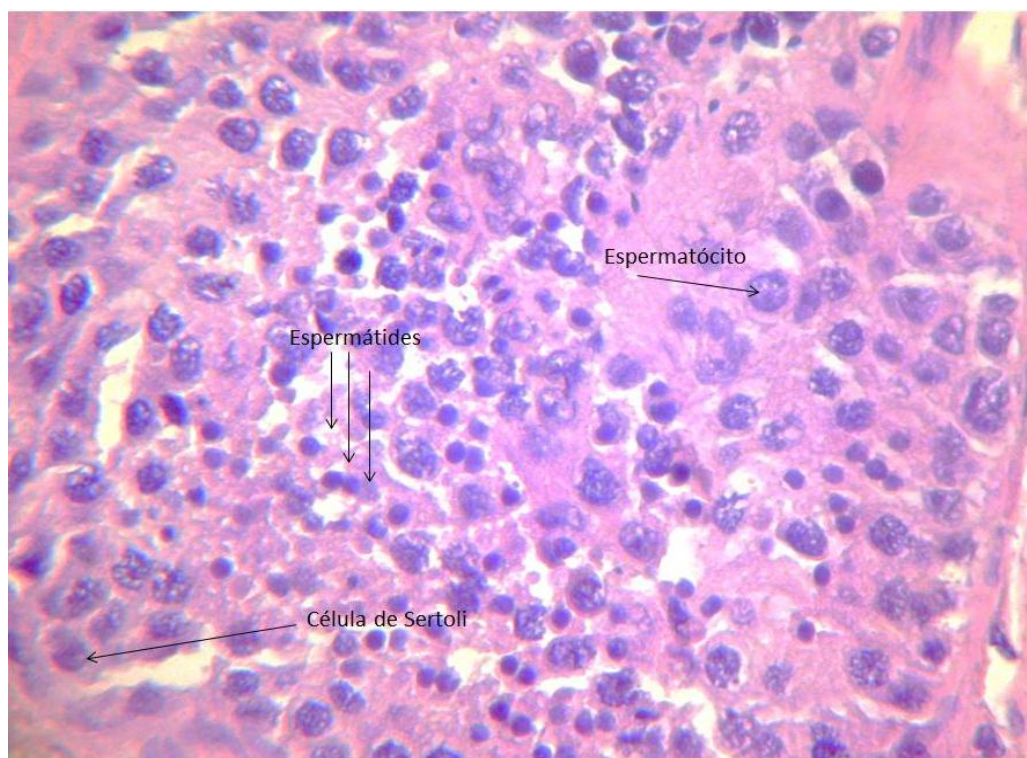


Figura 19: *Score 7.* Aumento: 400 x. Coloração HE. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.

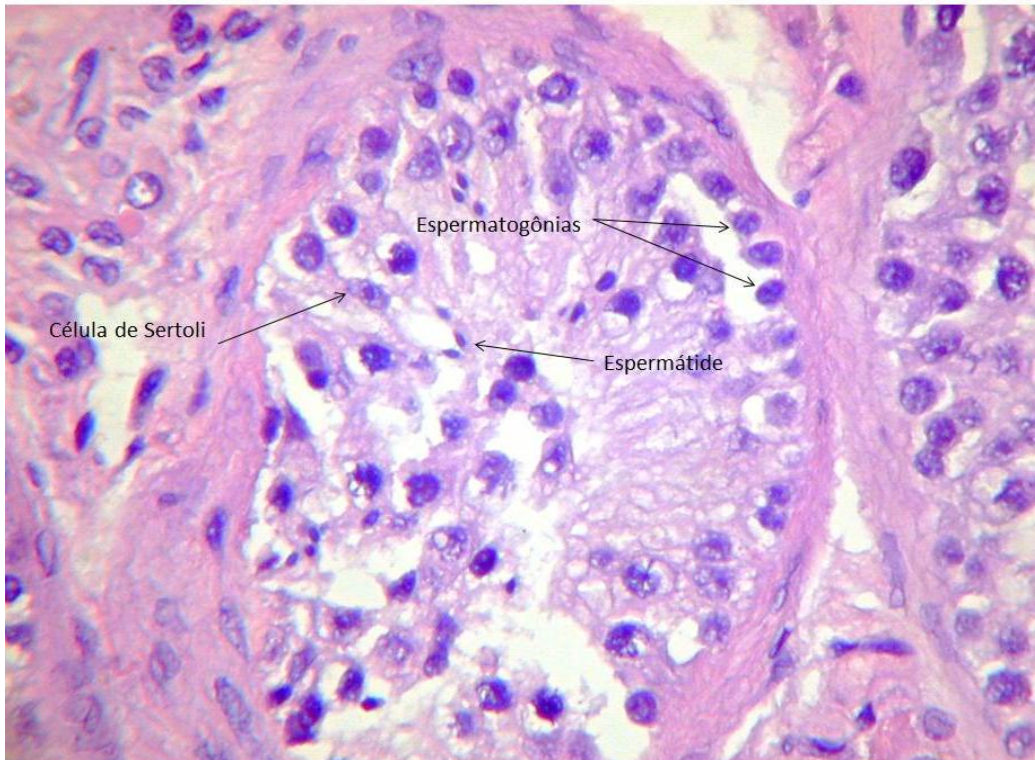


Figura 20: *Score 6.* Aumento: 400 x. Coloração HE. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.

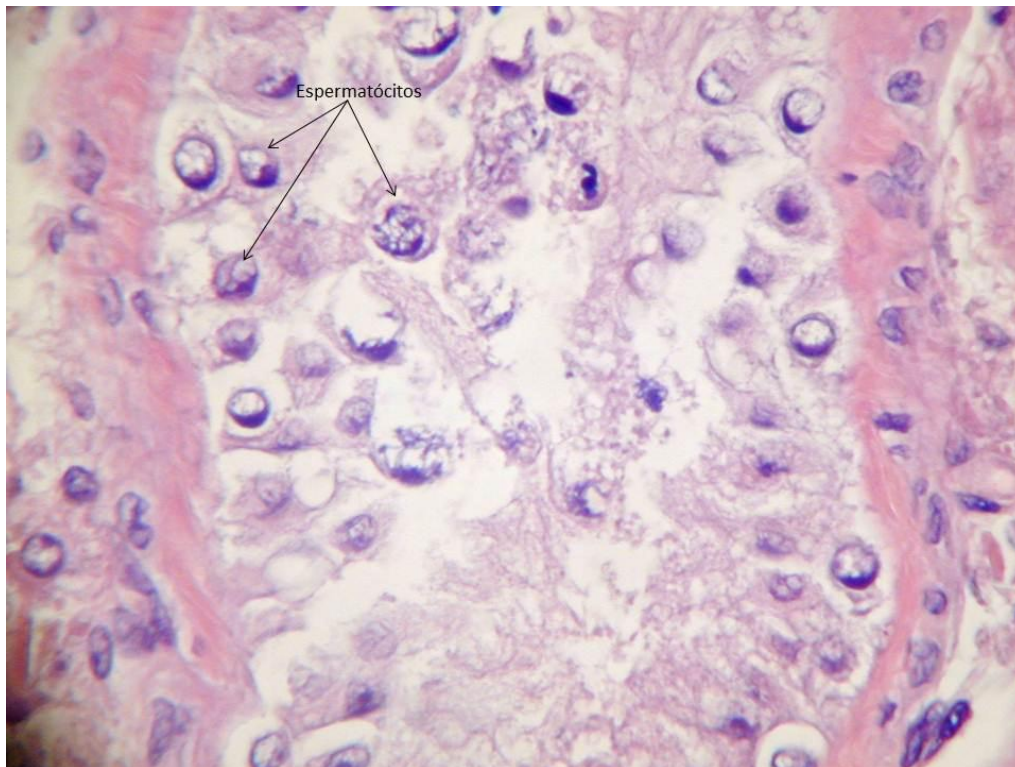


Figura 21: *Score 5.* Aumento: 400 x. Coloração HE. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.



Figura 22: Score 4. Aumento: 400 x. Coloração HE. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.

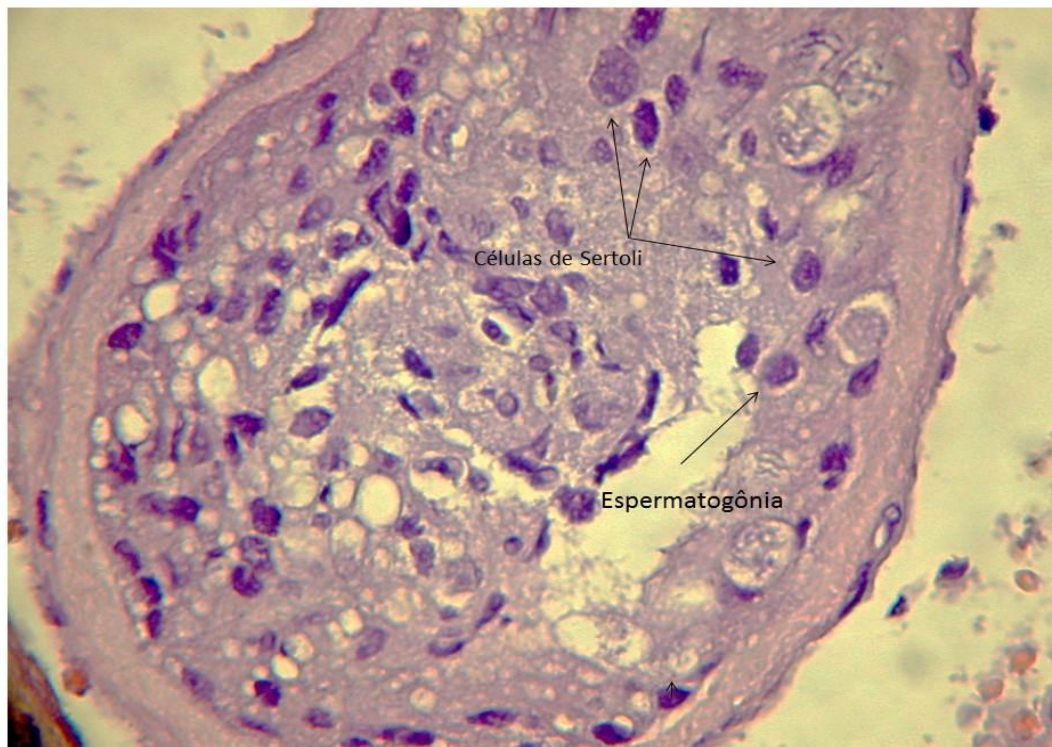


Figura 23: Score 3. Aumento: 400 x. Coloração HE. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.

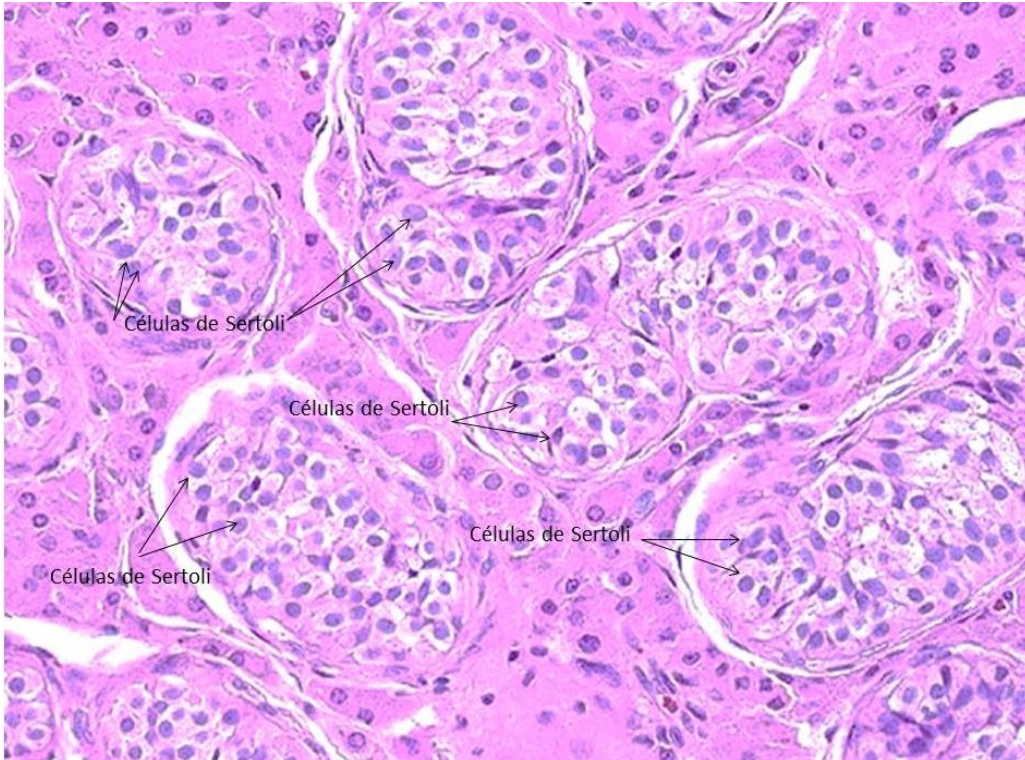


Figura 24: *Score 2.* Aumento: 25 x. Coloração HE. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.

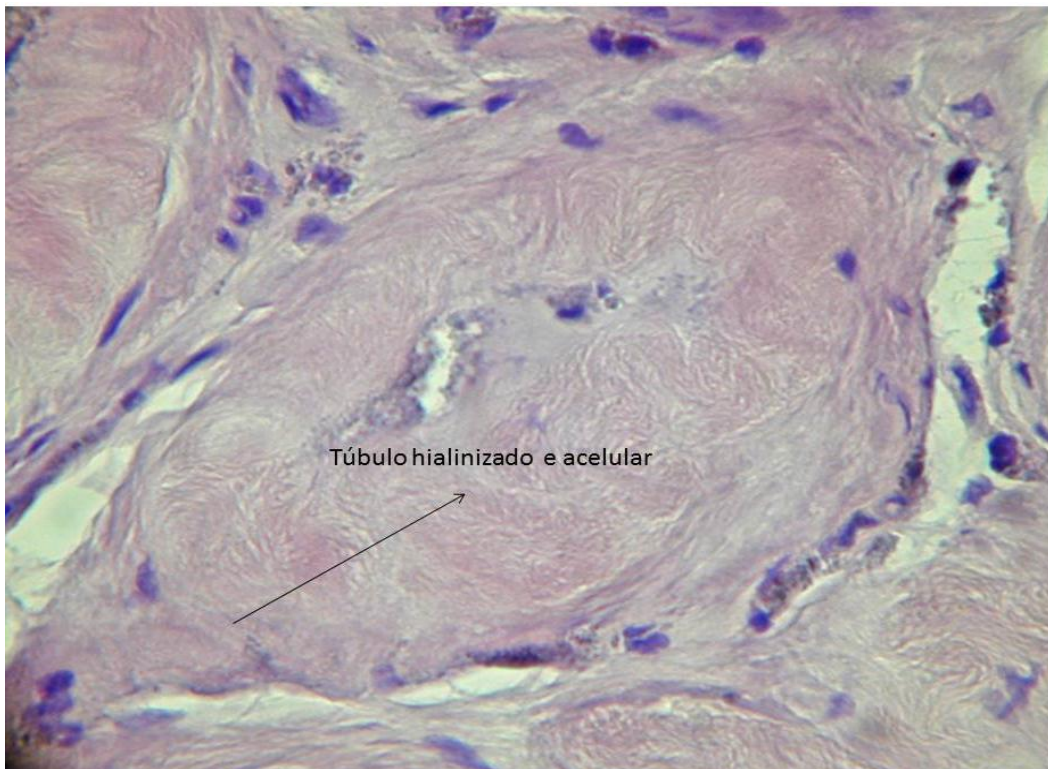


Figura 25: *Score 1.* Aumento: 400 x. Coloração HE. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.

1.7 Índice de Copenhagen

O índice de Copenhagen foi descrito em 2007 e além da descrição celular dos túbulos seminíferos, leva em conta dados relevantes para diagnóstico incidental de carcinoma *in situ*. É um método menos intuitivo, mais detalhado e descritivo. Na interpretação deste método de análise histológica, diferentemente do *score* de Johnsen, os valores numéricos atribuídos não apresentam característica progressiva, ou seja, não há relação entre o valor atribuído e a gravidade ou importância do achado, tornando sua interpretação mais complexa. Em geral, os menores valores, representam melhores resultados^{28,40}. No entanto, o índice de Copenhagen, propõe uma abordagem aprofundada para aplicação, processamento e descrição de resultados histológicos visando uma maior correlação anatomopatológica com o histórico clínico⁴⁰. Por intermédio desse critério, é possível a descrição da heterogeneidade testicular, uma vez que na mesma amostra avaliada, pode haver presença de túbulos seminíferos normais e túbulos com espermatogênese comprometida (Figura 32). Nesse sentido, o método enfatiza a correlação entre histologia testicular de pacientes com azoospermia não-obstrutiva e o sucesso na recuperação de espermatozoides. Trata-se de um sistema descritivo capaz de estabelecer a viabilidade do procedimento de aspiração e extração de espermatozoides, uma vez que fornece informações detalhadas da citoarquitetura testicular. Os resultados do índice de Copenhagen, portanto, auxiliam mais eficazmente no prognóstico do sucesso da obtenção de espermatozoides, bem como nas técnicas de reprodução assistida. O resultado é expresso em quatro dígitos, onde o dígito I descreve o tipo de testículo (adulto, imaturo ou neoplásico); o dígito II expressa o principal padrão histológico encontrado na amostra; o dígito III define o segundo padrão histológico mais visualizado; e o dígito IV descreve características adicionais e anormalidades diversas (Quadro1). Um padrão histológico de excelência pode ser representado pelo índice 1.1.1.0, enquanto que um prognóstico desfavorável pode ser expresso pelo índice 1.9.9⁴⁰.

Quadro 1: Representação dos dígitos do índice de Copenhagen. No dígito I, o número 1 representa o testículo de um homem adulto e os números 2 e 3 dizem respeito ao testículo pré-púbere e ao testículo neoplásico, respectivamente. Cada algarismo do dígito II expressa o principal padrão histológico visualizado nos túbulos; o dígito III representa o segundo padrão histológico mais presente na análise. Os números que compõem o dígito IV descrevem características histológicas secundárias, porém, de grande valor clínico.

Dígito I	Dígito II	Dígito III	Dígito IV
Tipo de testículo	Padrão histológico de maior prevalência	Segundo padrão histológico mais prevalente	Anormalidades e características adicionais
1. Testículo adulto	1. Homogêneo, espermatogênese normal	1. Espermatogênese normal	1. Infiltração linfocítica
1. Testículo adulto	2. Homogêneo, reduzido nº de espermátides.	2. Reduzido número de espermátides	2. Fibrose
1. Testículo adulto	3. Homogêneo, parada de maturação em espermátocito primário (CGA – espermátocito 1º)	3. CGA - espermátocito	3. Agregação de células de Leydig
1. Testículo adulto	4. Homogêneo, somente espermatogônia+célula de Sertoli	4. Somente espermatogônia+ célula de Sertoli	4. Aplasia de células de Leydig
1. Testículo adulto	5. Homogêneo, síndrome das células de Sertoli (SCO)	5. SCO	5. Microlitíase (corpos hialinos)
1. Testículo adulto	6. Heterogêneo, espermatogênese normal reduzido nº de espermátides	6. Túbulos hialinizados	6. Granuloma
1. Testículo adulto	7. Heterogêneo, (CGA – espermátocito 1º)	7. Túbulos indiferenciados	7. Infiltração linfocítica+ agregação de células de Leydig
1. Testículo adulto	9. Heterogêneo – SCO	9. SCO (típico de Klinefelter)	9. Túbulos indiferenciados
2 Pré-púbere/gônada fetal	1. Homogêneo, número normal de gonócitos	1. Somente espermátocitos imaturas	1. Infiltração linfocítica
2. Pré-púbere/gônada fetal	3. Homogêneo, número reduzido de gonócitos	2. Presença de espermátocitos	2. Fibrose
2. Pré-púbere/gônada fetal	3. Homogêneo, sem células germinativas	3. Espermátides alongadas em único túbulo	3. Agregação de células de Leydig
3 Pré-púbere/gônada fetal	4. Heterogêneo, esporádicas células germinativas	4. Oócitos ou primários folículos presentes	4. Aplasia de células de Leydig
2. Pré púbere/gônada fetal	5. Tecido ovariano ou com estruturas semelhantes	5. 1+5 ou 2+5	5. Corpos hialinos (microlitíase)
2. Pré púbere/gônada fetal	6. “Traços” gonadais	6. Túbulos hialinizados	6. Granuloma
2. Pré púbere/gônada fetal	7. “ovotestis”	7. Gonócitos presentes	7. 1+3
2. Pré púbere/gônada fetal	8. Outros	8. Fenótipo de Klinefelter	8. 3+5
3. CIS ou outra neoplasia	1. Adulto, somente CIS	1. Ausência de invasão	1. Infiltração linfocítica

Dígito I Tipo de testículo	Dígito II Padrão histológico de maior prevalência	Dígito III Segundo padrão histológico mais prevalente	Dígito IV Anormalidades e características adicionais
3. CIS ou outra neoplasia	2. Adulto, CIS e espermatogênese	2. Micro invasão em tecido testicular	2. Fibrose
3. CIS ou outra neoplasia	3. CIS, padrão pré-natal	3. Invasão à rede testicular	3. Agregação de células de Leydig
3. CIS ou outra neoplasia	4. CIS, padrão pré-natal	4. Presença de tecido atrófico	4. Aplasia de células de Leydig
3. CIS ou outra neoplasia	5. Gonadoblastoma	5. Somente tumor de células indiferenciadas	5. Corpos hialinos (microlitíase)
3. CIS ou outra neoplasia	6. Tumor de células germinativas micro invasivo	6. Túbulos indiferenciados (células de Sertoli)	6. Granuloma
3. CIS ou outra neoplasia	7. Tumor ou adenoma de células de Leydig	7. Túbulos hialinizados	7. 1+3
3. CIS ou outra neoplasia	8. Tumor de células de Leydig	8. Necrose	8. 3+5
3. CIS ou outra neoplasia	9. Linfoma ou infiltração leucocitária	9. Semelhantes a estruturas ovarianas	9. Túbulos indiferenciados
0. Outro	0. Outro	0. Outro	0. Outro
Outros tipos de tecido	E-S (Epidídimo (espermatozoides visíveis)		
Outros tipos de tecido	E-S (Epidídimo (sem espermatozoides visíveis)		
Outros tipos de tecido	Tecido conectivo/tecido gorduroso		

SCO: do inglês “*Sertoli Cell Only*”, que quer dizer “Síndrome das Células de Sertoli”. CGA: corresponde a “Arrest Germ Cell”, que significa “Parada de Maturação de Células Germinativas”. CIS: Carcinoma *in situ*.

As Figuras 26 a 32 referem-se à fotomicrografias de biópsias testiculares dos pacientes estudados e ilustram cada índice de Copenhague descrito:

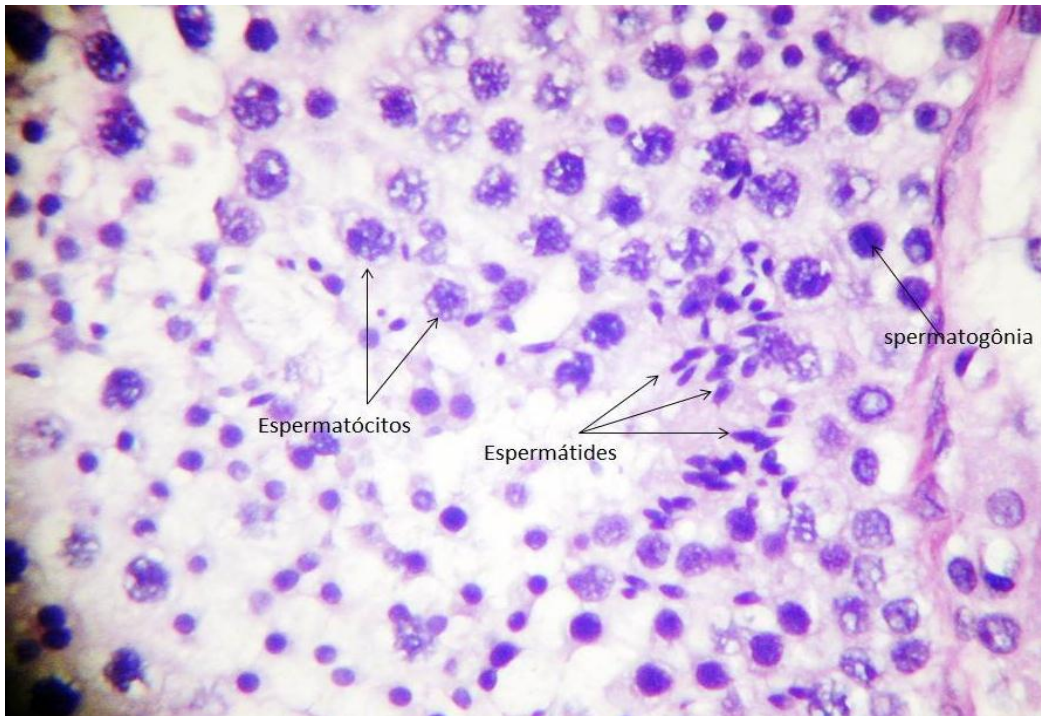


Figura 26: Índice de Copenhagen 1.1.1.0. Aumento: 400 x. Coloração HE. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.

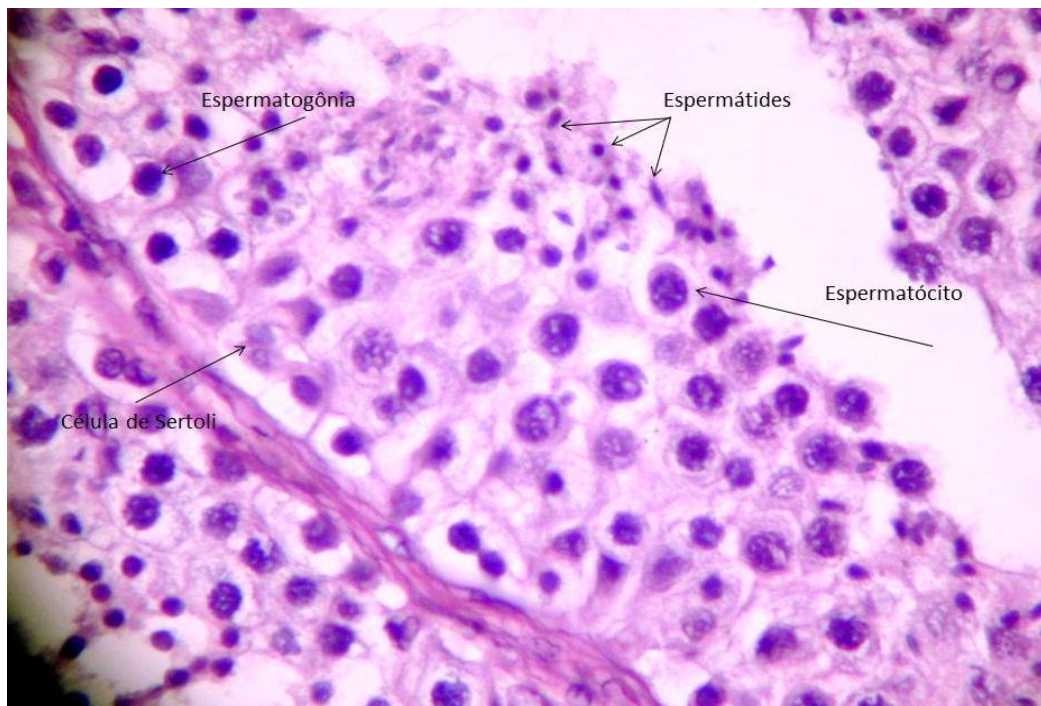


Figura 27: Índice de Copenhagen 1.2.2.0. Aumento: 400 x. Coloração HE. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.



Figura 28: Índice de Copenhagen 1.3.3.0. Aumento: 400 x. Coloração HE. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.

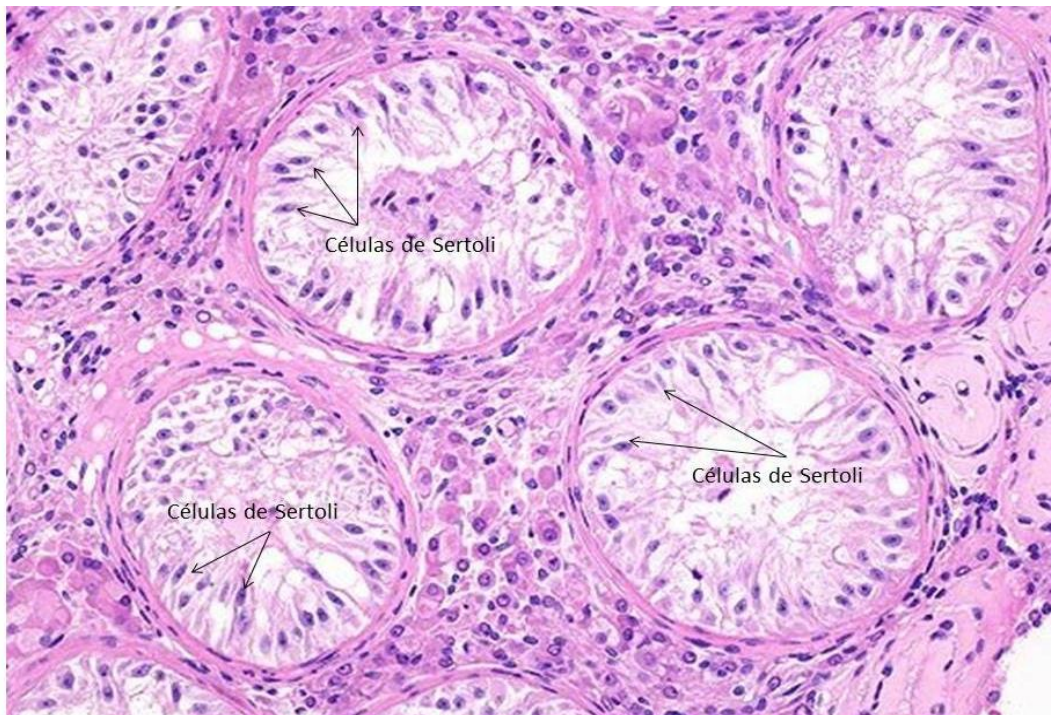


Figura 29: Índice de Copenhagen 1.5.5.0. Aumento: 250 x. Coloração HE. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.



Figura 30: Índice de Copenhagen 1.6.3.0. Aumento: 400 x. Coloração HE. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.

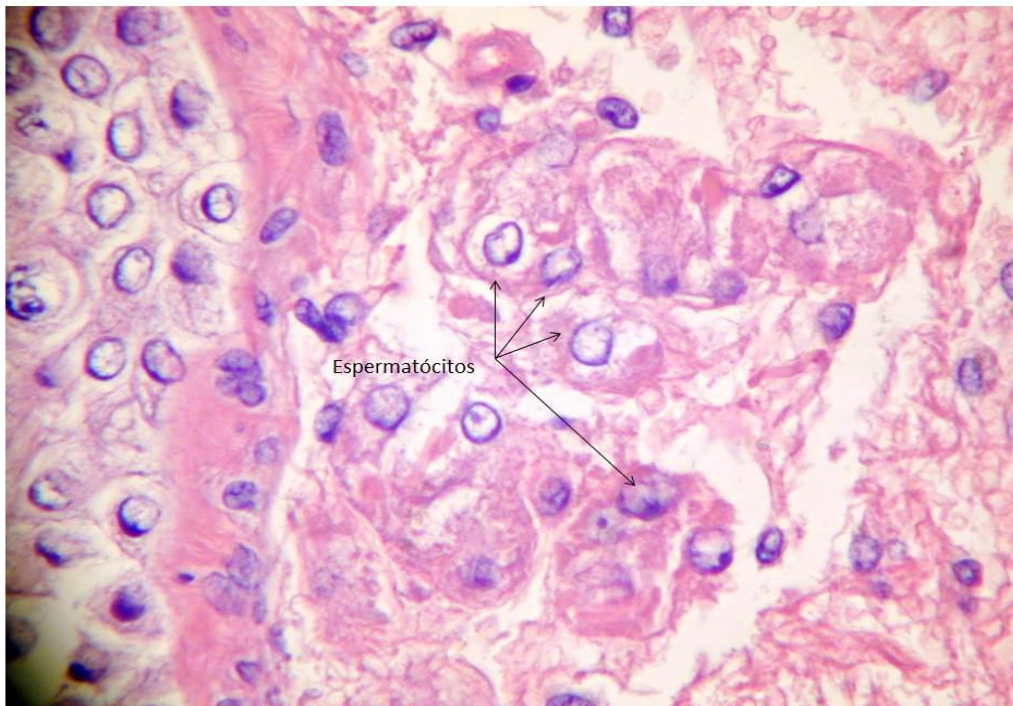


Figura 31: Índice de Copenhagen 1.7.2.0. Aumento: 400 x. Coloração HE. Imagem cedida pela clínica Dr. Jorge Hallak.



FONTE: McLachlan RI, 2007.

Figura 32: Índice de Copenhagen evidenciando padrão histológico heterogêneo. Aumento: 400 x. Coloração HE.

Um dos grandes desafios no tratamento cirúrgico da varicocele é a identificação dos indivíduos que apresentarão maior benefício com o tratamento. Os padrões histológicos em infertilidade masculina são ainda pouco estudados, devido ao fato da biópsia testicular não fazer parte dos algoritmos diagnósticos de avaliação da infertilidade masculina, devido aos abusos do método no passado associado a falhas na interpretação dos dados e devido à ausência de padronização na avaliação histológica das peças. Recentemente, relatos na literatura vêm tentando correlacionar determinados tipos de padrão histológico com os benefícios provenientes da correção cirúrgica de varicocele, porém os dados são ainda inconsistente⁴¹⁻⁴⁵. Assim sendo, se faz necessária a determinação de um padrão histológico testicular com valor prognóstico da melhora da capacidade reprodutiva de homens com varicocele candidatos à correção microcirúrgica.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar padrões histológicos testiculares como valor prognóstico da melhora da capacidade reprodutiva de pacientes submetidos à varicocelectomia microcirúrgica.

2.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer valores de corte (*cut-offs*) que determinam a melhora do potencial reprodutivo de homens com diagnóstico de varicocele clínica e subclínica.
- Avaliar a evolução dos parâmetros seminais obtidos após varicocelectomia.
- Comparar a evolução da qualidade seminal entre o grupo de pacientes acometidos por varicocele clínica e subclínica.

3. MÉTODOS

3.1. Desenho do Estudo

Nesse estudo retrospectivo, foram analisadas biópsias testiculares de 60 homens inférteis atendidos em clínica especializada de fertilidade masculina e saúde do homem, entre os anos de 2006 e 2014. As amostras foram obtidas durante o procedimento de varicocelectomia microcirúrgica e logo em seguida encaminhadas ao laboratório de apoio de anatomia patológica onde se realizaram as análises histológicas.

Como critérios de inclusão foram considerados homens inférteis com diagnóstico de varicocele clínica e subclínica entre 19 e 50 anos de idade com resultados de análise histopatológica testicular. Todos os pacientes avaliados apresentaram análise seminal prévia à varicocelectomia e ao menos uma análise seminal após 3 meses de pós-operatório não ultrapassando 12 meses. Os sujeitos de pesquisa foram divididos em dois grupos:

Grupo 1: homens com diagnóstico de varicocele subclínica (n = 20)

Grupo 2: homens com diagnóstico de varicocele clínica (n =40).

Foram excluídos do estudo homens com diagnóstico de criptorquidia, azoospermia obstrutiva e não-obstrutiva, ejaculação retrógrada, usuários de drogas e anabolizantes, pacientes portadores de doenças sexualmente transmissíveis e de neoplasias no trato geniturinário.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética e pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo – FMUSP sob o número 047/12, com termo de consentimento livre e esclarecido assinado por todos os participantes.

Os parâmetros avaliados consistiram de análise física e clínica, análise histológica, análise seminal e laboratorial.

3.2 Local do Estudo

As avaliações clínicas e as análises seminais foram realizadas na Androscience - Clínica e Laboratório de Referência em Andrologia, Criopreservação e Reprodução Masculina. Os exames laboratoriais foram realizados em laboratórios clínicos selecionados livremente pelos próprios pacientes em estabelecimentos que atendem aos requisitos básicos de qualidade. Quanto às análises histológicas, estas foram realizadas pela patologista Dra. Kátia Ramos Moreira Leite.

3.3 Exame Físico e clínico

Todos os participantes foram submetidos ao exame físico urológico, realizado pelo mesmo examinador em sala aquecida. A presença de varicocele foi avaliada pela palpação testicular bilateral com o paciente em posição ortostática e por meio de ultrassonografia com Doppler colorido com o paciente em decúbito dorsal. O volume testicular foi obtido automaticamente por meio do resultado da ultrassonografia e gerado em mL, conforme a equação elipsoide ($\text{largura} \times \text{altura} \times \text{comprimento} \times 0,52$), sendo avaliada adicionalmente a consistência dos testículos. A varicocele foi clinicamente classificada em grau I quando houve dilatação das veias do plexo pampiniforme palpável apenas mediante a manobra de Valsava. O grau II foi considerado mediante a presença de dilatação sem o uso da manobra de Valsava durante a palpação. A varicocele grau III foi considerada mediante dilatação volumosa do plexo pampiniforme, visível a olho nu. Quando o refluxo venoso foi auscultado por meio do Doppler-estetoscópio e confirmado por Doppler colorido a varicocele foi considerada subclínica.

3.4 Análise seminal

As análises seminais foram colhidas por masturbação em frascos estéreis e atóxicos e todos os parâmetros avaliados e de interpretação, foram realizados em conformidade com a Organização Mundial de Saúde (OMS, 1999 e 2010)⁴⁶. Quando possível, estas foram realizadas, a cada 3 meses, após varicocelectomia microcirúrgica, compreendendo um período total de 12 meses de acompanhamento. Foi mantida a abstinência sexual entre 2 a 5 dias. A avaliação foi dividida em macroscópica e microscópica conforme a descrição a seguir:

3.4.1 Avaliação macroscópica

3.4.1.1 Volume

O volume do sêmen (mL) foi medido por meio de aspiração de todo o conteúdo do ejaculado através de pipeta graduada.

3.4.1.2 pH

A determinação do pH foi realizada utilizando-se papel medidor de pH (faixa entre 6,1 a 10).

3.4.1.3 Liquefação e viscosidade

As amostras foram acondicionadas em uma estufa de CO₂, à temperatura de 37°C, por até 30 minutos, para que se obtivesse o tempo de liquefação seminal. Para a averiguação da viscosidade (normal ou anormal), uma pequena amostra de sêmen foi

aspirada, utilizando-se pipeta “Pasteur” estéril, e observada a extensão do filamento formado após gotejamento. Se o filamento fosse maior que 2 cm, a amostra foi considerada com viscosidade anormal.

3.4.2 Avaliação microscópica

A avaliação microscópica foi realizada após homogeneização da amostra com o uso do agitador de tubos vórtex (modelo AP 56, Cole-Parmer, São Paulo, Brasil) em velocidade média durante 5 segundos.

3.4.2.1 Concentração espermática

A concentração espermática foi determinada em câmara de Makler (Mid Atlantic Diagnostics, Laoreal, EUA), sendo utilizada alíquota de 5 μ l de amostra e coberta por lamínula reticulada, apropriada para a câmara em questão. Foi contado o número de espermatozoides móveis e imóveis presentes em três fileiras não consecutivas, contendo 10 quadrados cada uma, utilizando-se microscópio de contraste de fase (Nikon- aumento: 200 x). A concentração espermática foi determinada pela média das três fileiras, expressa em milhões de espermatozoides por mL de sêmen (10^6 /mL).

$$\text{Concentração espermática} = (10^6/\text{mL}) = \text{N}^\circ \text{ de espermatozoides móveis} + \text{imóveis}$$

3.4.2.2 Número total de espermatozoides

O número total de espermatozoides no ejaculado foi determinado pela multiplicação da concentração espermática em milhões por mL pelo volume total da amostra. O valor é descrito em milhões ($\times 10^6$).

$$\text{N}^\circ \text{ total de espermatozoides} (\times 10^6) = \text{concentração espermática} \times \text{volume seminal}$$

3.4.2.3 Motilidade Espermática

Foram avaliadas a motilidade quantitativa e qualitativa. A motilidade quantitativa foi realizada utilizando-se a já referida câmara de Makler e microscópio de contraste de fase (aumento: 200 x). Uma alíquota de 5µl da amostra foi adicionada na câmara sob lamínula e realizada a avaliação de 100 espermatozoides. Este mesmo procedimento foi repetido uma vez, e nos casos de diferença superior a 10%, uma terceira avaliação foi realizada. A média das duas avaliações foi utilizada no cálculo da motilidade. O valor final foi definido pela multiplicação do número de espermatozoides móveis por 100, dividido pela concentração espermática. O resultado foi expresso em porcentagem.

$$\text{Motilidade espermática (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides móveis} \times 100}{\text{N}^\circ \text{ de espermatozoides móveis} + \text{imóveis}}$$

Quanto à motilidade qualitativa, os mesmos espermatozoides utilizados na avaliação quantitativa foram distribuídos nas categorias A, B e C de acordo com o grau de movimentação descrito a seguir:

- Grau A: espermatozoides móveis com progressão rápida;
- Grau B: espermatozoides móveis com progressão lenta;
- Grau C: espermatozoides móveis sem progressão;
- Grau D: espermatozoides imóveis.

A motilidade total foi calculada a partir da soma das porcentagens de espermatozoides grau A, B e C. No que se refere especificamente à motilidade progressiva, esta foi determinada pela soma dos graus A e B, conforme o critério estabelecido pela OMS.

3.4.2.4 Morfologia espermática

O primeiro procedimento realizado na avaliação da morfologia espermática foi a confecção do esfregaço seminal. Após a secagem à temperatura ambiente, o esfregaço

foi corado utilizando-se o kit de coloração Panótico rápido, seguindo as instruções do fabricante. Duzentas células espermáticas foram avaliadas utilizando-se microscopia confocal (aumento: 1000 x). A classificação morfológica foi realizada seguindo os critérios estabelecidos pela OMS. Tais critérios consideram o espermatozoide normal quando o mesmo tem um comprimento médio cefálico entre 4 a 5 μm de comprimento e uma largura média entre 2,5 a 3,5 μm , sem apresentar defeitos grosseiros na cauda e peça intermediária. Os valores de referência utilizados na análise seminal foram baseados no manual da OMS de 1999 e 2010, em virtude de a maioria dos sujeitos de pesquisa terem participado do estudo após a criação desta nova diretriz (Anexo 2).

3.5 Análises laboratoriais

As análises laboratoriais compreenderam as dosagens séricas de hormônio folículo estimulante (FSH – mUI/mL) e hormônio luteinizante (LH - mUI/mL). Os pacientes foram orientados previamente a não praticarem atividade física antes da coleta e evitarem situações de estresse e fadiga. Os resultados foram encaminhados ao médico examinador, o qual fez o registro dos mesmos. Os exames laboratoriais foram realizados até 30 dias antes do procedimento cirúrgico de reparo da varicocele e 90 dias após cirurgia.

3.6 Análise histopatológica

Os fragmentos testiculares foram obtidos bilateralmente durante a realização da varicocelectomia microcirúrgica e encaminhadas ao laboratório de anatomia patológica fixadas em solução de Bouin e formalina imediatamente à extração. Em seguida, o material colhido foi incluído em parafina e cortado em micrótomo com espessura de 4 μm para inserção em lâminas de vidro adequadas para microscopia. Foi utilizado hematoxilina-eosina como corante histológico, permitindo-se, assim, uma adequada visualização das células espermatozóides.

Na avaliação microscópica, a amostra foi considerada satisfatória se ao menos 30 túbulos seminíferos fossem passíveis de visualização e contagem celular.

Para a obtenção do *score* de Johnsen, a análise foi realizada em microscopia óptica comum (aumento:100 x). Nos casos de dúvidas de identificação celular, utilizaram-se aumentos de maior magnitude. Para a determinação final do *score*, multiplicou-se o número de túbulos contados com seus respectivos scores. Em seguida, dividiu-se o resultado pelo número de túbulos avaliados, obtendo-se desse modo o resultado final.

Para a determinação do índice de Copenhagen, foi utilizada microscopia óptica comum, (aumento:100 x), avaliando-se em média 10 a 30 túbulos seminíferos, conforme preconização de Skakkebaek e Heller, 1973.⁴⁷ O resultado final do índice foi dado em quatro dígitos, conforme o padrão histológico encontrado nos túbulos (Quadro 1). A característica dos túbulos foi avaliada e considerada homogênea, quando todos os túbulos analisados apresentaram padrão histológico uniforme. Na presença de duas ou mais características histológicas diferentes no mesmo testículo, os aspecto tubular foi considerado heterogêneo. O diâmetro tubular foi avaliado, bem como a presença e ausência de lúmen e fibrose. Foi realizada avaliação minuciosa para a identificação das células espermatogênicas: espermatogônias, espermatócitos primários e secundários, espermatídes redondas, alongadas e espermatozoides. Em casos de interrupção da espermatogênese em algum estágio específico, foi utilizado o termo “parada de maturação”. Mediante a completa ausência de células germinativas e com visualização apenas de células de Sertoli, o termo “síndrome das células de Sertoli” foi empregado.

3.7 Análise Estatística

Para a busca do padrão histológico com valor prognóstico preditivo da melhora da capacidade reprodutiva, a análise foi realizada por meio de curvas ROC (do inglês: “*Receiver Operating Characteristic*”⁴⁸). Dessa forma, procurou-se estabelecer um ponto de corte sensível e específico envolvendo os valores da análise seminal, com os resultados dos *scores* de Johnsen, índices de Copenhagen, dosagens séricas de FSH e LH. Como critério para a determinação do referido ponto de corte,

foi utilizado a razão de verossimilhança: proporção de positivos verdadeiros (sensibilidade) para falsos positivos (especificidade).

A análise temporal do sêmen foi avaliada primeiramente através da correlação entre as variáveis em questão e o tempo em que ocorreram as medidas, a saber: 0, 3, 6 e 12 meses. Essa análise foi feita usando a estatística R de Pearson. Além disso, cada variável dessas foi ajustada a uma reta, e foram calculados tanto o coeficiente angular quanto o valor de intersecção no eixo das ordenadas. Para saber se duas curvas se comportam de maneira diferente, as estatísticas referentes ao slope foram comparadas entre si.

Na comparação entre dois grupos quando realizada, foi utilizado o teste *t* de *Student* pareado. Para análises de contingência (contagem de variáveis categóricas) foi utilizado o teste de Qui-quadrado. Para a construção de tabelas de distribuição de frequências foi utilizado a estatística Z de Pearson avaliando-se as proporções.

Os dados são apresentados como média \pm erro padrão. Todos os dados foram armazenados e analisados utilizando-se os programas GraphPad Prism 6 e Microsoft Excel 2007. Adotou-se nível de significância de $p < 0,05$ para todas as análises.

4 RESULTADOS

4.1. Perfil Físico e clínico

A média de idade dos pacientes do grupo 1 foi $32 \pm 7,3$ e a do grupo 2, $33 \pm 7,1$. A média do volume testicular direito dos indivíduos do grupo 2 foi discretamente maior quando comparada aos do grupo 1. Do lado esquerdo, entretanto, o mesmo evento não foi observado (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuição de frequência (bilateral) envolvendo idade e volume testicular.

	Grupo 1		Grupo 2	
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
Idade	32,1	7,3	33,2	7,1
Volume testicular direito (mL)	14,3	5,3	15,4	5,7
Volume testicular esquerdo (mL)	14,9	5,7	14,8	4,8

Grupo 1: pacientes com varicocele subclínica (n=20). Grupo 2: pacientes com varicocele clínica (n=40).

Na avaliação da frequência dos graus de varicocele, a Tabela 2 apresenta bilateralmente os resultados obtidos. No grupo 1, ambos os testículos foram acometidos por varicocele subclínica, todavia, observou-se entre os participantes do grupo 2, a frequência de maiores graus de varicocele na gônada esquerda.

Tabela 2. Distribuição de frequência bilateral referente aos graus de varicocele em ambos os grupos estudados.

	Testículo direito	Testículo Esquerdo
Varicocele subclínica	20	20
Varicocele Grau I	18	16
Varicocele Grau II	1	14
Varicocele Grau III	0	7
Ausência de varicocele	1	0

No grupo de pacientes com varicocele clínica, o grau I obteve a maior frequência, seguida dos graus II e III, sobretudo no testículo esquerdo.

4.2 Resultados histológicos e laboratoriais

4.2.1 Resultados histológicos dos índices de Copenhagen

Os resultados histológicos referentes aos índices de Copenhagen nos dois grupos estudados variaram de “1.1.1.0 até “1.9.2.0”. Este primeiro índice, representa túbulos seminíferos com atividade espermatogênica normal e o segundo, refere-se a túbulos com hialinização tubular. À medida que os algarismos tornam-se crescentes, estes, representam piores prognósticos reprodutivos. As Tabelas 3 e 4 demonstram a distribuição de frequência dos resultados obtidos nos grupos 1 e 2.

Tabela 3. Distribuição de frequências dos resultados dos índices de Copenhagen em pacientes com varicocele subclínica bilateral – grupo 1.

Resultados	Frequência absoluta		Frequência relativa		Diferença absoluta	P valor
	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo		
1.1.1.0	8	8	40,0%	40,0%	0,0%	1,0000
1.2.2.0	5	4	25,0%	20,0%	5,0%	0,7044
1.3.3.0	1	2	5,0%	10,0%	5,0%	0,5465
1.5.5.0	1	1	5,0%	5,0%	0,0%	1,0000
1.6.3.0	4	4	20,0%	20,0%	0,0%	1,0000
1.7.2.0	1	1	5,0%	5,0%	0,0%	1,0000
1.9.2.0	0	0	0,0%	0,0%	0,0%	-
Total	20	20	100%	100%		

Para comparação entre cada frequência foi usada a estatística Z de Pearson para proporções. Não houve nenhum caso de diferença significativa ($P < 0,05$).

Tabela 4. Distribuição de frequências dos resultados dos índices de Copenhagen em pacientes com varicocele clínica bilateral - grupo 2.

Resultados	Frequência absoluta		Frequência relativa		Diferença absoluta	P valor
	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo		
1.1.1.0	16	15	40,0%	37,5%	2,5%	0,8184
1.2.2.0	8	8	20,0%	20,0%	0,0%	1,0000
1.3.3.0	2	3	5,0%	7,5%	2,5%	0,6437
1.5.5.0	0	1	0,0%	2,5%	2,5%	0,3112
1.6.3.0	6	6	15,0%	15,0%	0,0%	1,0000
1.7.2.0	6	6	15,0%	15,0%	0,0%	1,0000
1.9.2.0	2	1	5,0%	2,5%	2,5%	0,5553
Total	40	40	100%	100%		

Para comparação entre cada frequência foi usada a estatística Z de Pearson para proporções. Não houve nenhum caso de diferença significativa ($P < 0,05$).

A avaliação da distribuição de frequência relativa dos índices de Copenhagen mostrou que o índice “1.1.1.0” obteve maior predomínio entre os participantes do grupo 1 (40% bilateral), seguido pelo índice “1.2.2.0” (25% no testículo direito e 20% no testículo esquerdo). Resultados semelhantes foram observados no grupo 2, nos quais o índice “1.1.1.0” obteve predomínio de 40% no testículo direito e 37,5% no testículo esquerdo. Adicionalmente o índice “1.2.2.0” alcançou frequência relativa de 20% bilateral. Ambos os resultados histológicos de Copenhagen se referem a um padrão histológico testicular homogêneo, o primeiro representando espermatogênese normal e o segundo se referindo a um reduzido número de espermátides. Entretanto, na comparação da qualidade histológica entre testículo direito e esquerdo em cada grupo estudado não foi observado diferenças significativamente estatísticas. De modo complementar, quando os resultados histológicos do grupo 1 foram comparados aos resultados do grupo 2, não obteve-se diferença ($P < 0,05$), sugerindo portanto, que a histologia testicular do grupo com varicocele subclínica é a mesma do grupo com varicoceles palpáveis (Tabelas 5 e 6).

Tabela 5. Comparação da distribuição de frequências dos resultados índices de Copenhagen em pacientes com varicocele clínica e subclínica – grupos 1 e 2 (lado direito).

Índices	Frequência absoluta		Frequência relativa		Diferença absoluta	P valor
	Subclínica	Clínica	Subclínica	Clínica		
1.1.1.0	8	16	40,0%	40,0%	0,0%	1,0000
1.2.2.0	5	8	25,0%	20,0%	5,0%	0,6655
1.3.3.0	1	2	5,0%	5,0%	0,0%	1,0000
1.5.5.0	1	0	5,0%	0,0%	5,0%	0,3049
1.6.3.0	4	6	20,0%	15,0%	5,0%	0,6364
1.7.2.0	1	6	5,0%	15,0%	10,0%	0,1800
1.9.2.0	0	2	0,0%	5,0%	5,0%	0,1468
Total	20	40	100%	100%		

Para comparação entre cada frequência foi usada a estatística Z de Pearson para proporções. Não houve nenhum caso de diferença significativa ($P < 0,05$)

Tabela 6. Comparação da Distribuição de frequências dos índices de Copenhagen em pacientes com varicocele clínica e subclínica – grupos 1 e 2 (lado esquerdo).

Índices	Frequência absoluta		Frequência relativa		Diferença absoluta	P valor
	Subclínica	Clínica	Subclínica	Clínica		
1.1.1.0	8	15	40,0%	37,5%	2,5%	0,8516
1.2.2.0	4	8	20,0%	20,0%	0,0%	1,0000
1.3.3.0	2	3	10,0%	7,5%	2,5%	0,7515
1.5.5.0	1	1	5,0%	2,5%	2,5%	0,6472
1.6.3.0	4	6	20,0%	15,0%	5,0%	0,6364
1.7.2.0	1	6	5,0%	15,0%	10,0%	0,1800
1.9.2.0	0	1	0,0%	2,5%	2,5%	0,3112
Total	20	40	100%	100%		

Para comparação entre cada frequência foi usada a estatística Z de Pearson para proporções. Não houve nenhum caso de diferença significativa ($P < 0,05$)

4.2.2 Resultados histológicos dos *scores* de Johnsen

A avaliação dos resultados histológicos de Johnsen por meio da distribuição de frequências mostrou grande similaridade entre os grupos 1 e 2. O *scores* de maior predomínio entre os indivíduos estudados foram os *scores* 10, 9 e 8. No testículo direito o grupo 1 obteve 35% de frequência relativa referente ao *score* 10; 30% referente ao *score* 9 e 15% referente ao *score* 8. Na gônada esquerda obtiveram-se os seguintes percentuais: 38,9%; 33,3% e 11,1% respectivamente. O grupo 2 apresentou 40% de resultados com *score* 10 no testículo direito e 37,8% contralateral. Referente ao *score* 9, obteve-se 30% no testículo direito e 32,5% no testículo esquerdo. Quanto ao *score* 8, o referido grupo obteve 12,5% bilateral. As Tabelas 7 e 8 apresentam todas as distribuições de frequência inerentes aos resultados histológicos de Johnsen em ambos os grupos.

Tabela 7. Distribuição de frequências dos resultados dos *scores* de Johnsen em pacientes com varicocele subclínica bilateral – grupo 1.

<i>Scores</i>	Frequência absoluta		Frequência relativa		Diferença absoluta	<i>P</i> valor
	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo		
10	7	7	35,0%	38,9%	3,9%	0,8041
9	6	6	30,0%	33,3%	3,3%	0,8255
8	3	2	15,0%	11,1%	3,9%	0,7210
7	1	0	5,0%	0,0%	5,0%	0,3049
6	1	1	5,0%	5,6%	0,6%	0,9391
5	1	1	5,0%	5,6%	0,6%	0,9391
4	0	0	0,0%	0,0%	0,0%	-
3	0	0	0,0%	0,0%	0,0%	-
2	1	1	5,0%	5,6%	0,6%	0,9391
1	0	0	0,0%	0,0%	0,0%	-
Total	20	18	100%	100%		

Para comparação entre cada frequência foi usada a estatística Z de Pearson para proporções. Não houve nenhum caso de diferença significante ($P < 0,05$).

Tabela 8. Distribuição de frequências dos resultados dos *scores* de Johnsen em pacientes com varicocele clínica bilateral – grupo 2.

<i>Scores</i>	Frequência absoluta		Frequência relativa		Diferença absoluta	<i>P</i> valor
	Direito	Esquerdo	Direito	Esquerdo		
10	16	15	40,0%	37,5%	2,5%	0,8184
9	12	13	30,0%	32,5%	2,5%	0,8093
8	5	5	12,5%	12,5%	0,0%	1,0000
7	1	2	2,5%	5,0%	2,5%	0,5553
6	1	0	2,5%	0,0%	2,5%	0,3112
5	2	3	5,0%	7,5%	2,5%	0,6437
4	2	1	5,0%	2,5%	2,5%	0,5553
3	1	0	2,5%	0,0%	2,5%	0,3112
2	0	1	0,0%	2,5%	2,5%	0,3112
1	0	0	0,0%	0,0%	0,0%	-
Total	40	40	100%	100%		

Para comparação entre cada frequência foi usada a estatística Z de Pearson para proporções. Não houve nenhum caso de diferença significativa ($P < 0,05$).

Na comparação da qualidade histológica entre os grupos 1 e 2 envolvendo especificamente os *scores* de Johnsen, não foi observada nenhuma diferença significativamente estatística ($P < 0,05$) em ambos os testículos, o que vale dizer que a histologia testicular entre pacientes com varicocele clínica e subclínica é equivalente. As Tabelas 9 e 10 e também a Figura 33 expressam tais resultados.

Tabela 9. Comparação da distribuição de frequências dos resultados dos *scores* de Johnsen em pacientes com varicocele clínica e subclínica – grupos 1 e 2 (lado direito).

<i>Scores</i>	Frequência absoluta		Frequência relativa		Diferença absoluta	<i>P</i> valor
	Subclínica	Clínica	Subclínica	Clínica		
10	7	16	35,0%	40,0%	5,0%	0,7044
9	6	12	30,0%	30,0%	0,0%	1,0000
8	3	5	15,0%	12,5%	2,5%	0,7934
7	1	1	5,0%	2,5%	2,5%	0,6472
6	1	1	5,0%	2,5%	2,5%	0,6472
5	1	2	5,0%	5,0%	0,0%	1,0000
4	0	2	0,0%	5,0%	5,0%	0,1468
3	0	1	0,0%	2,5%	2,5%	0,3112
2	1	0	5,0%	0,0%	5,0%	0,3049
1	0	0	0,0%	0,0%	0,0%	-
Total	20	40	100%	100%		

Para comparação entre cada frequência foi usada a estatística Z de Pearson para proporções. Não houve nenhum caso de diferença significativa ($P < 0,05$).

Tabela 10. Comparação da distribuição de frequências dos resultados dos *scores* de Johnsen em pacientes com varicocele clínica e subclínica – grupos 1 e 2 (lado esquerdo).

<i>Scores</i>	Frequência absoluta		Frequência relativa		Diferença absoluta	<i>P</i> valor
	Subclínica	Clínica	Subclínica	Clínica		
10	7	15	38,9%	37,5%	1,4%	0,9170
9	6	13	33,3%	32,5%	0,8%	0,9484
8	2	5	11,1%	12,5%	1,4%	0,8740
7	0	2	0,0%	5,0%	5,0%	0,1468
6	1	0	5,6%	0,0%	5,6%	0,2781
5	1	3	5,6%	7,5%	1,9%	0,7683
4	0	1	0,0%	2,5%	2,5%	0,3112
3	0	0	0,0%	0,0%	0,0%	-
2	1	1	5,6%	2,5%	3,1%	0,5910
1	0	0	0,0%	0,0%	0,0%	-
Total	18	40	100%	100%		

Para comparação entre cada frequência foi usada a estatística Z de Pearson para proporções. Não houve nenhum caso de diferença significativa ($P < 0,05$).

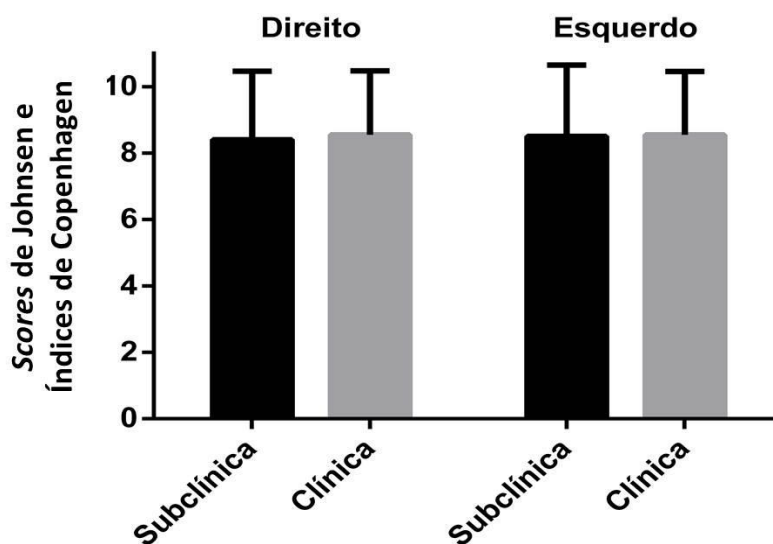


Figura 33: Comparação da qualidade histológica entre os grupos com varicocele clínica e subclínica envolvendo os *scores* de Johnsen e os índices de Copenhagen.

4.2.3 Resultados laboratoriais

Os resultados laboratoriais avaliados no estudo se referem às dosagens séricas das gonadotrofinas. A dosagem de FSH obteve média de $6,2 \pm 4,6$ mUI/mL entre os participantes do grupo 1 e $5,5 \pm 3,1$ mUI/mL entre os indivíduos do grupo 2. Na dosagem de LH, entretanto, obteve-se média de $4,6 \pm 2,7$ mUI/mL em ambos os grupos. Os resultados estão demonstrados na Tabela 11.

Tabela 11. Distribuição de frequência (média e desvio padrão) das dosagens séricas de FSH e LH.

	Grupo 1		Grupo 2	
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
FSH (mUI/mL)	6,2	4,6	5,5	3,1
LH (mUI/mL)	4,6	2,7	4,6	2,7

* As dosagens das gonadotrofinas foram realizadas previamente à correção microcirúrgica da varicocele.

4.3. Identificação de um padrão histológico testicular como valor prognóstico da melhora da capacidade reprodutiva de pacientes com varicocele subclínica - grupo 1.

Para a identificação do padrão histológico com valor prognóstico preditivo positivo da capacidade reprodutiva, foram estabelecidos valores de corte que associam os *scores* de Johnsen, os índices de Copenhagen e o volume testicular à melhora dos parâmetros seminiais. Semelhantemente, foram criados valores de corte preditivos, a partir das dosagens séricas de FSH e LH. Em outras palavras, através da criação dos pontos de corte, foi possível estimar qual *score* de Johnsen, qual índice de Copenhagen e quais dosagens hormonais o paciente deve apresentar para obter melhora da capacidade reprodutiva (Tabela 12).

Tabela 12. Determinação dos valores de corte do grupo 1, referente aos parâmetros concentração, motilidade e morfologia de espermatozoides em função dos *scores* de Johnsen, índices de Copenhagen, volume testicular e dosagens de FSH, LH.

	Valor de corte Johnsen	Valor de corte Copenhagen II	Valor de corte Copenhagen III	Valor de corte volume testicular	Valor de corte FSH	Valor de corte LH
	Direito/Esquerdo	Direito/Esquerdo	Direito/Esquerdo	Direito/Esquerdo	.	.
Concentração	>7,4 / >8,2	0 / 0	0 / 0	>12,8 / 0	0	0
Sensibilidade (%)	37,5 / 50,0	0 / 0	0 / 0	75,0 / 0	0	0
Especificidade (%)	91,6 / 91,6	0 / 0	0 / 0	90,0 / 0	0	0
<i>p</i> valor	0,05/ 0,04*	0 / 0	0 / 0	0,04* / 0	0	0
Motilidade T	>8,2 / >8,2	<2,5 / <2,5	<2,5 / 0	>12,0 / 0	0	0
Sensibilidade (%)	55,5 / 44,4	55,5 / 66,6	33,3 / 0	55,0 / 0	0	0
Especificidade (%)	90,9 / 90,9	81,8 / 81,8	92,3 / 0	90,0 / 0	0	0
<i>p</i> valor	0,01* / 0,02*	0,04* / 0,03*	0,06 / 0	0,07/ 0	0	0
Motilidade P	>9,1 / >9,1	<2,5 / <2,5	<1,5 / 0	>13,6 / 0	0	0
Sensibilidade (%)	76,9 / 76,9	46,1 / 53,8	73,3 / 0	66,6 / 0	0	0
Especificidade (%)	71,4 / 71,7	85,7 / 85,7	66,6 / 0	85,7 / 0	0	0
<i>p</i> valor	0,02* / 0,03*	0,07/ 0,06	0,03* / 0	0,06/ 0	0	0
Morfologia	>7,9 / >7,0	0 / < 4,0	0 / 0	>13,6 / >11,3	0	0
Sensibilidade (%)	50,0 / 37,0	0 / 50,0	0 / 0	62,5 / 50,0	0	0
Especificidade (%)	91,6 / 91,6	0 / 85,7	0 / 0	90,9 / 90,9	0	0
<i>p</i> valor	0,03* / 0,08	0 / 0,03*	0 / 0	*0,03 / 0,06	0	0

(*) Representa significância estatística ($p < 0,05$).

No grupo 1, foram obtidos valores de corte envolvendo os resultados histológicos de Johnsen, índices de Copenhagen e volume testicular, não sendo encontrados valores para as dosagens de FSH e LH, devido à ausência de sensibilidade e especificidade mostradas nas curvas ROC. No parâmetro concentração de espermatozoides, os valores de corte significativamente estatísticos mostraram que o *score* de Johnsen deve ser maior que 8,2 no testículo esquerdo. Adicionalmente, o volume testicular direito deve ser superior a 12,8 mL. Especificamente quanto à motilidade total de espermatozoides, obteve-se o valor de corte de 8,2 (bilateral) para o

score de Johnsen e 2,5 para o dígito II de Copenhagen em ambos os testículos. Na avaliação da motilidade progressiva de espermatozoides, o score de Johnsen deve ser maior que 9,1 (bilateral) e o dígito III de Copenhagen deve ser inferior a 1,5 no testículo direito. Finalmente, quanto ao parâmetro morfologia de espermatozoides, obteve-se valores significativamente estatísticos quanto ao score de Johnsen no testículo direito, que deve ser superior a 7,9 e quanto ao índice de Copenhagen dígito II, que deve ser inferior a 4. O volume testicular direito deve ser maior que 13,6 mL. As Figuras 34 a 45 apresentam todos os valores de corte obtidos no grupo 1 com ($p < 0,05$).

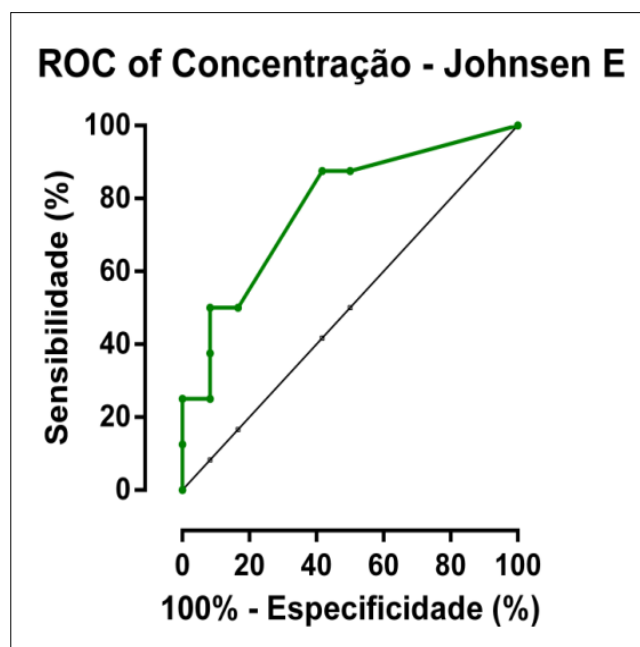


Figura 34: Representação de valor de corte para score de Johnsen referente à concentração espermática do testículo esquerdo. Área sob a curva = 0,76.

As curvas ROC são representações gráficas que ilustram a performance de um sistema e como seu limiar de discriminação é variado. São na verdade, representações gráficas de sensibilidade (positivos verdadeiros) e especificidade (falsos positivos) de testes diagnósticos. São largamente aplicadas em medicina como uma valiosa ferramenta na criação e avaliação de pontos de corte. A área sob a curva ROC é empregada como uma medida do desempenho e validação do que se propõe a analisar. Um teste ideal é aquele cuja área está mais próxima de 1,0⁴⁰.

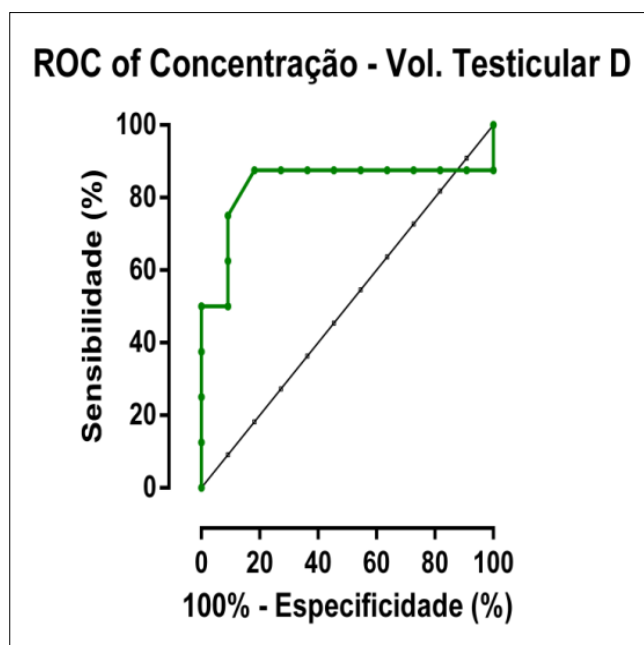


Figura 35: Representação de valor de corte para volume testicular associado à concentração espermática do testículo direito. Área sob a curva = 0,76.

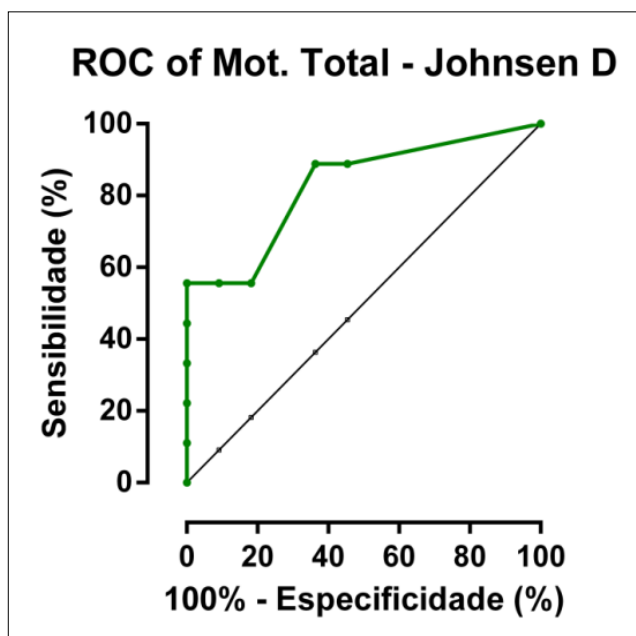


Figura 36: Representação de valor de corte do *score* de Johnsen referente à motilidade total de espermatozoides no testículo direito. Área sob a curva = 0,82.

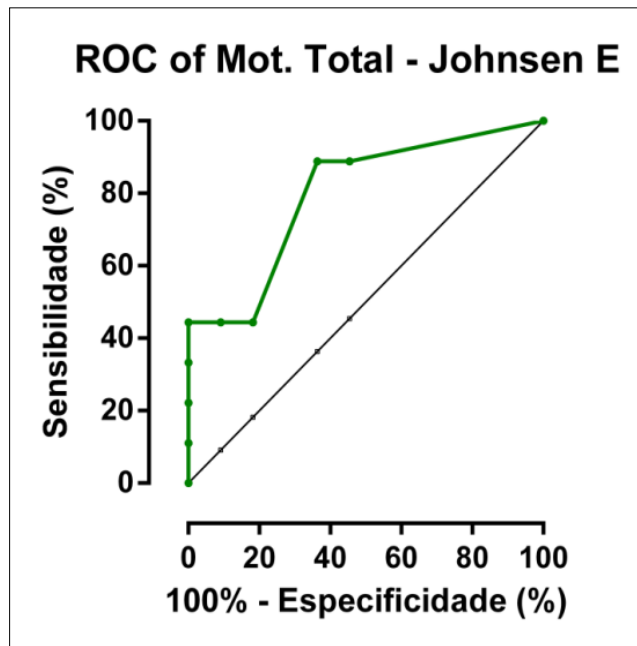


Figura 37: Representação de valor de corte do *score* de Johnsen referente à motilidade espermática no testículo esquerdo. Área sob a curva = 0,83.

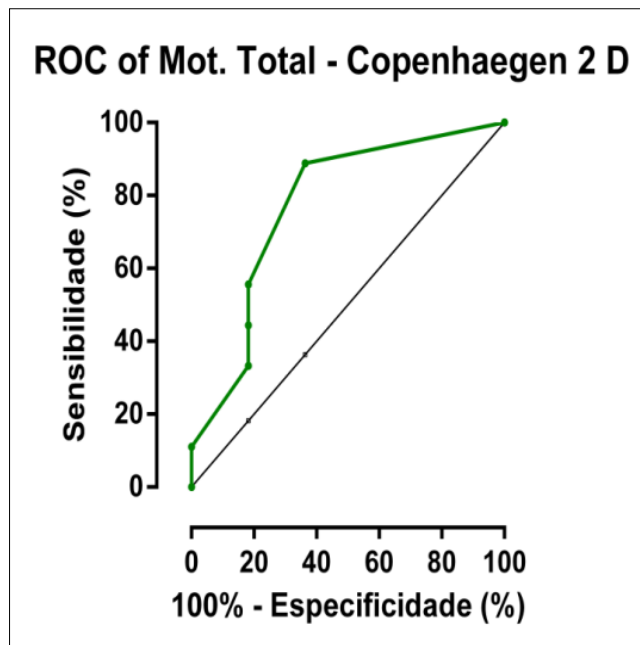


Figura 38: Representação de valor de corte do índice de Copenhaegen dígito II referente à motilidade total de espermatozoides no testículo direito. Área sob a curva = 0,77.

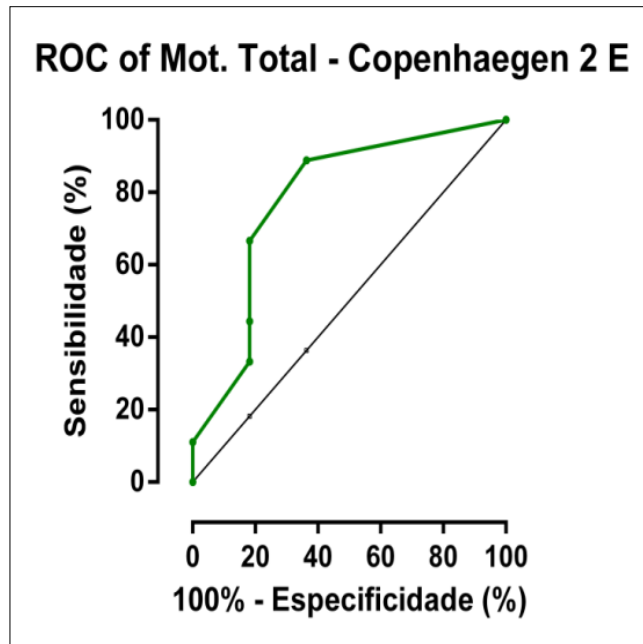


Figura 39: Representação de valor de corte do índice de Copenhagen dígito II referente à motilidade total de espermatozoides no testículo esquerdo. Área sob a curva = 0,78.

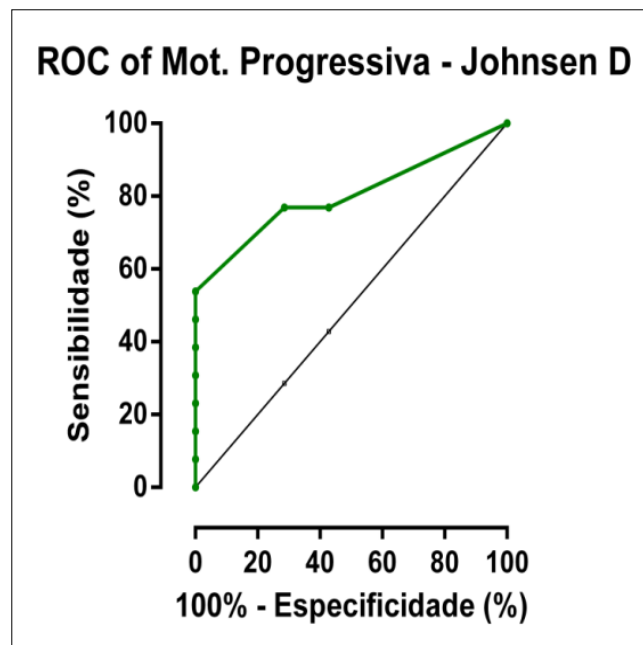


Figura 40: Representação de valor de corte do *score* de Johnsen quanto à motilidade progressiva de espermatozoides no testículo direito. Área sob a curva = 0,80.

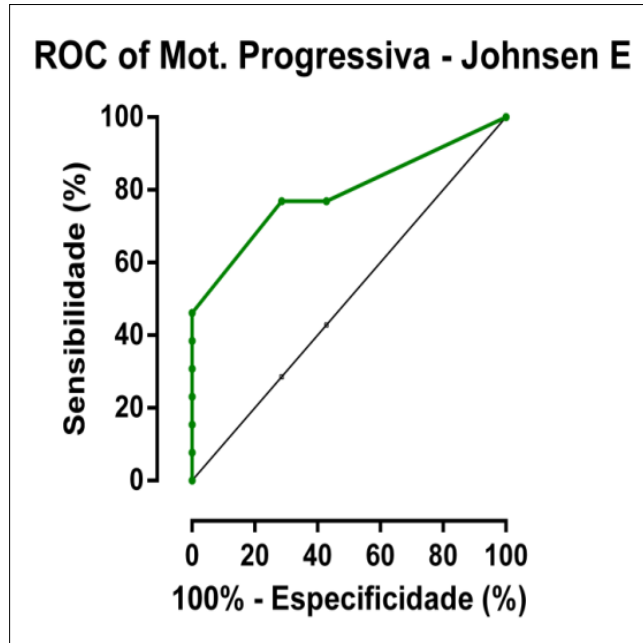


Figura 41: Representação de valor de corte do *score* de Johnsen quanto à motilidade progressiva de espermatozoides no testículo esquerdo. Área sob a curva = 0,79.

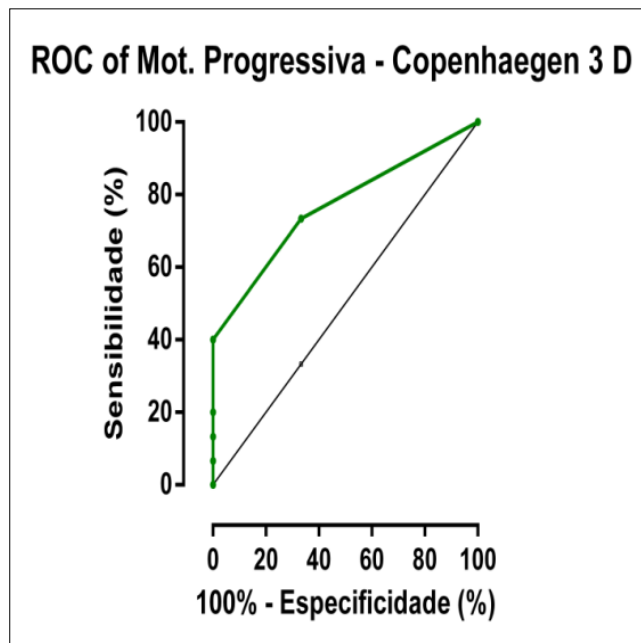


Figura 42: Representação de valor de corte do índice de Copenhaegen Dígito III quanto à motilidade progressiva de espermatozoides no testículo direito. Área sob a curva = 0,76.

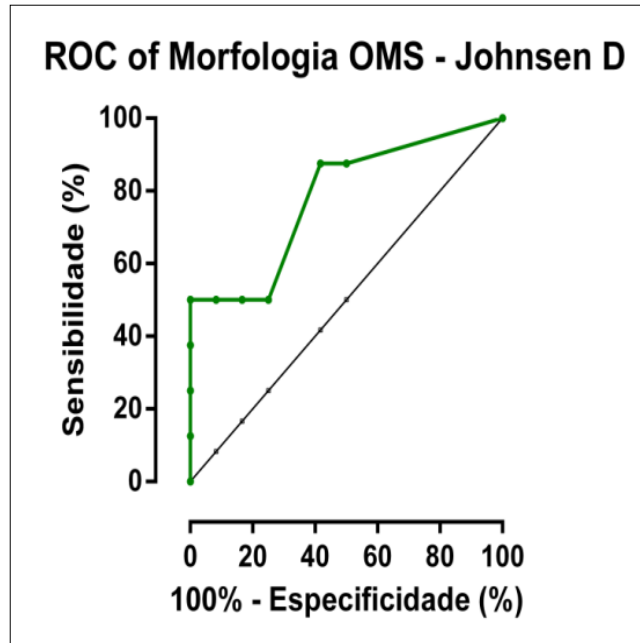


Figura 43: Representação de valor de corte do *score* de Johnsen associado à morfologia espermática no testículo direito. Área sob a curva = 0,78.

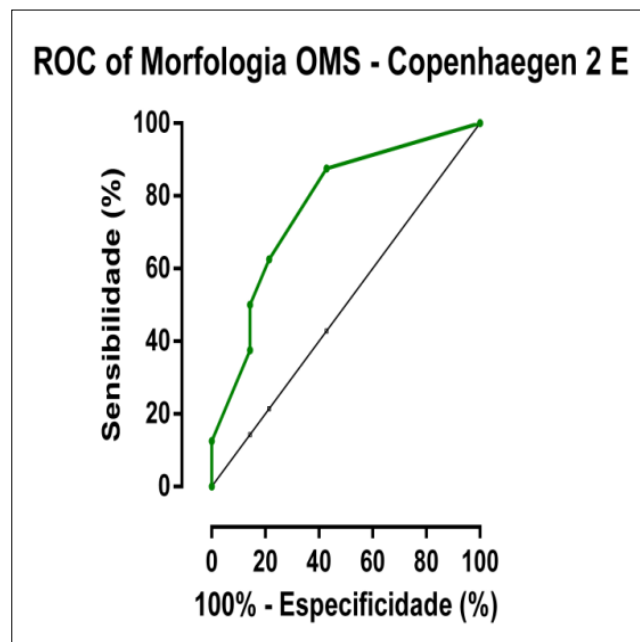


Figura 44: Representação de valor de corte do índice de Copenhaegen II relativo à morfologia espermática no testículo esquerdo. Área sob a curva = 0,77.

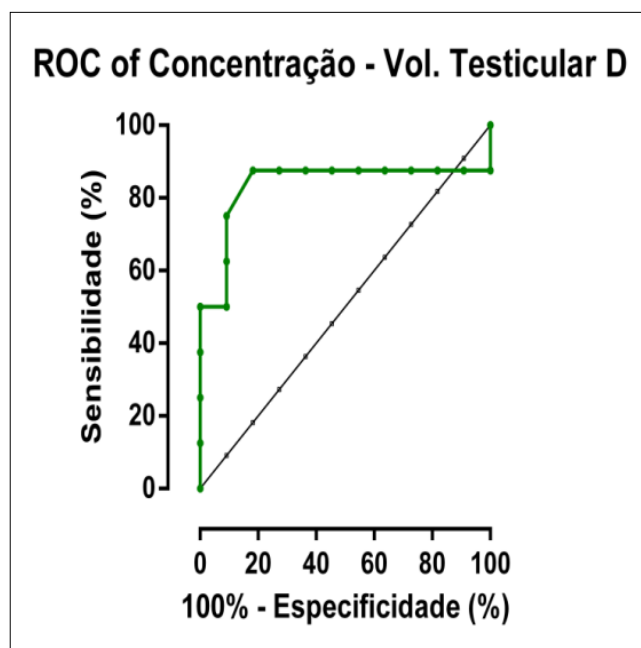


Figura 45: Representação de valor de corte do *score* de Johnsen associado ao volume testicular da gônada direita. Área sob a curva = 0,79.

4.4. Identificação de um padrão histológico testicular como valor prognóstico da melhora da capacidade reprodutiva em pacientes com varicocele clínica – grupo 2.

Na tabela 13, são apresentados os valores de corte preditivos da melhora da capacidade reprodutiva dos pacientes do grupo 2.

Tabela 13. Determinação dos valores de corte do grupo 2, referente aos parâmetros concentração, motilidade e morfologia de espermatozoides em função dos *scores* de Johnsen, índices de Copenhagen, volume testicular e dosagens de FSH e LH.

	Valor de corte Johnsen	Valor de corte Copenhagen II	Valor de corte Copenhagen III	Valor de corte volume testicular	Valor de corte FSH	Valor de corte LH
	direito/esquerdo	direito/esquerdo	direito/esquerdo	direito/esquerdo		
Concentração	>5,5 / >5,5	<6,5 / 0	<2,5 / 0	>11,9 / >11,5	<5,4	0
Sensibilidade (%)	50,0 / 22,2	50,0 / 0	12,5 / 0	66,6 / 66,6	87,5	0
Especificidade (%)	96,4 / 96,5	85,7 / 0	96,4 / 0	96,5 / 96,5	72,0	0
<i>p</i> valor	0,01*/ 0,01*	0,02*/ 0	0,08/ 0	0,002*/ 0,003*	0,03*	0

	Valor de corte Johnsen	Valor de corte Copenhagen II	Valor de corte Copenhagen III	Valor de corte volume testicular	Valor de corte FSH	Valor de corte LH
	direito/esquerdo	direito/esquerdo	direito/esquerdo	direito/esquerdo		
Motilidade T	0 / >4,6	0 / 0	<1,5 / 0	0 / 0	0	0
Sensibilidade (%)	0 / 11,1	0 / 0	77,7 / 0	0 / 0	0	0
Especificidade (%)	0 / 96,5	0 / 0	66,6 / 0	0 / 0	0	0
<i>p</i> valor	0 / 0,06	0 / 0	0,02* / 0	0 / 0	0	0
Motilidade P	0 / 0	0 / 0	<1,5 / 0	0 / 0	<5,0	0
Sensibilidade (%)	0 / 0	0 / 0	60,0 / 0	0 / 0	70,0	0
Especificidade (%)	0 / 0	0 / 0	76,9 / 0	0 / 0	84,6	0
<i>p</i> valor	0 / 0	0 / 0	0,04* / 0	0 / 0	0,006*	0
Morfologia	0 / 0	0 / 0	0 / 0	>11,9 / 0	<5,3	0
Sensibilidade (%)	0 / 0	0 / 0	0 / 0	50,0 / 0	81,8	0
Especificidade (%)	0 / 0	0 / 0	0 / 0	96,1 / 0	77,2	0
<i>p</i> valor	0 / 0	0 / 0	0 / 0	0,02* / 0	0,01*	0

(*) Representa significância estatística ($p < 0,05$).

No grupo 2, obteve-se valores de corte relacionados aos resultados histológicos de Johnsen e Copenhagen, volume testicular e dosagem de FSH, não sendo possível a determinação de valores para a dosagem de LH. Referente à concentração de espermatozoides, os valores de corte dos *scores* de Johnsen devem ser superiores a 5,5 em ambos os testículos. O índice de Copenhagen para o dígito II deve ser inferior a 6,5 no lado direito e o volume dos testículos deve ser superior a 11,9 mL do lado direito e 11,5 mL do lado esquerdo. Ainda no parâmetro concentração de espermatozoides, a dosagem sérica de FSH deve ser inferior a 5,4 mUI/mL. Para que os pacientes obtenham uma motilidade total de espermatozoides dentro dos valores de referência, foi encontrado valor de corte somente no dígito III de Copenhagen (lado direito) que deve ser inferior a 1,5. No parâmetro motilidade progressiva de espermatozoides, o dígito III de Copenhagen da gônada direita deve ser menor que 1,5 e a dosagem de FSH menor que 5,0 mUI/mL. Na avaliação da morfologia espermática, os valores de corte com significância estatística foram obtidos somente envolvendo o volume testicular direito

(maior que 11,9 mL) e a dosagem de FSH, que deve ser menor que 5,3 mUI/mL. As figuras 46 a 55 apresentam todos os valores de corte com ($p < 0,05$).

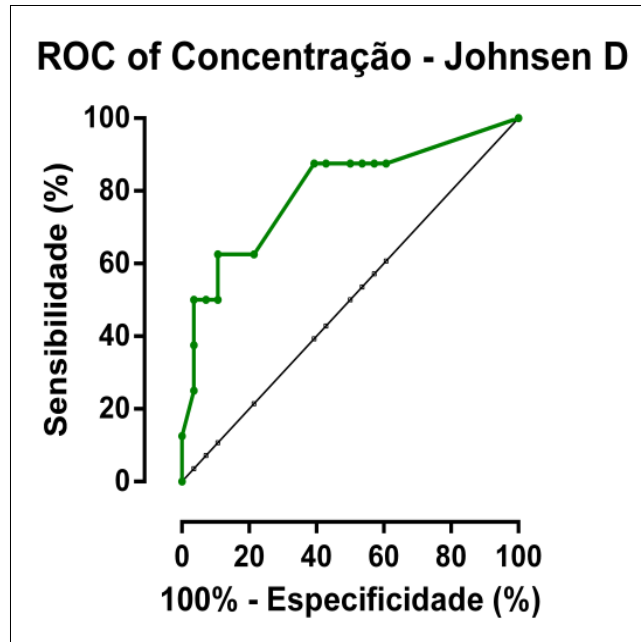


Figura 46: Representação de valor de corte do *score* de Johnsen referente à concentração espermática no testículo direito. Área sob a curva = 0,80.

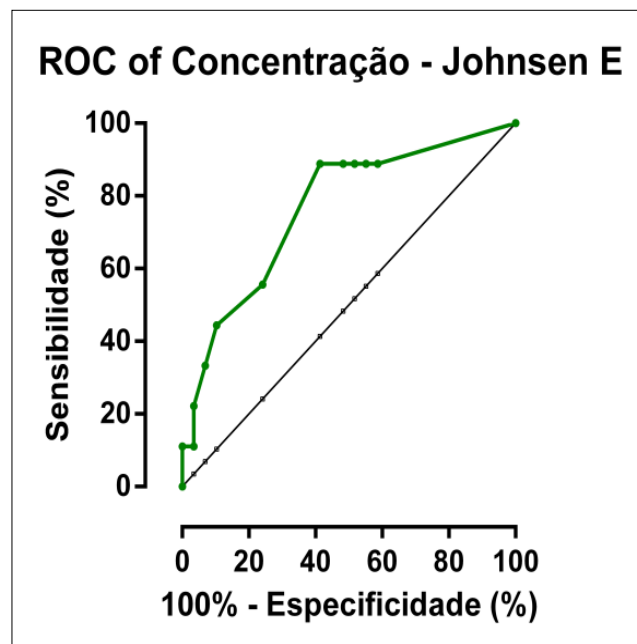


Figura 47: Representação de valor de corte do *score* de Johnsen referente à concentração espermática no testículo esquerdo. Área sob a curva = 0,76.

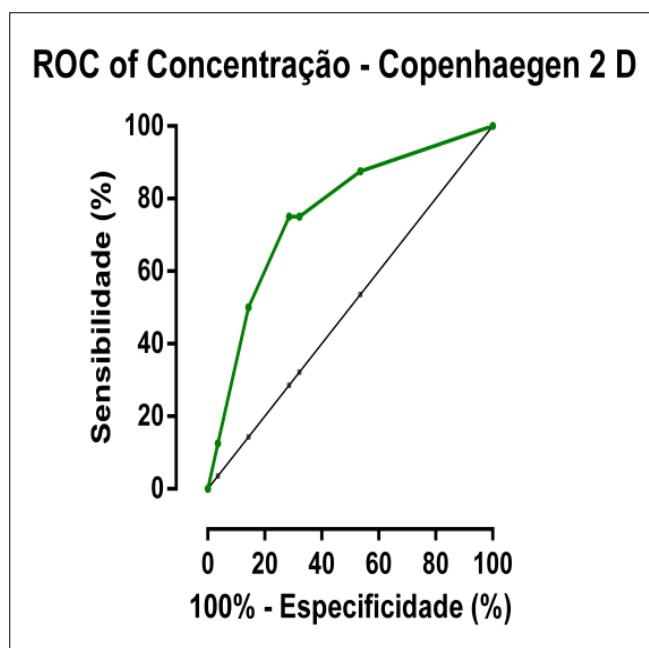


Figura 48: Representação de valor de corte do índice de Copenhagen dígito II referente à concentração espermática no testículo direito. Área sob a curva = 0,76.

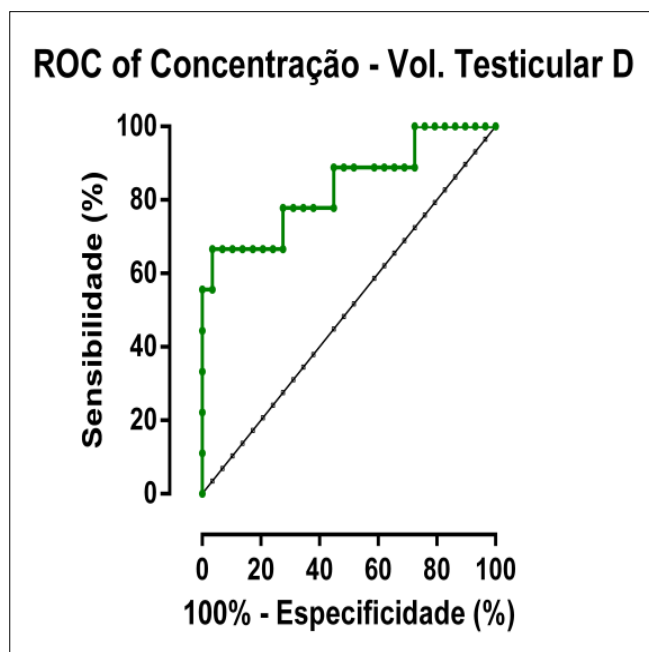


Figura 49: Representação de valor de corte do volume testicular direito referente à concentração espermática. Área sob a curva = 0,83.

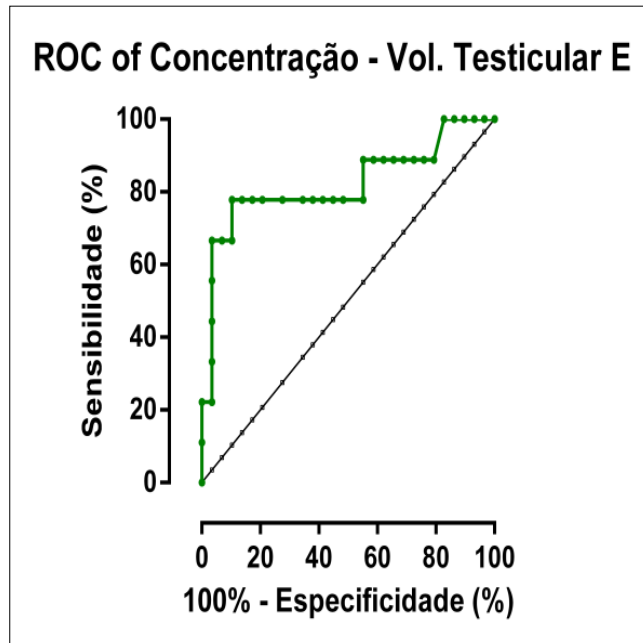


Figura 50: Representação de valor de corte do volume testicular esquerdo referente à concentração espermática. Área sob a curva = 0,82.

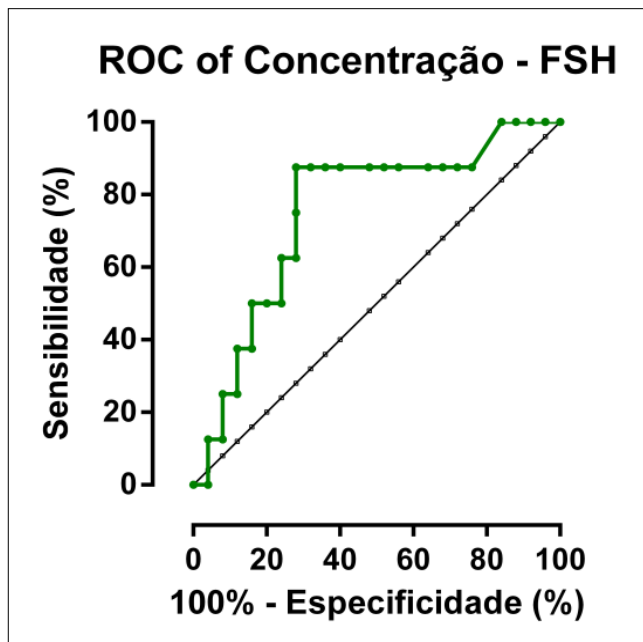


Figura 51: Representação de valor de corte da dosagem de FSH referente à concentração espermática. Área sob a curva = 0,75.

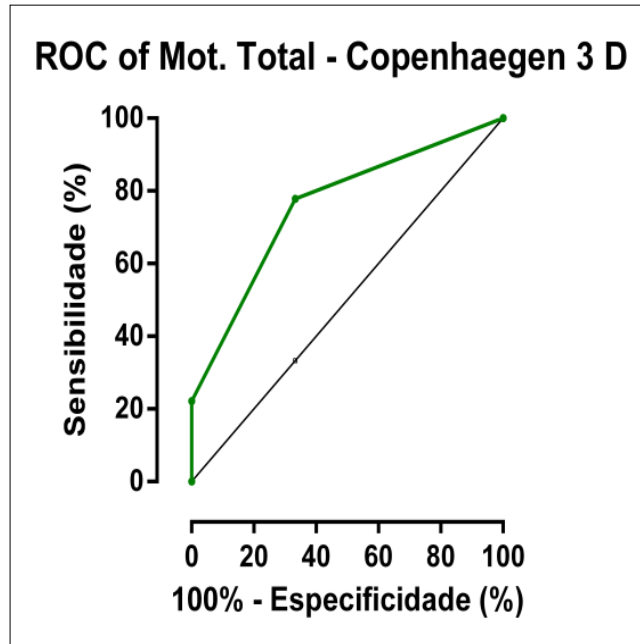


Figura 52: Representação de valor de corte do índice de Copenhagen dígito III quanto à motilidade total de espermatozoides no testículo direito. Área sob a curva = 0,77.

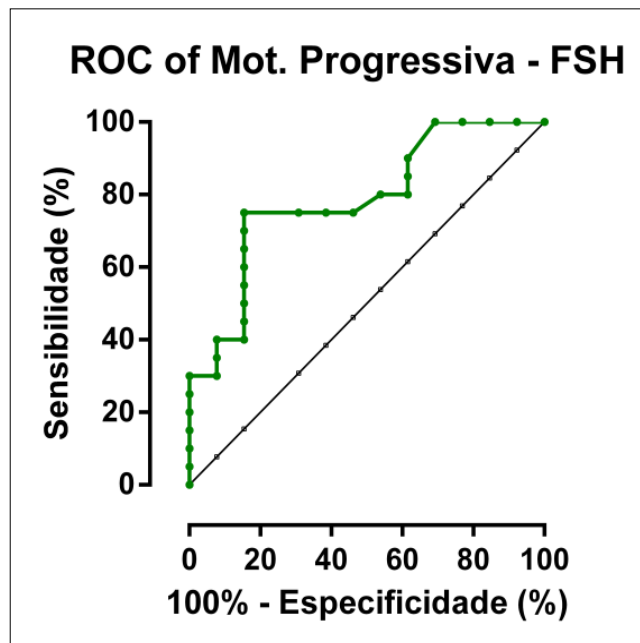


Figura 53: Representação de valor de corte da dosagem de FSH quanto à motilidade progressiva de espermatozoides. Área sob a curva = 0,79.

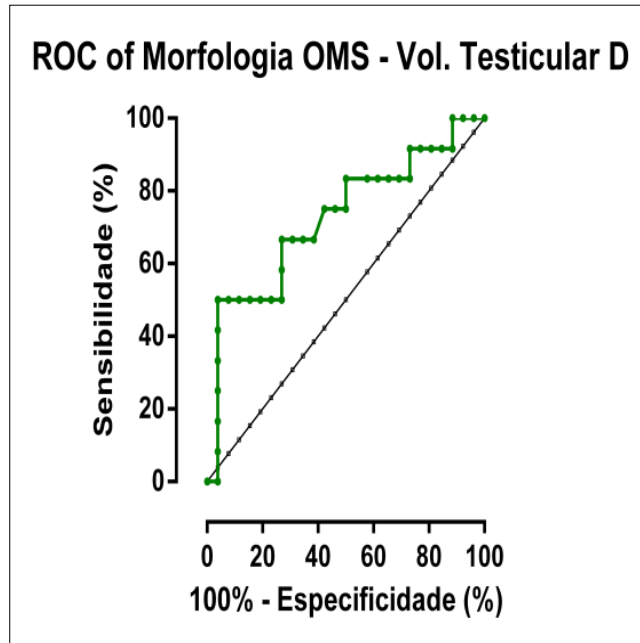


Figura 54: Representação de valor de corte da morfologia espermática referente ao volume testicular direito. Área sob a curva = 0,73.

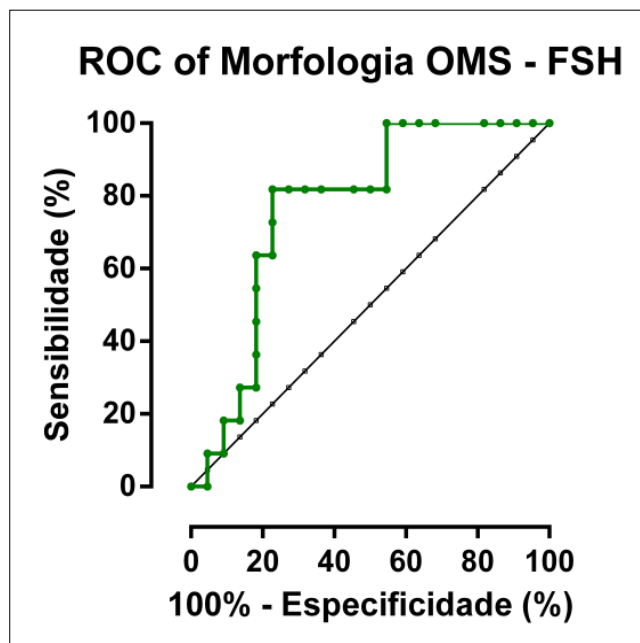


Figura 55: Representação de valor de corte da morfologia espermática referente à dosagem de FSH. Área sob a curva = 0,77.

4.5. Evolução dos parâmetros seminais após correção microcirúrgica de varicocele.

Foi determinada a evolução dos parâmetros seminais em ambos os grupos estudados, antes e após a cirurgia de correção da varicocele em tempos distintos (Tabela 14).

Tabela 14. Distribuição de frequência de parâmetros seminais antes e após varicocelectomia microcirúrgica.

	Grupo 1		Grupo 2	
	Média	Desvio-padrão	Média	Desvio-padrão
Pré-cirurgia				
Concentração (milhões/mL)	64,0	67,1	37,0	35,2
Motilidade total (%)	54,3	19,6	44,7	24,4
Motilidade progressiva (%)	32,5	21,0	24,5	18,8
Morfologia (%)	10,4	10,3	7,2	7,8
3 meses pós-operatório				
Concentração (milhões/mL)	49,7	43,7	43,3	37,1
Motilidade total (%)	56,9	19,0	52,1	20,1
Motilidade progressiva (%)	31,2	15,1	30,2	19,0
Morfologia (%)	8,0	5,6	9,1	9,6
6 meses pós-operatório				
Concentração (milhões/mL)	22,1	16,6	21,4	15,6
Motilidade total (%)	45,6	20,2	60,0	14,9
Motilidade progressiva (%)	21,8	16,4	26,1	14,9
Morfologia (%)	3,7	2,4	5,1	4,5
12 meses pós-operatório				
Concentração (milhões/mL)	31,0	25,7	23,4	12,6
Motilidade total (%)	54,0	22,7	53,7	9,6
Motilidade progressiva (%)	30,0	16,6	27,5	10,3
Morfologia (%)	2,4	1,9	4,5	2,7

* A morfologia representada se refere ao critério da OMS.

4.5.1 Evolução dos parâmetros seminais após correção microcirúrgica de varicocele – Grupo 1.

As figuras 56 a 64 são representações gráficas da evolução dos parâmetros seminais dos pacientes do grupo 1, ao longo de 12 meses de pós operatório de reparo da varicocele. Foi observado diminuição da concentração e número total de espermatozoides, além de melhora na motilidade total e progressiva. Adicionalmente, foram observadas elevações nos percentuais de motilidade grau B e C e redução do número de espermatozoides imóveis (grau D), no entanto, não houve significância estatística em nenhum parâmetro avaliado.

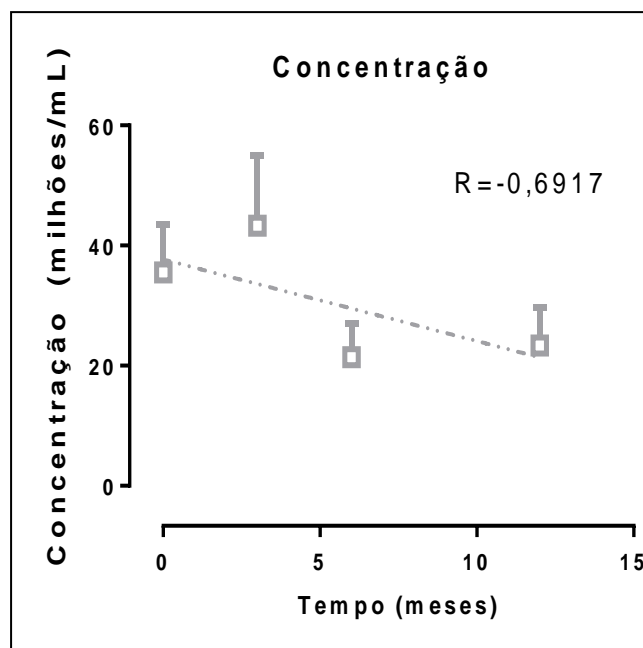


Figura 56: Evolução seminal do parâmetro concentração de espermatozoides (p valor = 0,30).

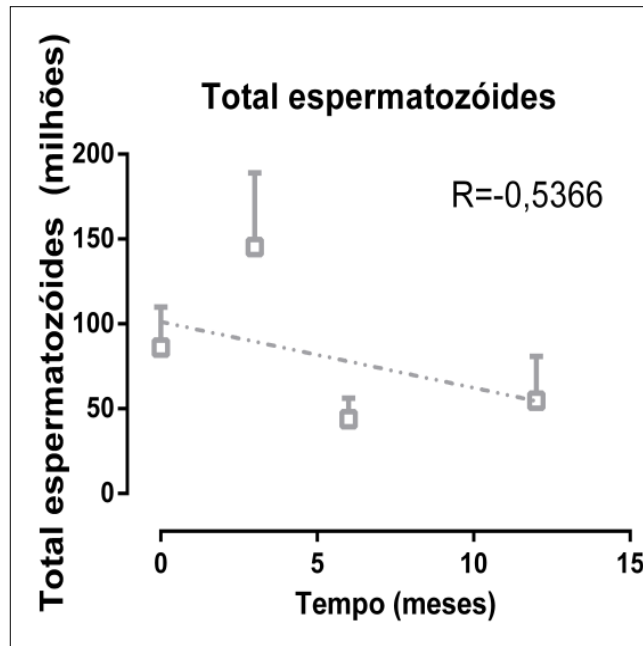


Figura 57: Evolução seminal do número total de espermatozoides (p valor = 0,46).

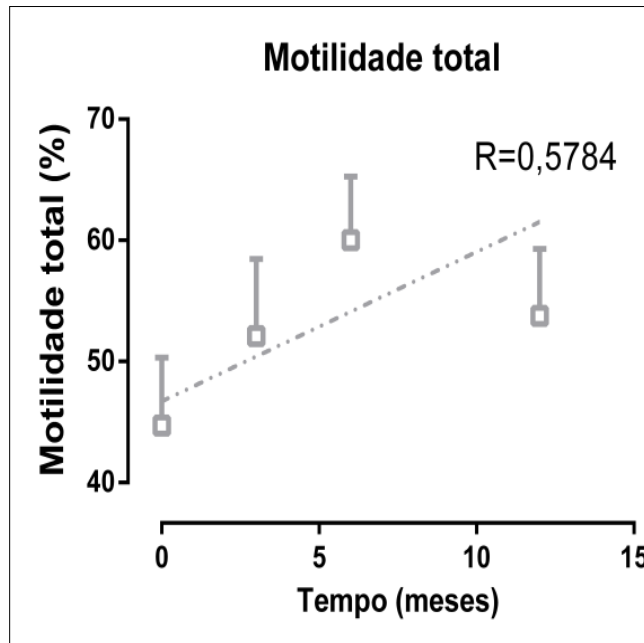


Figura 58: Evolução seminal da motilidade total de espermática (p valor = 0,42).

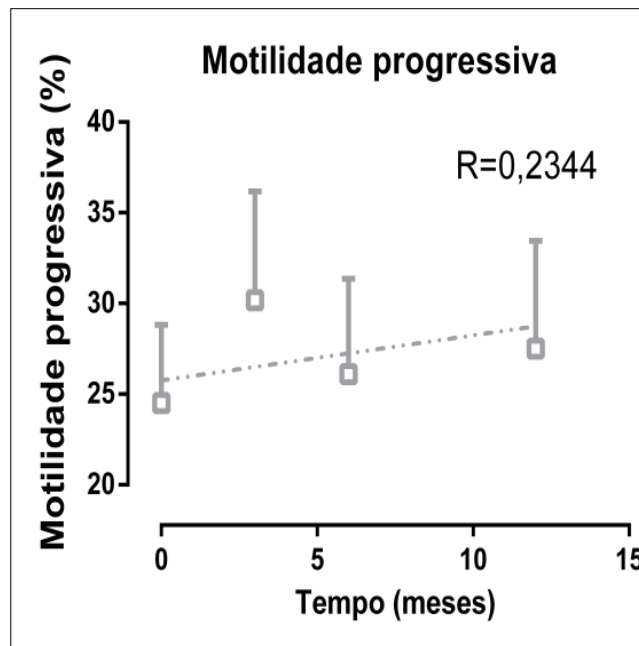


Figura59: Evolução seminal da motilidade progressiva de espermatozoides (p valor = 0,76).

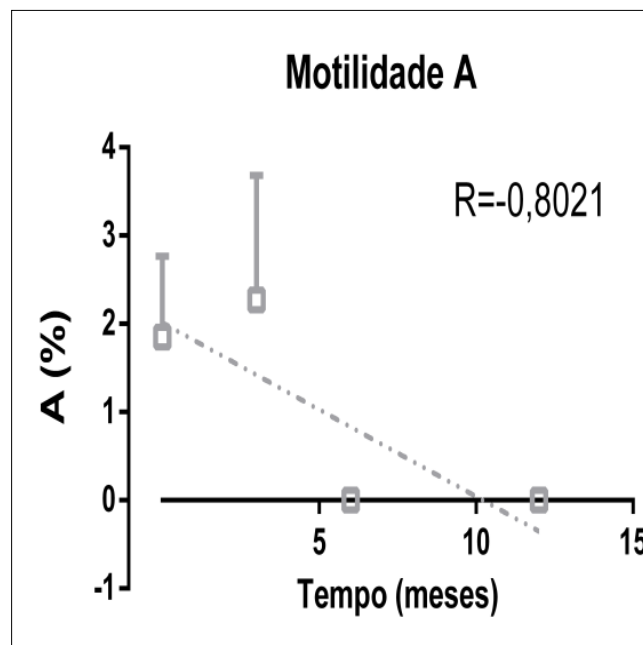


Figura 60: Evolução do parâmetro motilidade espermática grau A (p valor = 0,19).

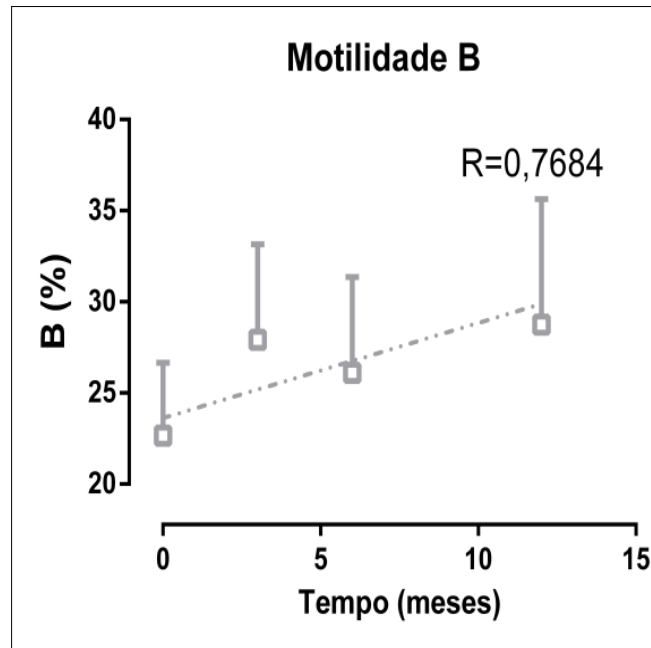


Figura 61: Evolução do parâmetro motilidade espermática grau B (p valor = 0,23).

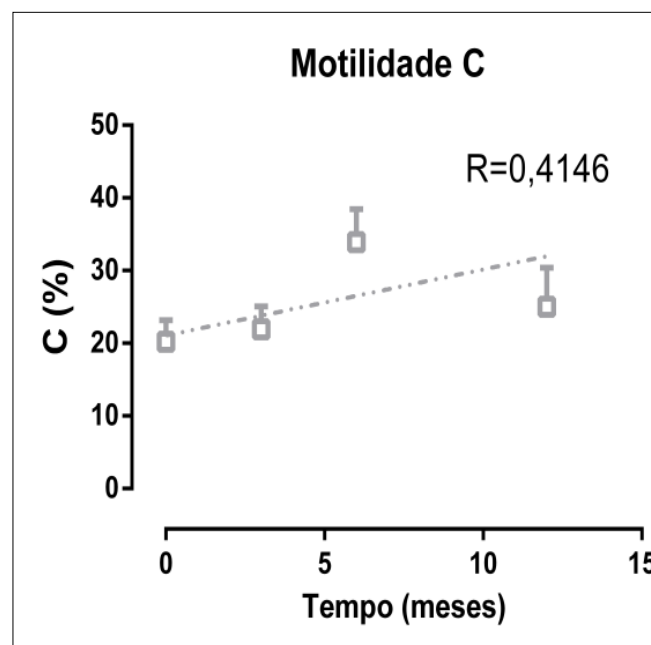


Figura62: Evolução do parâmetro motilidade espermática grau C (p valor = 0,58).

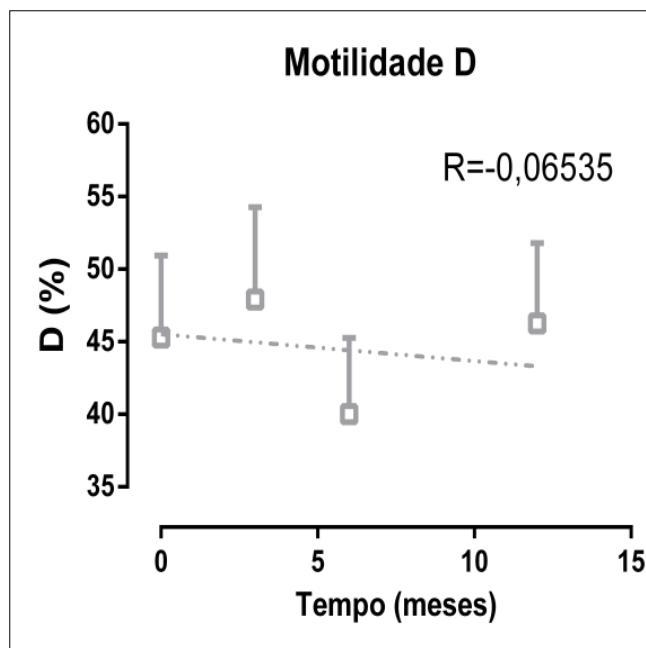


Figura 63: Evolução do parâmetro motilidade espermática grau D (p valor = 0,93).

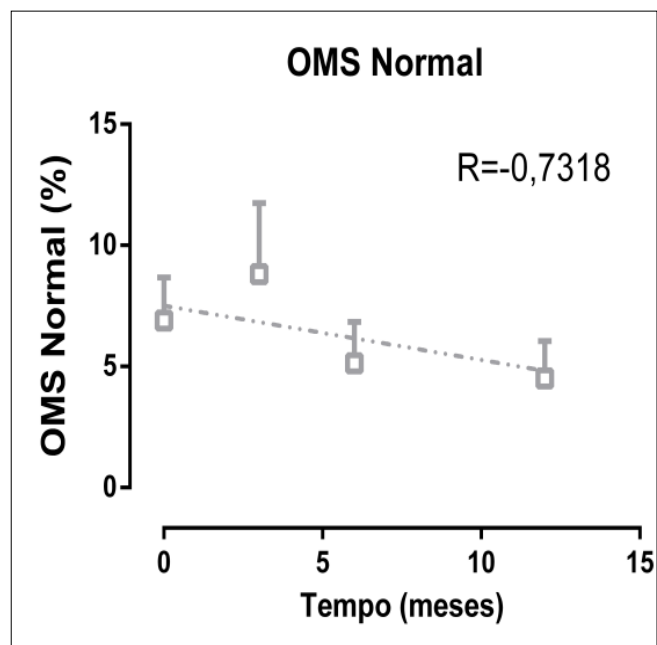


Figura 64: Evolução seminal da morfologia de espermatozoides (p valor = 0,26).

4.5.2. Evolução dos parâmetros seminais no grupo com varicocele clínica após correção microcirúrgica - grupo 2.

As figuras 65 a 73 mostram a evolução seminal dos pacientes do grupo 2 após a varicocelectomia microcirúrgica. Verificou-se redução de parâmetros seminais como concentração e número total de espermatozoides, no entanto, foi observado melhora dos graus de motilidade B e C, além de redução do percentual de espermatozoides imóveis. Semelhantemente ao grupo 1, não houve significância estatística em nenhum parâmetro de avaliação.

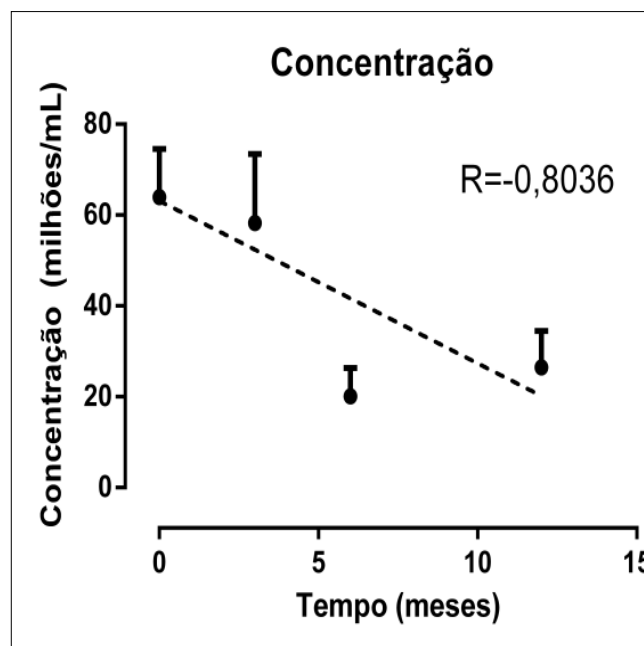


Figura 65: Evolução seminal do parâmetro concentração espermática (p valor = 0,19).

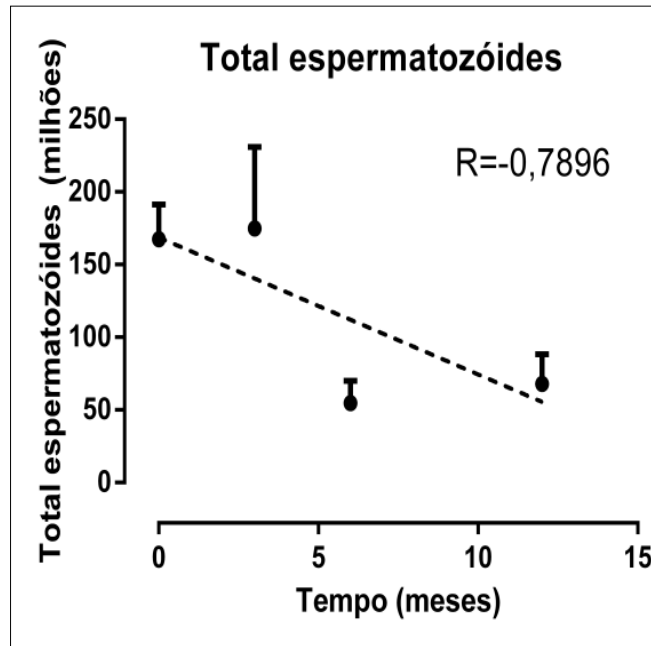


Figura 66: Evolução seminal do número total de espermatozoides (p valor = 0,21).

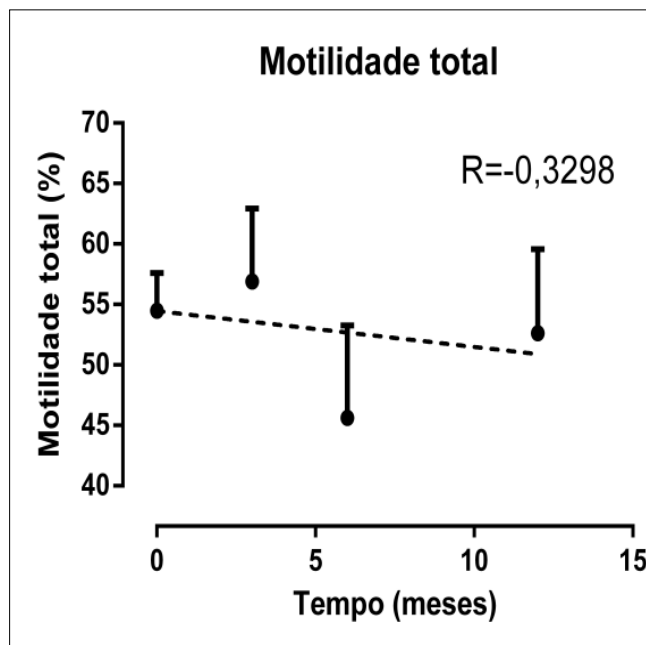


Figura 67: Evolução seminal da motilidade total de espermatozoides (p valor = 0,67).

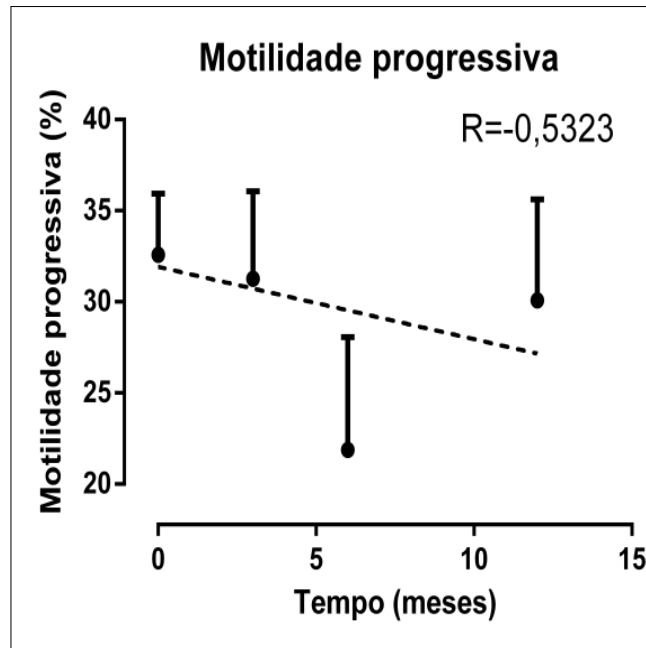


Figura 68: Evolução seminal da motilidade progressiva de espermatozoides (p valor = 0,70).

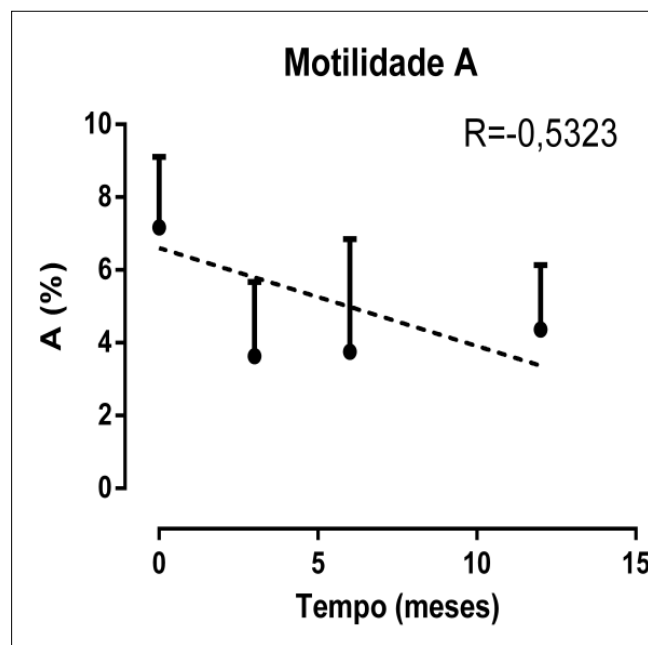


Figura 69: Evolução do parâmetro motilidade espermática grau A (p valor = 0,46).

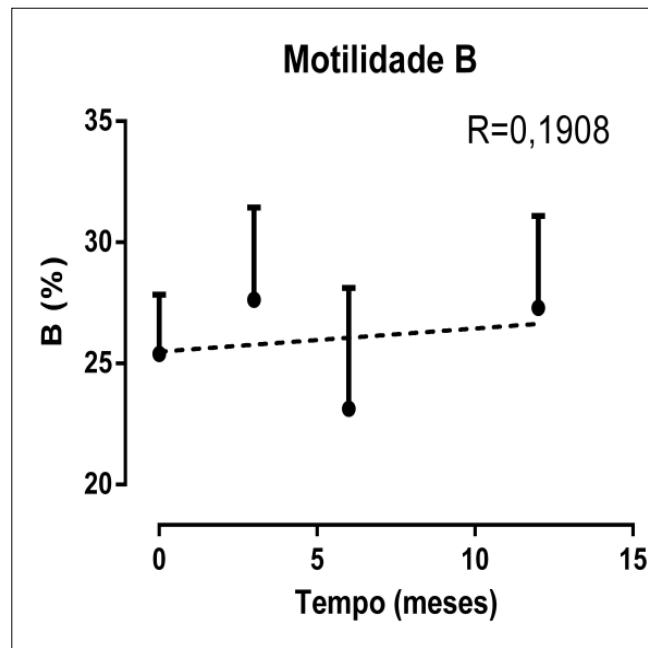


Figura 70: Evolução do parâmetro motilidade espermática grau B (p valor = 0,80).

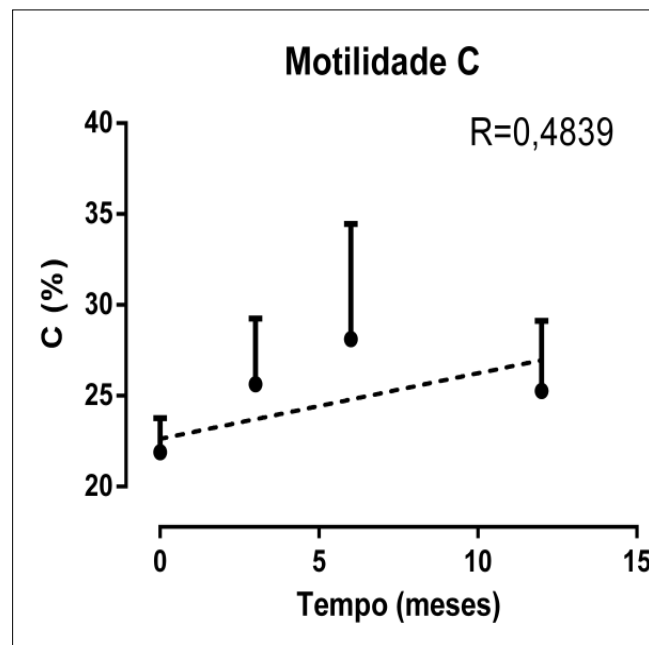


Figura 71: Evolução do parâmetro motilidade espermática grau C (p valor = 0,51).

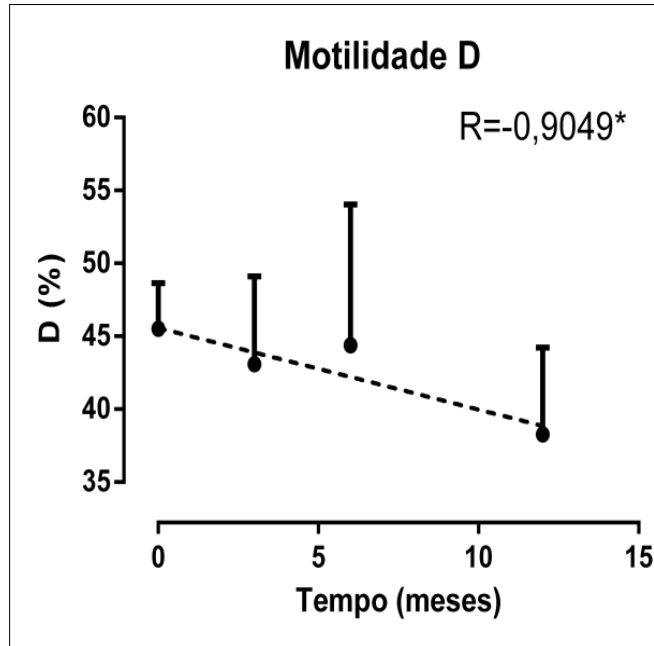


Figura 72: Evolução do parâmetro motilidade espermática grau D (p valor = 0,09).

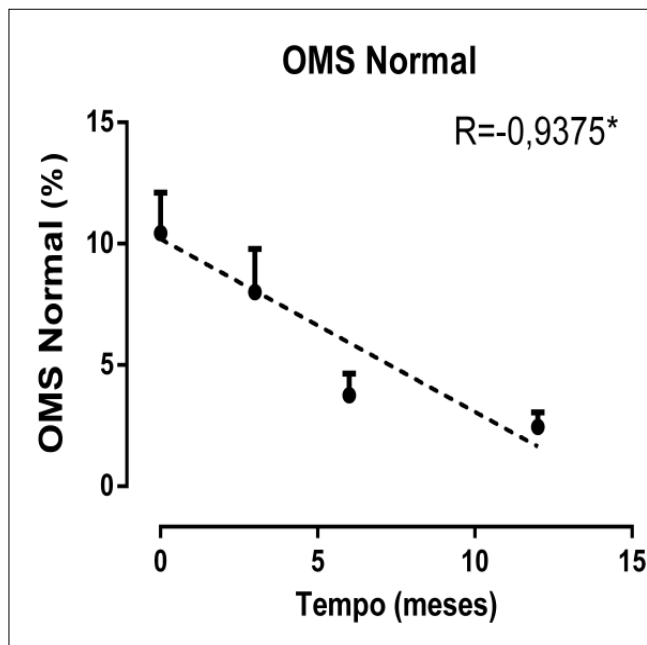


Figura 73: Evolução da morfologia de espermatozoides (p valor = 0,06).

4.6 Comparação da evolução dos parâmetros seminais entre os pacientes com varicocele clínica e subclínica.

Na comparação da evolução seminal entre os dois grupos avaliados, pôde-se observar que o grupo 1 obteve mais benefícios advindos da correção microcirúrgica de varicocele, especialmente no que se refere à motilidade de espermatozoides (Figuras 74-82).

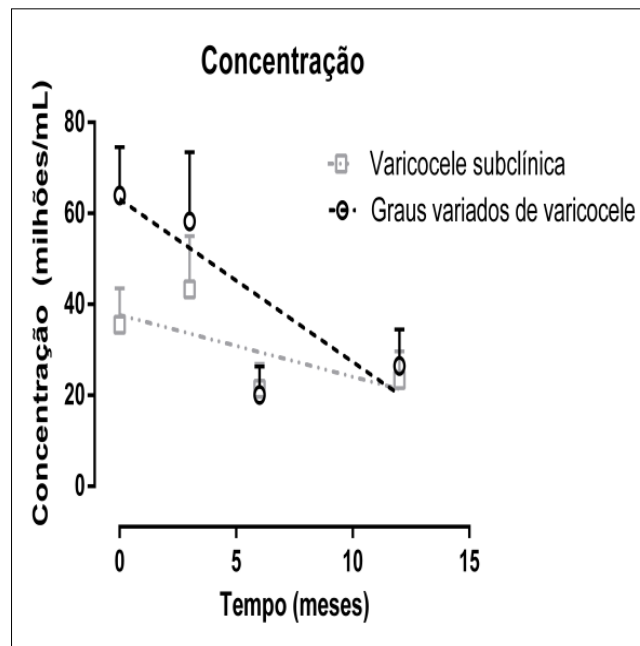


Figura 74: Comparação referente à concentração espermática (p valor = 0,34).

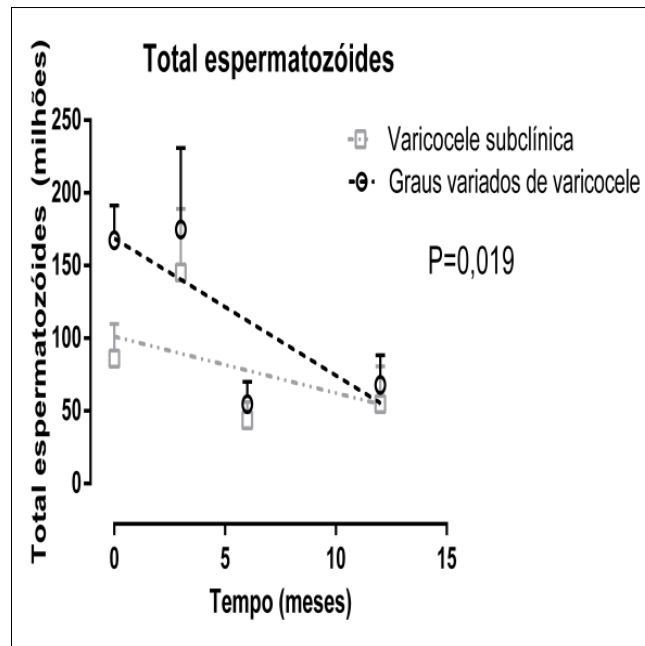


Figura 75: Comparação envolvendo o número total de espermatozoides (p valor = 0,01).

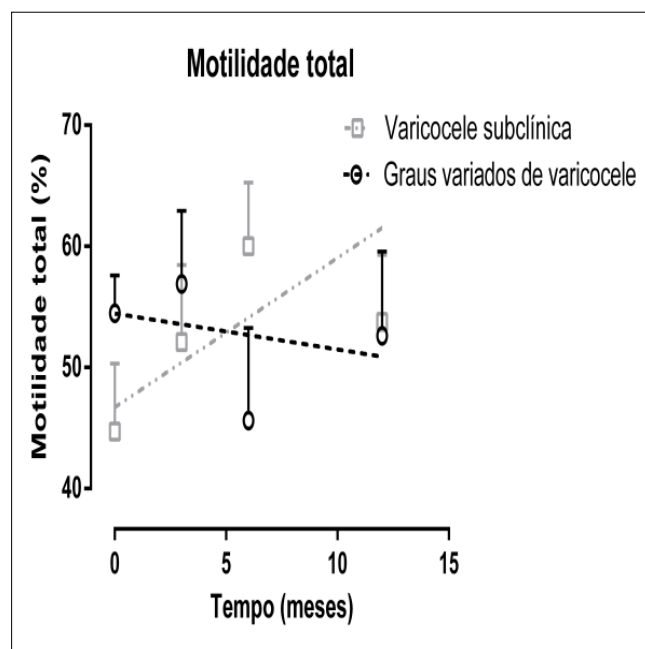


Figura 76: Comparação referente à motilidade total de espermatozoides (p valor = 0,51).

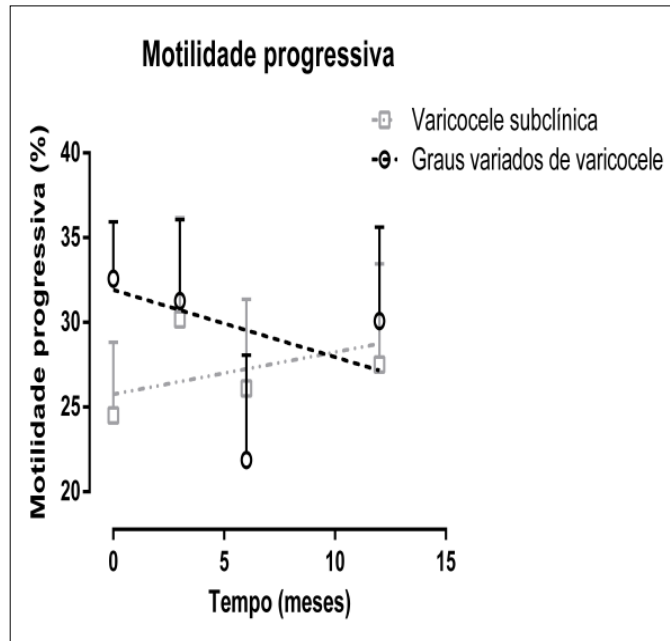


Figura 77: Comparação referente à motilidade progressiva espermática (p valor = 0,78).

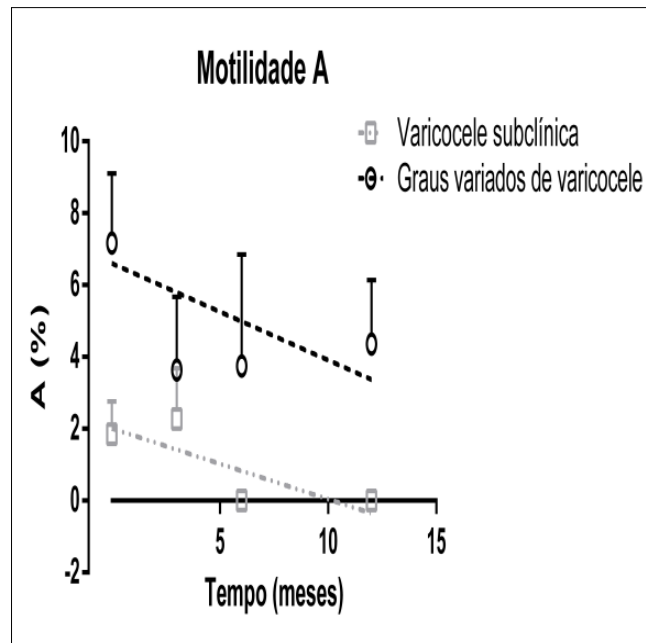


Figura 78: Comparação envolvendo a motilidade espermática grau A (p valor = 0,97).

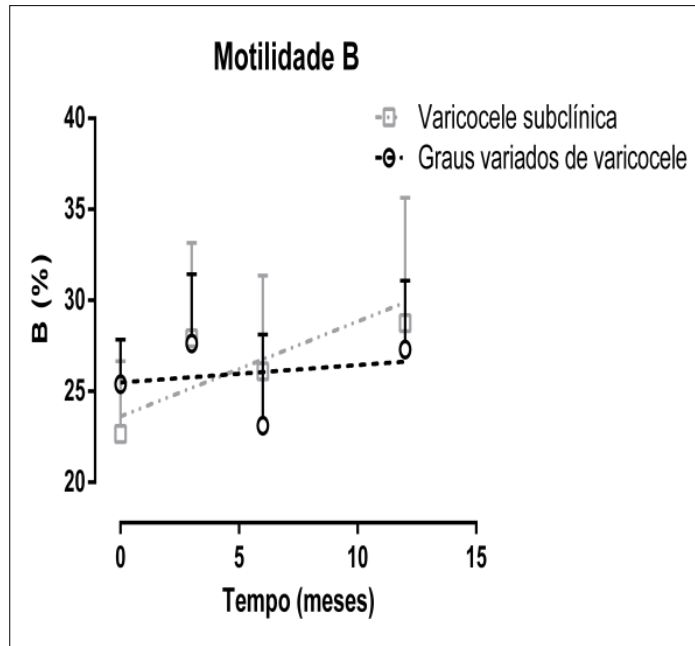


Figura 79: Comparação envolvendo a motilidade espermática grau B (p valor = 0,85).

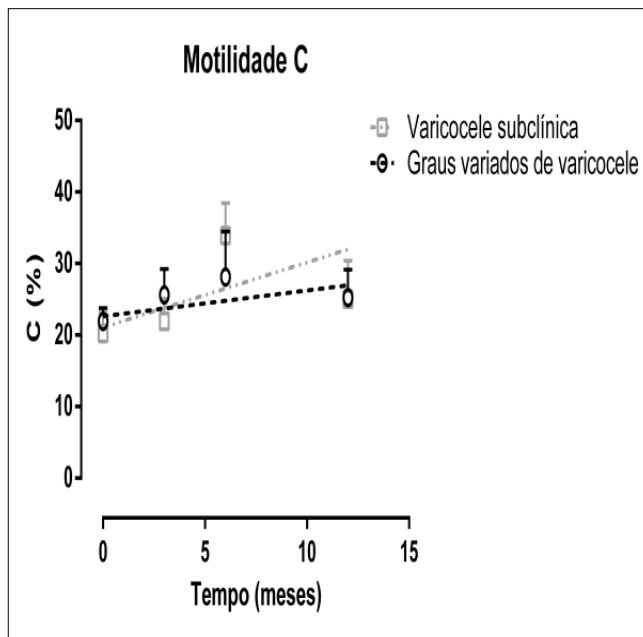


Figura 80: Comparação envolvendo a motilidade espermática grau C (p valor = 0,81).

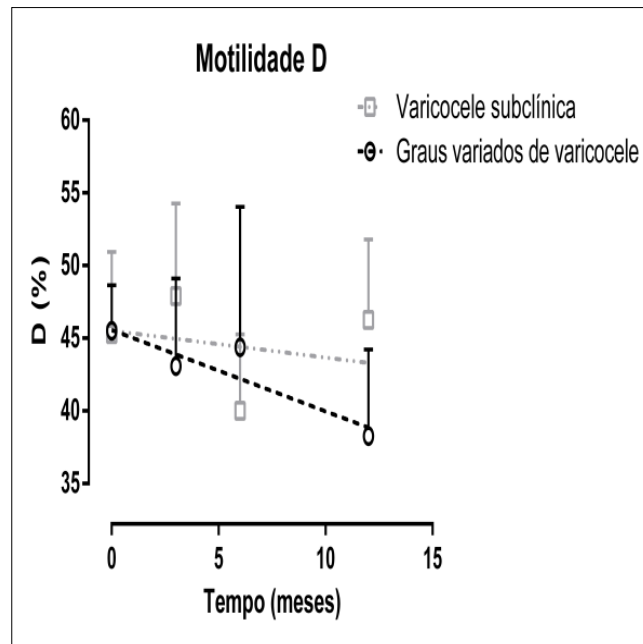


Figura 81: Comparação envolvendo a motilidade espermática grau D (p valor = 0,87).

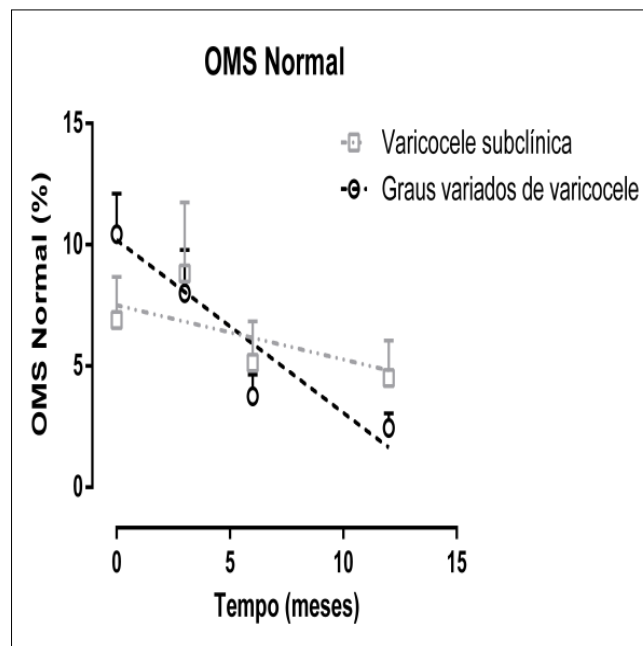


Figura 82: Comparação referente à morfologia de espermatozoides (p valor = 0,83).

5 DISCUSSÃO

A Organização Mundial de Saúde estima que aproximadamente 800 milhões de pessoas ao redor do mundo apresentam problemas relacionados à infertilidade^{16,17}. De acordo com a *American Society for Reproductive Medicine* (ASRM – Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva), a infertilidade é considerada uma doença do sistema reprodutor, que é constatada após um período de doze meses de tentativas de concepção sem sucesso, em que o casal manteve relações sexuais sem a utilização de métodos contraceptivos. Dentre as causas de infertilidade masculina, a varicocele é a mais frequente e acomete 11,7% dos homens férteis e cerca de 40% dos homens com queixa de infertilidade^{45, 49,50}. Sua exata fisiopatologia ainda é desconhecida, entretanto, as hipóteses baseiam-se nos mecanismos contracorrentes da varicocele, como o aumento da temperatura escrotal ($\pm 2,5^{\circ}\text{C}$), estase venosa, desequilíbrio do eixo hipotálamo-hipófise-testículo, refluxo de metabólitos renais e suprarrenais e desequilíbrio oxidativo¹⁶⁻¹⁹. Além disso, A redução do volume testicular e alterações da espermatogênese são prejuízos bastante evidentes da varicocele sobre a fertilidade e foram observados em nosso estudo, corroborando com os dados da literatura.

No grupo de pacientes com diagnóstico de varicocele subclínica, a frequência de acometimento do testículo esquerdo foi equivalente ao testículo direito, todavia, entre os indivíduos portadores de varicocele clínica, a gônada esquerda foi mais acometida. Segundo Bryniarski e Yasim, a incidência de varicocele unicamente no lado esquerdo ocorre em 80 a 95% dos casos, bilateralmente em 25% a 45% dos casos e raramente apenas no lado direito, no entanto, este estudo tem uma visão diferente e considera a varicocele uma patologia bilateral⁵¹. Fisiologicamente, a gônada esquerda é mais acometida devido ao fato da veia gonadal estar inserida em ângulo de 90° com a veia renal esquerda, propiciando nos casos onde há defeito valvar, refluxo de sangue venoso até o plexo pampiniforme^{17, 18}. Os efeitos deletérios da lateralidade da varicocele sobre a espermatogênese não estão estabelecidos na literatura. Embora alguns estudos demonstrem que a varicocele resulta na redução da qualidade seminal independentemente do lado acometido, e que seu reparo pode melhorar os parâmetros seminais, outros estudos demonstraram que a baixa qualidade seminal dos pacientes com varicocele grau III apresentou grande melhora após a correção cirúrgica quando comparados aos graus inferiores de varicocele^{50, 51}.

A biópsia testicular desempenha um importante papel na investigação da infertilidade masculina. Sua aplicação nos casos de azoospermia obstrutiva e não-obstrutiva é bem conhecida, porém no que se refere aos casos de varicocele associada à oligoastenozoospermia há grande controvérsia. Diversas metodologias de biópsias foram propostas ao longo do tempo para obtenção da amostra testicular, visando assim a diminuição dos riscos e desconforto do paciente. No entanto, a biópsia aberta é ainda considerada por muitos autores o principal procedimento para extração do parênquima testicular com maior representatividade diagnóstica, pois acredita-se que a citologia aspirativa não pode substituir o exame histológico convencional. Sendo assim, o consenso é que a biópsia testicular independentemente da metodologia empregada deve ser utilizada de forma bastante criteriosa, pois o uso indevido e excessivo, pode acarretar prejuízos no potencial reprodutivo^{52, 53}.

A histologia testicular de ambos os grupos avaliados apresentou-se compatível com as análises seminais realizadas, embora diversos trabalhos mostrem divergências entre aspectos clínicos e histológicos, pelo fato da varicocele apresentar efeitos variáveis na função testicular^{48, 49}. Surpreendentemente, não foram observadas diferenças histológicas entre os testículos direito e esquerdo acometidos por varicocele. Quando a histologia testicular foi comparada entre os grupos com varicocele clínica e subclínica esta também se mostrou equivalente. Tais resultados requerem estudos mais específicos, entretanto corroboram com a literatura. Segundo Gat *et al*, hipóxia testicular faz parte dos mecanismos fisiopatológicos de varicoceles palpáveis e subclínicas. Por meio de venografia observa-se que o testículo esquerdo é classicamente mais acometido, porém, a varicocele é uma patologia vascular bilateral cujo retorno venoso do lado direito está clinicamente presente em 86% dos casos em pacientes inférteis, o que poderia culminar em caracteres histológicos semelhantes. Além disso, o aumento da pressão hidrostática venosa por varicocele perturba o influxo arterial para circulação intratesticular normal. Estudos recentes demonstraram que a presença de hipóxia testicular é um dos mecanismos investigados que mais causam comprometimento da espermatogênese de forma bilateral⁵⁰.

A varicocele contribui negativamente na fisiologia e no potencial de fertilização dos espermatozoides. Estudos anteriores mostram que a correção da varicocele subclínica direita pode melhorar a análise seminal em até 56% em homens inférteis acometidos por varicoceles palpáveis do lado esquerdo. Os achados histológicos são

fortemente variáveis e inespecíficos em ambos os casos de varicocele, no entanto, verifica-se comumente a presença de hipoplasia de células germinativas e parada de maturação⁵⁴⁻⁵⁶. Segundo Silber, resultados histológicos com parada de maturação e diminuição do número de espermátides, frequentemente associam-se a testículos com volume normal e a estágios precoces do processo espermatogênico, no entanto, podem ser encontrados espermatozoides no sêmen e diversas espermátides alongadas e espermatozoides maduros nas biópsias testiculares⁵⁷. Adicionalmente, devido ao fato de o estudo contemplar pacientes com graus diversificados de varicocele e nenhum indivíduo azoospérmico, obteve-se grande prevalência de resultados satisfatórios dos índices de Copenhagen, bem como elevados *scores* de Johnsen.

Valores de corte preditivos da melhora da capacidade reprodutiva de homens com varicocele clínica e subclínica baseados em biópsias testiculares foram pioneiramente obtidos por meio deste estudo. Para que a concentração espermática esteja dentro da normalidade estipulada pela OMS, envolvendo as dosagens das gonadotrofinas, foi possível somente a determinação do valor de corte para a dosagem de FSH do grupo 2, que deve ser inferior a 5,4 mUI/mL. Estes resultados estão compatíveis com os valores registrados na literatura⁵⁸. Meeker e colaboradores pesquisaram numa população de aproximadamente 400 homens sem diagnóstico de infertilidade, um valor preditivo de FSH e LH para a concentração de espermatozoides. Os mesmos concluíram que uma dosagem de FSH acima de 10,0 mUI/mL tem um fator prognóstico negativo para a concentração espermática e que se esta for acima de 20,0 mUI/mL, aumenta-se em 5 vezes as chances de oligozoospermia. De modo complementar, uma dosagem de LH acima de 13,0 mUI/mL representou implicações negativas na concentração de espermatozoides⁵⁹. Tsujimura e parceiros, realizaram estudo para estabelecer valores de corte preditivos para o sucesso da extração de espermatozoides testiculares em homens azoospérmicos, utilizando-se como um dos parâmetros de avaliação a dosagem de FSH. Foi evidenciado que quanto maior a concentração do hormônio, menor é a probabilidade de obtenção de espermatozoides, uma vez que a concentração sérica de FSH é inversamente proporcional aos prejuízos na espermatogênese⁶⁰.

Os valores de corte de ambos os grupos pesquisados no que se refere à concentração, motilidade total, motilidade progressiva e morfologia de

espermatozoides, foram calculados por meio dos *scores* de Johnsen e índices de Copenhagen. Os resultados obtidos corroboram com a descrição dos referidos autores, pois segundo Johnsen, um *score* a partir de 8, já implica em liberação de espermatozoides no ejaculado. De modo semelhante, um valor inferior a 2,0 nos dígitos II e III de Copenhagen, representa atividade espermatogênica normal^{39,40}. Diante disso, pode-se sugerir que o resultado histológico testicular ideal para que os parâmetros seminais se mantenham dentro da normalidade após varicocelectomia, devem estar entre 8 a 10 pelo critério de Johnsen. Por outro lado, o resultado histológico com bom prognóstico pelo critério de Copenhagen deve ser 1.1.1.0; 1.2.2.0 e 1.6.1.0. Deste modo, sugere-se que os valores obtidos representem padrões histológicos testiculares com valor prognóstico da melhora da capacidade reprodutiva em pacientes submetidos à varicocelectomia, no entanto, fazem-se necessários estudos mais aprofundados para investigação.

Os valores preditivos referentes aos *scores* de Johnsen do grupo 1, foram consideravelmente superiores aos valores do grupo 2. Tal evento pode se dever ao fato de a varicocele clínica exercer efeitos deletérios mais evidentes sobre a concentração espermática se comparada às varicoceles não palpáveis⁴⁵. Na abordagem do volume testicular como preditor da concentração de espermatozoides, foram obtidos valores de corte fortemente significativos em ambos os grupos pesquisados. Os testículos de um homem adulto pesam aproximadamente 20 gramas e apresentam um volume estimado de 18,6 cm. São constituídos por cerca de 400 a 600 túbulos seminíferos que representam 90% do volume testicular total. Tem sido extensamente documentado que a varicocele desencadeia atrofia testicular e que esta é proporcional ao grau de acometimento⁶¹⁻⁶⁴. Todavia, o uso do volume testicular como preditor da fertilidade em homens com varicocele é controverso. Apesar de Pinto *et al* não obterem resultados favoráveis ao uso deste parâmetro como valor preditivo da capacidade reprodutiva, a hipotrofia testicular permanece ainda como a indicação mais aceitável de correção da varicocele⁶⁵. Além disso, Cocuzza e colaboradores mostraram que quanto maior a presença de espécies reativas de oxigênio (ROS) decorrentes da varicocele, maior é o comprometimento do volume testicular, sobretudo nos casos de varicocele grau III^{66, 67}.

Quanto à motilidade total, progressiva e morfologia de espermatozoides, obtiveram-se predominantemente valores de corte preditivos no grupo 1. De modo curioso, os valores encontrados no referido grupo, são consideravelmente mais elevados

em relação aos do grupo 2. Mediante tal fato, pode-se sugerir que para um homem portador de varicocele subclínica obter resultados da motilidade e morfologia espermáticas dentro dos valores de referência após a varicocelectomia, este deve apresentar índices de Copenhagen, *scores* de Johnsen e volumes testiculares suficientemente adequados e mais significativos que em homens com varicocele clínica. Estes dados corroboram com a literatura, pois se tem registros de estudos que mostram que quanto maior é o grau de varicocele, mais evidentes são os benefícios da varicocelectomia. Dubin e Amelar publicaram um estudo cujo objetivo era avaliar a melhora dos parâmetros seminais em função dos graus de varicocele após correção cirúrgica. Os resultados, porém, não mostraram haver diferenças significativas entre qualidade seminal e graus de varicocele⁶⁸. Entretanto, Jarow *et al* e Takahara *et al* demonstraram benefícios na concentração, motilidade e morfologias espermáticas em pacientes com maiores graus de varicocele após varicocelectomia^{69,70}.

Foi realizado por meio do presente estudo, o acompanhamento da evolução dos parâmetros seminais após reparo cirúrgico da varicocele em ambos os grupos pesquisados. No grupo 1, foi possível observar melhora espermática da motilidade total e progressiva com redução do número de espermatozoides imóveis. Entretanto, a varicocele subclínica não é palpável em exame físico, diagnosticada apenas por ultrassonografia e sua relevância clínica está em amplo debate. Segundo a ASRM, a varicocelectomia não está indicada para pacientes com análise seminal normal e nem para portadores de varicocele subclínica^{20, 49}. De modo semelhante, a *European Association of Urology* (EAU - Associação Europeia de Urologia) por meio da publicação de sua metanálise multicêntrica, não atribui benefícios seminais no reparo cirúrgico de varicoceles não palpáveis⁷¹. Semelhantemente, Yamamoto *et al*, compararam dois grupos de homens portadores de varicocele subclínica, sendo o primeiro grupo composto por 45 pacientes submetidos à varicocelectomia e o segundo grupo formado por 40 indivíduos que foram somente observados. Os resultados mostraram melhora dos parâmetros seminais no grupo tratado cirurgicamente, porém não houve diferença estatística entre ambos os grupos⁷². Em contrapartida, diversos estudos demonstram os benefícios da correção cirúrgica da varicocele subclínica, entre eles está o estudo publicado por Pasqualotto e colaboradores, nos quais, compararam dois grupos de pacientes com varicocele. Um grupo formado por homens acometidos por varicocele de graus II ou III do lado esquerdo e sem varicocele contralateral, e o

outro grupo formado por participantes com o mesmo grau de varicocele do lado esquerdo e com varicocele subclínica do lado direito. Os resultados mostraram que a varicocelectomia melhorou eficazmente os parâmetros seminais no grupo de homens com varicocele palpável e não palpável, do que no grupo de pacientes apenas com varicocele do lado esquerdo. Outro benefício observado foi o aumento do volume testicular nas gônadas acometidas por varicocele em ambos os grupos, porém, houve maior aumento no testículo associado à varicocele subclínica⁷³. Outros estudos relataram notável melhora dos parâmetros seminais no pós-operatório da varicocele subclínica, havendo diversas evidências demonstrando benefícios relevantes na histologia testicular, independentemente do grau de varicocele apresentado⁷⁴. Uma das características mais relevantes da varicocele do ponto de vista fisiopatológico é o fluxo venoso retrógrado causado pela deficiência valvar das veias testiculares. O refluxo de metabólitos renais e suprarrenais pode apresentar efeitos negativos sobre a espermatogênese, sendo, portanto, considerado no presente estudo. Por meio do Doppler colorido, é possível avaliar a presença, a duração e a velocidade do refluxo venoso, além de mensurar o diâmetro das veias gonadais¹⁹. Dhabuwala *et al*, classificaram o refluxo em três graus, numa população de 178 homens inférteis; grau I: refluxo inferior a 2 segundos; grau II e III: refluxo superior a 2 segundos. Está claramente relatado que a duração de refluxo venoso superior a 1 segundo, associa-se a maiores prejuízos na fertilidade, inclusive nos casos de varicocele subclínica⁷⁴. O estudo realizado por Zumrutbas e colaboradores, avaliou a presença de refluxo venoso em função do grau de varicocele numa população de 802 homens. O grupo pertencente à varicocele subclínica (n = 607) apresentou uma porcentagem relevante de refluxo venoso (16.3%), sugerindo a existência de correlações positivas entre refluxo venoso e o grau de varicocele. Apesar de haver uma tendência de maior fluxo retrógrado quanto maior for o grau de varicocele, sua significância em varicoceles não palpáveis é ainda controversa⁷⁵.

A correção microcirúrgica da varicocele clínica está claramente associada a benefícios na concentração, motilidade e morfologia de espermatozoides, todavia, os indivíduos do grupo 2, apresentaram declínio de muitos parâmetros seminais, necessitando-se portanto, de investigações mais acuradas. Além disso, quando se comparou a evolução dos parâmetros seminais entre ambos os grupos pesquisados,

observou-se benefícios mais evidentes no grupo 1, contrapondo-se desta maneira à maioria dos estudos que relatam melhoras mais consistentes em homens com varicocele clínica. De modo complementar, Seftel *et al* e Okeke e colaboradores, publicaram estudos com 30 e 167 homens respectivamente, operados com graus variados de varicocele para determinação da melhora dos parâmetros seminais. Os resultados mostraram benefícios evidentes na concentração e motilidade espermáticas, porém a morfologia manteve-se inalterada ou discretamente reduzida, corroborando deste modo, com os resultados obtidos no presente estudo^{76,77}.

Tem sido extensamente documentada a indicação da varicocelectomia em homens portadores de varicoceles palpáveis que apresentam redução da qualidade seminal e ou hipotrofia testicular^{49, 71}. Embora, a revisão sistemática publicada pela Cochrane em 2009, concluir não haver evidências suficientes que justifiquem o tratamento cirúrgico, Agarwal e colaboradores realizaram um estudo para avaliar os efeitos da varicocelectomia sobre a qualidade dos espermatozoides seminais. Os resultados evidenciaram melhoras significativas das análises realizadas no pós-operatório, quando comparadas à avaliação seminal inicial^{78,79}. Outros estudos incluindo, metanálises, ensaios clínicos controlados e randomizados demonstram de maneira evidente o papel da varicocelectomia na melhora seminal. Dentre estes, está a metanálise multicêntrica publicada por Baazeem *et al*, que mostrou que a correção cirúrgica da varicocele está intimamente associada à melhora seminal e redução do número de espécies reativas de oxigênio⁸⁰. Adicionalmente, o ensaio clínico controlado e randomizado publicado por Madgar *et al*, comparou um grupo de pacientes submetidos à varicocelectomia com um grupo que foi somente observado. Os resultados mostraram benefícios não apenas na qualidade seminal, como também no percentual das taxas de gravidez espontânea⁸¹.

A varicocele clínica está classicamente associada à indução de um “fenômeno de estresse” testicular que afeta vários parâmetros mensuráveis simultaneamente em análises seminais. A maioria dos estudos enfatiza anormalidades na concentração, motilidade e morfologias espermáticas, no entanto, aumento do estresse oxidativo e danos no DNA de espermatozoides são claramente observados⁶⁶. Os parâmetros seminais juntamente com os valores de corte obtidos em nosso estudo, podem

representar fatores prognósticos que denotam o papel da varicocelectomia como uma estratégia de tratamento bem sucedido para subfertilidade masculina.

6 CONCLUSÕES

Frente a nossos resultados, podemos sugerir que:

1. Padrões histológicos testiculares determinados por meio dos resultados de biópsias podem desempenhar um importante papel no prognóstico e na avaliação dos pacientes candidatos à correção microcirúrgica de varicocele. Sendo assim, os valores de corte obtidos por meio dos *scores* de Johnsen e índices de Copenhagen podem representar ferramentas essenciais na tomada de decisões e conduta clínica aos pacientes com varicocele clínica e subclínica.
2. O volume testicular pode representar um importante preditor do potencial fértil de homens acometidos por varicocele clínica e subclínica submetidos à microcirurgia de correção.
3. A histologia testicular de indivíduos acometidos por varicocele clínica e subclínica é equivalente.
4. A correção microcirúrgica da varicocele subclínica pode trazer benefícios evidentes na motilidade total e progressiva de espermatozoides, necessitando-se, todavia, de estudos mais específicos que comprovem tal resultado.

7. ANEXOS

I. **Carta de Aprovação pelo Comitê de Ética e Pesquisa**



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina e-mail: cep.fm@usp.br

APROVAÇÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de **11/04/2012**, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **047/12** intitulado: **“BIÓPSIA DE TESTÍCULO E SUA CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS SEMINAIS E HORMONAIS NA MICROCIRURGIA DE VARICOCELE EM INFERTILIDADE MASCULINA.”** apresentado pelo **Departamento de CIRURGIA.**

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar ao CEP-FMUSP, os relatórios parciais e final sobre a pesquisa (Resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196, de 10/10/1996, inciso IX.2, letra "c").

Pesquisador (a) Responsável: Dr. Jorge Hallak
Pesquisador (a) Executante: Robertson Torres Dutra

CEP-FMUSP, 12 de Abril de 2012.



Prof. Dr. Roger Chammas
Coordenador Comitê de Ética em Pesquisa

II. Valores de Referência – Análise - Seminal

Volume (ml): $\geq 1,5$

Concentração ($\times 10^6$ por mL): ≥ 15

Motilidade total (%): ≥ 40

Motilidade progressiva (%): $\geq 32\%$ (grau a+b)

Morfologia (% normais): ≥ 4

Leucócitos ($\times 10^6$ por ml): $< 1,0$

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Lopes AC. Tratado de Clínica Médica. 2^a ed. São Paulo: Roca; 2014.
2. Athayde KS, Cocuzza M, Agarwal A, Krajcir N, Lucon AM, Srougi M, Hallak J. Development of normal reference values for seminal reactive oxygen species and their correlation with leukocytes and semen parameters in a fertile population. *J Androl.* 2007;28(4):613-20.
3. Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(2):271-85.
4. Kretser DM. Male infertility. *Lancet.* 1997;349(9054):787-90.
5. Sharma R, Biedenharn KR, Fedor JM, Agarwal A. Lifestyle factors and reproductive health: taking control of your fertility. *Reprod Biol Endocrinol.* 2013; 16(11):1-15
6. Pasqualotto FF, Sobreiro BP, Hallak J, Pasqualotto EB, Lucon AM. Cigarette smoking is related to a decrease in semen volume in a population of fertile men. *BJU Int.* 2006; 97(2): 324-6.
7. Pasqualotto FF, Lucon AM, Sobreiro BP, Pasqualotto EB, Arap S. Effects of medical therapy, alcohol, smoking, and endocrine disruptors on male infertility. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo.* 2004;59(6):375-82.
8. Hallak J, Pariz J, Ferrete A, Pieri P. Finasteride 1 Mg Daily Decreases Spermatogenesis, Impairs Sperm Maturity, Decreases LH Levels in Young Men in Reproductive Age: Initial Report. Thirty-ninth Annual Conference of the American Society Andrology; 2013;13-16; Santo Antonio, United States.
9. Hallak J, Pariz J, Ferrete A, Pieri P. Marijuana consumption affects the male reproductive health. Thirty-ninth Annual Conference of the American Society Andrology; 2013;13-16; Santo Antonio, United States.
10. Souza GL, Hallak J. Anabolic steroids and male infertility: a comprehensive review. *BJU Int.* 201;108(11):1860-5.

11. Berookhim BM, Schlegel PN. Azoospermia due spermatogenic failure. *Urol Clin North Am.* 2014;41(1):97-113.
12. Pasqualotto FF, Sobreiro BP, Hallak J, Pasqualotto EB, Lucon AM. Induction of spermatogenesis in azoospermic men after varicocelectomy repair: an update. *Fertil Steril.* 2006;85(3):635-9.
13. McLachlan RI. Approach to the patient with oligozoospermia. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(3): 873-80.
14. Wosnitzer MS, Goldstein M. Obstructive azoospermia. *Urol Clin North Am.* 2014;41(1):83-95
15. McIntyre M, Hsieh TC, Lipshultz L. Varicocele repair in the era of modern assisted reproductive techniques. *Curr Opin Urol.* 2012; 22(6):517-20.
16. Masson P, Brannigan RE. The varicocele. *Urol Clin North Am.* 2014;41(1):129-44.
17. Shiraishi K, Matsuyama H, Takihara H. Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. *Int J Urol.* 2012; 19(6): 538-50.
18. Anawalt BD. Approach to male infertility and induction of spermatogenesis. *J Clin Endocrinol Metab.* 2013;98(9):3532-42.
19. Naughton C, Nangia A, Agarwal A. Varicocele in male infertility: part II: pathophysiology of varicocele in male infertility. *Hum Reprod Update.* 2001; 7(5):473-81.
20. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Report on varicocele and infertility. *Fertil Steril.* 2008; 86 (1):93-5.
21. Diamond DA, Zurakowski D, Bauer SB, Borer JG, Peters CA, Cilento BG Jr, Paltiel HJ, Rosoklija I, Retik AB. Relationship of varicocele grade and testicular hypotrophy to semen parameters in adolescents. *J Urol.* 2007;178(4):1584-8.

22. Sabanegh ES. Male infertility: problems and solutions. New York: Humana Press; 2011.
23. Sakamoto H, Ogawa Y, Yoshida H. Relationship between testicular volume and varicocele in patients with infertility. *Urology*. 2008;71(1):104-9.
24. Will MA, Swain J, Fode M, Sonksen J, Christman GM, Ohl D. The great debate: varicocele treatment and impact on fertility. *Fertil Steril*. 2011; 95(3):841-52.
25. Mehta A, Goldstein M. Microsurgical varicocelectomy: a review. *Asian J Androl*. 2013;15(1):56-60.
26. Nieschlag E, Behre HM, Nieschlag S. *Andrology: male reproductive health and dysfunction*. Germany: Springer; 3ed.; 2010.
27. Openstax College. *Anatomy and physiology*. United States:Openstax college, 2013.
28. Schlatt S, Ehmccke J. Regulation of Spermatogenesis: an evolutionary biologist's perspective. *Semin Cell Dev Biol*. 2014; 29:2-16.
29. Silber SJ, Rodriguez-Rigau LJ. Quantitative analysis of testicle biopsy: determination of partial obstruction and prediction of sperm count after surgery. *Fertil Steril*. 1981; 36(4):480-5.
30. Levin HS. Testicular biopsy in the study of male infertility. *H pathology*. 1979; 10(5): 569-84.
31. Tournaye H, Clasen K, Aytöz A, Nagy Z, Van Steirteghem A, Devroey P. Fine needle aspiration versus open biopsy for testicular sperm recovery: a controlled study in azoospermic patients with normal spermatogenesis. *Hum Reprod*. 1998; 3(4):901-4.
32. Carpi A, Menchini Fabris F, Gorini I, Gaeta P, Romani R, Marchetti A. A percutaneous large-needle aspiration biopsy technique for histologic examination of the testis in infertile patients. *Fertil Steril*. 1999;71(4):756-60.

33. Carpi A, Agarwal A, Sabanegh E, Todeschini G, Balercia G. Percutaneous biopsy of the testicle: A mini review with a proposal flow chart for non-obstructive azoospermia. *Ann Med.* 2011;43(2):83-9.
34. Benoff SH, Millan C, Hurley IR, Napolitano B, Marmar JL. Bilateral increased apoptosis and bilateral accumulation of cadmium in infertile men with left varicocele. *Hum Reprod.* 2004;19(3):616-27.
35. Carpi A, Menchini Fabris FG, Palego P, Di Coscio G, Romani R, Nardini V, Rossi G. Fine-needle and large-needle percutaneous aspiration biopsy of testicles in men with nonobstructive azoospermia: safety and diagnostic performance. *Fertil Steril.* 2005;83(4):1029-33.
36. Shin DH, Turek PJ. Sperm retrieval techniques. *Nat Rev Urol.* 2013;10(12):723-30.
37. Harrington TG, Schauer D, Gilbert BR. Percutaneous testis biopsy: an alternative to open testicular biopsy in the evaluation of the subfertile man. *J Urol.* 1996;156(5):1647-51.
38. Shaida N, Berman LH. Percutaneous testicular biopsy for indeterminate testicular Lesions. *Br J Radiol.* 2012;85(1):54-8.
39. Johnsen SG. Testicular biopsy score count: a method for regist. 1979; *Hormones*; 1:2-25.
40. McLachlan RI, Rajpert-De Meyts E, Hoei-Hansen CE, de Kretser DM, Skakkebaek NE. Histological evaluation of the human testis—approaches to optimizing the clinical value of the assessment: Mini Review. *Hum Reprod.* 2007; 22(1): 2-16.
41. Schoor RA, Elhanbly S, Niederberger CS, Ross LS. The role of testicular biopsy in the modern management of male infertility. *J Urol.* 2002; 167(1):197-200.
42. Cerilli LA, Kuang W, Rogers D. A Practical Approach to Testicular Biopsy Interpretation for Male Infertility. *Arch Pathol Lab Med.* 2010; 134(8): 1197-204.

43. Mubarak M. Histopathological patterns of testicular biopsy in male infertility: A retrospective study from a tertiary care center in the western part of Saudi Arabia. *Urol. Ann.* 2013; 5(3):221.
44. Feig C, Kirchoff C, Ivell R, Naether O, Schulze W, Spiess AN. A new paradigm for profiling testicular gene expression during normal and disturbed human spermatogenesis. *Mol Hum Reprod.* 2007 Jan;13(1):33-43.
45. Barazani Y, Nagler HM. Other work has highlighted the limitations of using histopathology to predict success after varicocele. *Fertil Steril.* 2011;95(2):487.
46. World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4th ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 1999.
47. Skakkebaek NE, Hultén M, Jacobsen P, Mikkelsen M. Quantification of human seminiferous epithelium II: Histological studies in eight 47 XYY men. *J Reprod Fertil.* 1973; 32(3):391-401.
48. Hajian-Tilaki K. Receiver Operating Characteristic (ROC) Curve Analysis for Medical Diagnostic Test Evaluation. *Caspian J Intern Med.* 2013; 4(2): 627-635.
49. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Report on varicocele and infertility: a committee opinion. *Fertil Steril.* 2014; 102 (6):1556-60.
50. Gat Y, Gornish M, Navon U, Chakraborty J, Bachar GN, Ben-Shlomo I. Right varicocele and hypoxia, crucial factors in male infertility: fluid mechanics analysis of the impaired testicular drainage system. *Reprod Biomed Online.* 2006;13(4):510-5.
51. Bryniarski P, Kaletka Z, Huk J, Fryczkowski M, Prokopowicz G, Zyczkowski M, Muskała B, Taborowski P, Paradysz A. Testicular volume and fertility potential in men operated due to varicocele and testicular hypotrophy in adolescence. *Cent European J Urol.* 2013; 66(1): 56-9.

- 52.** Lewin A, Weiss DB, Friedler S, Ben-Shachar I, Porat-Katz A, Meirow D, Schenker JG, Safran A. Delivery following intracytoplasmic injection of mature sperm cells recovered by testicular fine needle aspiration in a case of hypergonadotropic azoospermia due to maturation arrest. *Hum Reprod.* 1996;11(4):769-71.
- 53.** Friedler S, Raziel A, Strassburger D, Soffer Y, Komarovsky D, Ron-El R. Testicular sperm retrieval by percutaneous fine needle sperm aspiration compared with testicular sperm extraction by open biopsy in men with non-obstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 1997;12(7):1488-93.
- 54.** Mori MM, Bertolla RP, Fraietta R, Ortiz V, Cedenho AP. Does varicocele grade determine extent of alteration to spermatogenesis in adolescents? *Fertil Steril.* 2008;90(5):1769-73.
- 55.** Abdel Raheem A, Garaffa G, Rushwan N, De Luca F, Zacharakis E, Abdel Raheem T, Freeman A, Serhal P, Harper JC, Ralph D. Testicular histopathology as a predictor of a positive sperm retrieval in men with non-obstructive azoospermia. *BJU Int.* 2013;111(3):492-9
- 56.** Hwang K, Lamb DJ. Diagnostic testicular biopsy before varicocele repair plays a realistic and important role. *Fertil Steril.* 2011;95(2):488-91.
- 57.** Silber SJ. Microsurgical TESE and the distribution of spermatogenesis in nonobstructive azoospermia. *Hum Reprod.* 2000;15(11):2278-84.
- 58.** Ravel R. Laboratório clínico. 6^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2007.
- 59.** Meeker JD, Godfrey-Bailey L, Hauser R. Relationships between serum hormone levels and semen quality among men from an infertility Clinic. *J Androl.* 2007; 28(3): 397-406.
- 60.** Tsujimura A, Miyagawa Y, Takao T, Fujita K, Komori K, Matsuoka Y, Takada S, Koga M, Takeyama M, Fujioka H, Matsumiya K, Okuyama. Impact of age, follicle

stimulating hormone and Johnsen's score on successful sperm retrieval by microdissection testicular sperm extraction. *Reprod Med Biol.* 2005; 4:53-57.

61. Chen SS. Predictive factors of successful redo varicocelectomy in infertile patients with recurrent varicocele. *Andrologia.* 2014;46(7): 738-43.
62. Condorelli R, Calogero AE, La Vignera S. Relationship between testicular volume and conventional or nonconventional sperm parameters. *Int J Endocrinol.* 2013.
63. Alukal JP, Zurakowski D, Atala A, Bauer SB, Borer JG, Cilento BG, Mandell J, Peters CA, Paltiel HJ, Retik AB, Diamond D. Testicular hypotrophy does not correlate with grade of adolescent varicocele. *J Urol.*2005;174:2367-70.
64. Zini A, Buckspan M, Berardinucci D, Jarvi K. The influence of clinical and subclinical varicocele on testicular volume. *Fertil Steril.* 1997;68(4):671-4.
65. Pinto KJ, Kroovand RL, Jarow JP. Varicocoele related testicular atrophy and its predictive effect upon fertility. *J Urol.* 1994;152(2):788-90.
66. Cocuzza M, Athayde KS; Agarwal A, Pagani R, Sikka SC, Lucon AM, Srougi M, Hallak J. Impact of clinical varicocele and testis size on seminal reactive oxygen species levels in a fertile population: a prospective controlled study. *Fertil Steril.* 2008;90(4):1103-8.
67. Cocuzza M, Athayde KS, Alvarenga C, Srougi M, Hallak J. Grade 3 varicocele in fertile men: a different entity. *J Urol.* 2012;187(4):1363-8.
68. Dubin L, Amelar RD. Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. *Fertil Steril* 1970;21(8):606-9.
69. Jarow JP, Ogle SR, Eskew LA. Seminal improvement following repair of ultrasound detected subclinical varicocele. *J Urol.* 1996;155(4):1287-90.
70. Takahara M, Ichikawa T, Shisek Y, Nakamura T, Shimazaki J. Relationship between grade of varicocele and response to varicocelectomy. *Int J Urol.* 1996;3:282-285.

- 71.** Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, Krausz C; European Association of Urology Working Group on Male Infertility. European Association of Urology guidelines on male infertility: The 2012 update. *Eur Urol.* 2012;62(2):324-32.
- 72.** Yamamoto M, Hibi H, Hirata Y, Miyake K, Ishigaki T. Effects of varicocelectomy on sperm parameters and pregnancy rates in patients with subclinical varicocele: a randomized prospective controlled study. *J Urol.* 1996; 155:1636-1638.
- 73.** Pasqualotto FF, Lucon AM, de Góes PM, Sobreiro BP, Hallak J, Pasqualotto EB, Arap S. Is it worthwhile to operate on subclinical right varicocele in patients with grade II–III varicocele in the left testicle? *J Assist Reprod Genet.* 2005;22(5):227-31.
- 74.** Dhabuwala CB, Kumar AB, Kerkar PD, Bhutawala A, Pierce J. Patterns of doppler recordings and its relationship to varicocele in infertile men. *Int J Androl.* 1989;12(6):430-8.
- 75.** Zumrutbas AE, Resolu B, Yesil M, Yaman O. Is the presence of venous reflux really significant in the diagnosis of varicocele? *Int Urol Nephrol.* 2008;40(4):983-7.
- 76.** Seftel AD, Rutchik SD, Chen H, Stovsky M, Goldfarb J, Desai N. Effects of subinguinal varicocele ligation on sperm concentration, motility and kruger morphology. *J Urol.* 1999; 158 (5):1800-3.
- 77.** Okeke L, Ikurowo O, Chiekwe I, Etukakpan B, Shittu O, Olapade-Olaopa O. Is varicocelectomy indicated in subfertile men with clinical varicoceles Who have asthenospermia or teratospermia and normal sperm density? *Int J Urol.* 2007; 14(8):729-32.
- 78.** Evers JL, Collins JA. Surgery or embolization for varicoceles in subfertile men. *Cochrane Database Syst Rev.* 2009; 21: (1).

- 79.** 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.
- 80.** Baazeem A, Belzile E, Ciampi A, Dohle G, Jarvi K, Salonia A, Weidner W, Zini A. Varicocele and male infertility treatment: a new metanalysis and review of the role of varicocele repair. *Eur Urol*. 2011;60(4):796-808.
- 81.** Madgar I, Weissenberg R, Lunenfeld B, Karasik A, Goldwasser B. Controlled Trial of high spermatic vein ligation for varicoele in infertile men. *Fertil Steril*. 1995;63(1):120-4.