Marcello Antonio Signorelli Cocuzza

Avaliação do impacto da varicocele clínica no volume testicular, parâmetros seminais e níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen de homens com fertilidade comprovada

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de: Urologia
Orientador: Dr. Jorge Hallak

São Paulo

2011

Marcello Antonio Signorelli Cocuzza

Avaliação do impacto da varicocele clínica no volume testicular, parâmetros seminais e níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen de homens com fertilidade comprovada

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo para obtenção do
título de Doutor em Ciências

Programa de: Urologia
Orientador: Dr. Jorge Hallak

São Paulo

2011

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Cocuzza, Marcello Antonio Signorelli

Avaliação do impacto da varicocele clínica no volume testicular, parâmetros
seminais e níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen de homens com fertilidade
comprovada / Marcello Antonio Signorelli Cocuzza. -- São Paulo, 2011.

Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Urologia.

Orientador: Jorge Hallak.

Descritores: 1.Varicocele 2.Fertilidade 3.Espécies de oxigênio reativas
4.Análise do sêmen 5.Testículo 6.Infertilidade masculina

USP/FM/DBD-308/11

Dedicatória

Aos Pacientes,

A razão primeira da medicina, suas ciências e
deste estudo.

Aos meus pais, Maria Bernadete e Antonio Luiz,

Meus maiores exemplos de valores morais.

Obrigado pela inspiração na minha incursão na Medicina, na Urologia e na Ciência.

Obrigado pelo estímulo contínuo em todos os aspectos de minha vida pessoal e profissional.

Acima de tudo, obrigado por oferecerem, aos dois filhos, proteção eterna, absorvendo nossas tristezas, amortecendo nossas quedas e vibrando com nossas conquistas.

“O maior bem que podemos fazer aos outros não é oferecer-lhes nossa riqueza, mas levá-los a descobrir suas próprias.”

Émile Louis V. Laveleye (1822 -1892)

À minha esposa, Mariana,

Minha princesa, minha alegria, minha vida.

O carinho e a compreensão serão eternos...

“Amo como ama o amor. Não conheço nenhuma outra razão para amar senão amar. Que queres que te diga, além de que te amo, se o que quero dizer-te é que te amo?”

Fernando Pessoa (1888 – 1935)

Aos meus filhos, Anita e Caio,

Minhas paixões, meus amores, razão, motivo e
inspiração.

Aprendizado diário do verdadeiro significado
do amor incondicional.

Agradecimientos

AGRADECIMENTOS

- Ao meu avô Carmelo Cocuzza, *in memoriam*, pelo pioneirismo da medicina e urologia em nossa família.
- Ao meu irmão, Christiano, presença integral em minha vida durante minha formação como pessoa e médico.
- Ao Dr. Jorge Hallak, amigo e orientador, pelo inestimável estímulo e apoio durante minha formação na andrologia. Pelo exemplo de amor a pesquisa, sempre em busca de novos conhecimentos.
- À Dra. Kelly Athayde, pela amizade e estímulo. Pelos ensinamentos de todos os testes e técnicas laboratoriais aqui apresentadas, essenciais na realização desse estudo.
- Ao Prof. Dr. Miguel Srougi, pelo suporte, incentivo e por todo o apoio necessário a realização deste trabalho.
- Ao Dr. Jose Roberto Colombo Jr., pelo companheirismo, amizade e inestimável suporte desde o primeiro dia em que me conheceu. Pela paciência no início das minhas noções básicas de pesquisa. Pelo orgulho e honra de ter me chamado de irmão.
- À Adriana Sanudo, pelo exemplo de força e superação na vida. Pela ajuda e ensinamentos nas análises estatísticas essenciais a realização deste estudo.

- À Valéria Lira, pelo esforço e simplicidade durante os momentos difíceis.
Pelo carinho, empenho e talento natural durante a realização dos desenhos utilizados nesta Tese.
- Ao Dr. Ashok Agarwal, pela amizade e orientação durante meu *fellowship* no Departamento de Urologia da Cleveland Clinic.
- Ao Prof. Dr. Clovis Artur Almeida da Silva, pela amizade, estímulo, exemplo de espírito acadêmico e valiosa orientação na minha formação.
- Ao Prof. Dr. Sami Arap, pela amizade e estímulo constante em busca de novos conhecimentos durante toda minha residência.
- Ao Dr. Conrado Alvarenga, pela amizade, energia constante, e pela ajuda durante a elaboração desta Tese.
- À Dra. Patricia Pieri, Dr. Renato Fraietta e Dr. Marcos Machado, pelas valiosas sugestões durante a aula de qualificação.
- À Juliana Andrietta, sou grato pela ajuda e dedicação na realização dos testes essenciais nesse estudo.
- À Eliana Amora, exemplo de mãe e avó, pelo amor, atenção e carinho essencial na vida da família.
- À Dra. Adele Lapin, pela amizade, carinho maternal e suporte a minha família.

- À Família Fonseca e Stocchero, pela amizade e apoio sempre presentes.
Sobrenomes que adicionei aos meus filhos.
- À Sra. Elisa de Arruda Cruz da Silva, pela ajuda integral durante a pós-graduação. Exemplo de competência e dedicação a Disciplina de Urologia.
- A todos os Professores, Residentes, Enfermeiros e Funcionários da Disciplina de Urologia do Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo, pela amizade, respeito e suporte durante minha formação ética e profissional.

Epígrafe

“Servir-se de sábios é uma grandeza especial. Há muito que conhecer, a vida é curta e não se vive se não se sabe. É, portanto, uma habilidade especial aprender muito de muitos, sabendo tanto como todos. Aqueles que não puderem ter a sabedoria como serva, devem tê-la ao menos como companheira.”

Baltazar Gracian, 1601 - 1658

CONFLITO DE INTERESSE

Este projeto não apresenta nenhum conflito de interesse.

O desenvolvimento desta pesquisa ocorreu no Laboratório de Andrologia do Centro de Reprodução Humana Governador Mário Covas – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de julho de 2004 a janeiro de 2006 e no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental – Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de julho de 2007 a abril de 2010.

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias / elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria Fazanelli Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. – São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação - DBD/FMUSP, 2011.

Abreviaturas dos títulos de periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicu*

SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas

Lista de Figuras

Lista de Tabelas

RESUMO

SUMMARY

1	INTRODUÇÃO.....	2
1.1	Considerações sobre a infertilidade masculina.....	2
1.2	Considerações sobre os radicais livres de oxigênio.....	5
1.3	Considerações sobre a varicocele.....	15
2	OBJETIVOS.....	21
3	MÉTODOS.....	23
3.1	Local do estudo.....	23
3.2	Seleção dos pacientes.....	23
3.3	Critérios de avaliação dos pacientes.....	25
3.4	Exame físico.....	26
3.5	Análise Seminal.....	27
3.5.1	Avaliação macroscópica.....	28
3.5.1.1	Volume.....	28
3.5.1.2	pH.....	28
3.5.2	Avaliação microscópica.....	28
3.5.2.1	Concentração Espermática.....	29
3.5.2.2	Número total de espermatozoides.....	30
3.5.2.3	Número total de espermatozoides móveis.....	30
3.5.2.4	Motilidade espermática.....	30
3.5.2.5	Morfologia espermática.....	32
3.5.2.5.1	Critério da Organização Mundial da Saúde.....	32
3.5.2.5.2	Critério estrito de Kruger.....	33
3.6	Teste de leucocitospermia (Endtz).....	35
3.7	Mensuração do nível de ROS em sêmen puro.....	36
3.8	Análise estatística.....	39

4	RESULTADOS.....	41
4.1	Comparação dos parâmetros seminais, volume testicular e níveis de ROS no sêmen entre os grupos FSV, FCV e INF.....	41
4.1.1	Comparação da idade entre os grupos FSV, FCV e INF.....	41
4.1.2	Distribuição do tabagismo entre os grupos FSV, FCV e INF.....	42
4.1.3	Comparação do volume testicular entre os grupos FSV, FCV e INF.....	43
4.1.4	Frequência de varicocele bilateral nos grupos FCV e INF.....	44
4.1.5	Comparação dos parâmetros seminais entre os grupos FSV, FCV e INF.....	44
4.1.6	Comparação dos níveis de ROS no sêmen entre os grupos FSV, FCV e INF.....	46
4.2	Impacto do grau de varicocele nos parâmetros seminais, volume testicular e níveis de ROS seminais no grupo FCV.....	47
4.2.1	Distribuição do grau de varicocele no grupo FCV.....	47
4.2.2	Frequência de varicocele bilateral de acordo com o grau de varicocele no grupo FCV.....	48
4.2.3	Comparação da idade no grupo FCV de acordo com o grau de varicocele.....	49
4.2.4	Distribuição do tabagismo no grupo FCV de acordo com o grau de varicocele.....	50
4.2.5	Comparação do volume testicular no grupo FCV de acordo com o grau de varicocele.....	51
4.2.6	Comparação dos parâmetros seminais no grupo FCV de acordo o grau de varicocele.....	52
4.2.7	Comparação dos níveis de ROS no sêmen no grupo FCV de acordo com o grau de varicocele.....	54
4.3	Comparação dos parâmetros seminais, volume testicular e níveis de ROS no sêmen entre os grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele.....	56
4.3.1	Distribuição do grau de varicocele entre os grupos FCV e INF.....	56
4.3.2	Frequência de varicocele bilateral nos grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele.....	57
4.3.3	Comparação da idade entre os grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele.....	58
4.3.4	Distribuição do tabagismo nos grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele.....	59
4.3.5	Comparação do volume testicular entre os grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele.....	60
4.3.6	Comparação dos parâmetros seminais entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 1.....	60

4.3.7	Comparação dos níveis de ROS no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 1.....	62
4.3.8	Comparação dos parâmetros seminais entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 2.....	63
4.3.9	Comparação dos níveis de ROS no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 2.....	63
4.3.10	Comparação dos parâmetros seminais entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 3.....	66
4.3.11	Comparação dos níveis de ROS no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 3.....	68
4.4	Correlação dos níveis de ROS no sêmen com parâmetros seminais, idade, volume testicular e grau de varicocele nos grupos FCV e INF.....	69
4.5	Correlação do grau de varicocele com parâmetros seminais, idade, volume testicular e níveis de ROS no sêmen no grupo FCV.....	71
4.6	Curva ROC (do inglês: <i>Receiver Operating Characteristic</i>) e cálculo da área sob a curva nos grupos FCV e INF utilizando o valor de ROS no sêmen.....	73
5	DISCUSSÃO.....	76
6	CONCLUSÕES.....	113
7	ANEXOS.....	116
8	REFERÊNCIAS.....	118

ABREVIATURAS

°C	graus Celsius
μL	- microlitro
μm	- micrômetro
ΔTc	- variação dos valores de controle
ΔTp	variação dos valores para sêmen puro
ROS	- radicais livres de oxigênio (do inglês: <i>Reactive Oxygen Species</i> – ROS)
[C]	- concentração de espermatozoides
cpm	- fótons por minuto
DNA	- ácido desoxirribonucleico
G6PDH	- glicose-6-phosphato desidrogenase
SOD	- superóxido dismutase
GPx	- glutathione peroxidase
H ₂ O ₂	- peróxido de hidrogênio
HEPES	- tampão bicarbonato de sódio
HTF	- meio de cultura utilizado em laboratório de andrologia (do inglês: “human tubal fluid – HTF”) – sem tradução para língua portuguesa
ICSI	- injeção intracitoplasmática de espermatozoide (do inglês: <i>Intracytoplasmic Sperm Injection</i> – ICSI)
FSV	- férteis sem varicocele
FCV	- férteis com varicocele
INF	- inférteis
FIV	- fertilização <i>in vitro</i>

LPO	peroxidação lipídica (do inglês: <i>Lipid Peroxidation</i> - LPO)
DMSO	- dimetil sulfóxido
mmol	- milimol
min	- minutos
ml	- mililitro
mm	- milímetro
mm ²	- milímetro quadrado
Nº	- número
NADPH	- nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase
ROOH	- peróxido
$\cdot\text{O}_2^-$	- ânion superóxido
$\text{OH}^\cdot$	- radical hidroxila
OCl^-	- íon hipoclorito
spz	- espermatozoides
ROC	- <i>Receiver Operating Characteristic</i> – sem tradução para língua portuguesa
HRP	- peroxidase de raiz forte (do inglês: <i>Horseradish peroxidase</i> – HRP)
ROS	- radicais livres de oxigênio (do inglês: <i>Reactive Oxygen Species</i> – ROS)
IC	- interval de confiança
ASC	- área sob a curva
rpm	- rotações por minuto
s	- segundos
t	- tempo

LISTA DE SIGLAS

OMS	Organização Mundial da Saúde
ASRM	Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (do inglês: <i>American Society for Reproductive Medicine</i> – ASRM)
AUA	Associação Urológica Americana (do inglês: <i>American Urologic Association</i> – AUA)
CAPPesq	Comissão de Ética para a Análise de Projetos de Pesquisa
EUA	Estados Unidos da América
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
SPSS	programa estatístico (do inglês: <i>Statistical Package for Social Science</i>) – sem tradução para língua portuguesa
ANOVA	Análise de variância
MBE	Medicina Baseada em Evidência

LISTA DE SÍMBOLOS

[]	-	concentração
$\geq$	-	igual ou maior
$\leq$	-	igual ou menor
$\pm$	-	mais/menos
$<$	-	menor
$>$	-	maior
$=$	-	igual a
x	-	vezes
%	-	por cento

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Mecanismo em cascata de formação do Radical Livre	7
Figura 2.	Mecanismo relacionado à geração dos Radicais Livres de Oxigênio e seus efeitos no espermatozoide.....	11
Figura 3.	Causas ambientais, urológicas e sistêmicas relacionadas ao estresse oxidativo, disfunção espermática e infertilidade masculina.....	14
Figura 4.	Mecanismos envolvidos na fisiopatologia da varicocele	17
Figura 5.	Orquidômetro de Prader	26
Figura 6.	Procedimento de mensuração do nível de ROS no sêmen puro.....	38
Figura 7.	Distribuição de tabagismo de acordo com o grupo.....	42
Figura 8.	Comparação dos níveis de ROS no sêmen entre os grupos	47
Figura 9.	Distribuição do grau de varicocele no grupo FCV.....	48
Figura 10.	Distribuição do tabagismo no grupo FCV de acordo com o grau de varicocele.....	50
Figura 11.	Comparação dos níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen no grupo FCV de acordo com grau de varicocele.....	55
Figura 12.	Distribuição do grau de varicocele de acordo com grupo.....	56
Figura 13.	Comparação dos níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 1	63
Figura 14.	Comparação dos níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 2	66
Figura 15.	Comparação dos níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 3	68
Figura 16.	Curva ROC realizada para diferenciar homens férteis com varicocele dos inférteis utilizando os níveis de ROS no sêmen.....	73

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Exemplos de moléculas altamente reativas.....	8
Tabela 2.	Principais antioxidantes presentes no sêmen humano.....	12
Tabela 3.	Classificação da morfologia conforme o critério estabelecido pela Organização Mundial da Saúde e o critério estrito de Kruger	34
Tabela 4.	Comparação da idade dos homens de acordo com grupo	39
Tabela 5.	Comparação do tamanho testicular de acordo com o grupo	41
Tabela 6.	Frequência de varicocele bilateral entre os grupos FCV e INF	44
Tabela 7.	Comparação dos parâmetros seminais entre os grupos FSV, FCV e INF	44
Tabela 8.	Comparação dos níveis de ROS no sêmen entre os grupos	46
Tabela 9.	Distribuição do grau de varicocele no grupo FCV.....	47
Tabela 10.	Frequência de varicocele bilateral de acordo com o grau de varicocele nos homens FCV.....	48
Tabela 11.	Comparação da idade no grupo FCV de acordo com o grau da varicocele	49
Tabela 12.	Comparação do volume testicular no grupo FCV de acordo com o grau de varicocele	51
Tabela 13.	Comparação dos parâmetros seminais nos pacientes férteis de acordo com o grau de varicocele.....	53
Tabela 14.	Comparação dos níveis de ROS no sêmen no grupo FCV de acordo com o grau de varicocele.....	55
Tabela 15.	Distribuição do grau de varicocele de acordo com grupo.....	56
Tabela 16.	Frequência de varicocele bilateral nos grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele.....	57

Tabela 17. Comparação da idade entre os grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele.	58
Tabela 18. Comparação do tabagismo entre os grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele.....	59
Tabela 19. Comparação do tamanho testicular entre os grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele.....	60
Tabela 20. Comparação dos resultados dos parâmetros seminais entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 1	61
Tabela 21. Comparação dos níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 1	62
Tabela 22. Comparação dos parâmetros seminais entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 2	64
Tabela 23. Comparação dos níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 2	65
Tabela 24. Comparação dos parâmetros seminais entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 3	67
Tabela 25. Comparação dos níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 3	68
Tabela 26. Correlação dos níveis de ROS no sêmen com parâmetros seminais, idade, volume testicular e grau de varicocele nos grupos FSV e FCV	70
Tabela 27. Correlação do grau de varicocele com parâmetros seminais, idade, volume testicular e níveis de ROS no sêmen no grupo FCV	72
Tabela 28. Valores de corte de ROS utilizados na melhor diferenciação dos grupos FCV e INF com suas respectivas sensibilidades, especificidades e acurácias.....	74

RESUMO

Cocuzza MAS. Avaliação do impacto da varicocele clínica no volume testicular, parâmetros seminais e níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen de homens com fertilidade comprovada [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2011.

Apesar da maioria dos estudos mostrarem que parâmetros seminais anormais, redução do volume testicular e elevação dos níveis de radicais livres de oxigênio (ROS) no sêmen estão associados à presença de varicocele em homens inférteis, a maioria dos homens com varicocele apresenta os parâmetros seminais normais e são capazes de estabelecer gravidez em suas esposas. Nesse sentido, a avaliação desses parâmetros ainda não foi adequadamente estudada em homens com fertilidade comprovada e que apresentam varicocele. Esse estudo teve como objetivo estudar o impacto da varicocele clínica em homens férteis avaliando o volume testicular, parâmetros tradicionais da análise seminal e níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen. Esses parâmetros foram avaliados em 113 homens férteis sem varicocele, 43 homens férteis com varicocele e 38 pacientes inférteis com varicocele. A medida do volume testicular foi realizada utilizando-se orquidômetro de Prader. Os parâmetros seminais foram avaliados manualmente segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) e a morfologia avaliada conforme os critérios da OMS e estrito de Kruger. Os níveis de ROS foram mensurados em sêmen puro utilizando-se a quimioluminescência. Os pacientes inférteis com varicocele apresentaram diminuição dos parâmetros seminais, redução do volume testicular e elevação dos níveis de ROS no sêmen em comparação com os homens férteis, com ou sem varicocele. Os homens férteis com varicocele não apresentaram diferenças significativas em nenhum dos parâmetros avaliados quando comparados aos homens férteis sem varicocele. No entanto, os homens férteis com varicocele grau 3 apresentaram menor concentração espermática e níveis de ROS no sêmen mais altos quando comparados àqueles com grau 1 ou 2. Além disso, o grau de varicocele nos homens férteis apresentou correlação negativa com a concentração espermática e positiva com os níveis de ROS no sêmen. A dosagem dos ROS no sêmen poderá ajudar, principalmente, na avaliação dos homens com varicocele que apresentam parâmetros seminais normais, e quando o potencial de fertilidade ainda não foi testado. A dosagem de ROS no sêmen pode representar um marcador mais sensível e específico no diagnóstico precoce da disfunção testicular, principalmente, nos homens férteis com varicocele grau 3.

Descritores: varicocele; fertilidade; espécies de oxigênio reativas; análise do sêmen; testículo; infertilidade masculina

SUMMARY

Cocuzza MAS. Avaliação do impacto da varicocele clínica no volume testicular, parâmetros seminais e níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen de homens com fertilidade comprovada [thesis]. Faculty of Medicine, University of Sao Paulo, SP (Brazil); 2011.

Although the majority of the studies showed that abnormal seminal parameters, reduced testicular volume and high levels of seminal reactive oxygen species (ROS) are frequently associated with varicocele in infertile population, the majority of the men with varicocele present normal seminal parameters and are able to establish a pregnancy. In view of that, the evaluation of these semen parameters in fertile men with varicocele has not yet been well documented. The objective of our study was to evaluate the impact of clinical varicocele in fertile men assessing testicular volume, routine seminal parameters and seminal ROS levels. These parameters were evaluated in 113 fertile men without varicocele, 43 fertile men with clinical varicocele and 38 infertile patients with varicocele. Testicular volume was measured with a Prader orchidometer. Seminal parameters were assessed according to World Healthy Organization (WHO) guidelines and morphology according to WHO as well as Kruger's strict criteria. Measurement of seminal ROS in neat semen was performed using a chemiluminescence assay. Infertile men with varicocele presented lower semen parameters, reduced testicular volume and higher seminal ROS levels compared with fertile men with or without varicocele. Although fertile men with varicocele presented all parameters evaluated similar to fertile men without varicocele, fertile men with varicocele grade 3 presented lower sperm concentration and higher seminal ROS levels compared with fertile men with varicocele grade 1 or 2. In addition, varicocele grade infertile men presented a negative correlation with sperm concentration and a positive correlation with seminal ROS levels. Men with unknown fertility status presenting with palpable varicocele and normal seminal parameters, the presence of increased ROS levels may be indicative of an early recognition of those subjects who will experience a progressive decrease in fertility potential if left untreated, especially in those presenting with varicocele grade 3.

Key Words: varicocele; fertility; reactive oxygen species; semen analysis; testis; male infertility

1. INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

1.1 Considerações sobre a infertilidade masculina

A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que aproximadamente 80 milhões de pessoas ao redor do mundo apresentem problemas relacionados à infertilidade¹. De acordo com a Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (em inglês: *American Society for Reproductive Medicine* – ASRM), a infertilidade é considerada uma doença do sistema reprodutor, cujas funções não se encontram em estado normal, que é constatada após um período de doze meses de tentativa de concepção sem sucesso, em que o casal manteve relações sexuais sem a utilização de nenhum método contraceptivo². Atualmente, estima-se que a infertilidade atinja 10% a 20% dos casais em idade reprodutiva, independente de suas origens étnicas ou sociais³⁻⁶.

O advento da fertilização *in vitro* (FIV), divulgado ao mundo inicialmente por Palermo et al.⁷, em 1992, incorporou inúmeros benefícios à reprodução humana, possibilitando a paternidade aos homens com infertilidade decorrente de causas graves. Sendo assim, até mesmo homens com azoospermia não obstrutiva, considerados previamente estéreis, podem gerar seus próprios filhos biológicos por meio da injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) no oócito^{8,9}. No entanto, os resultados promissores rapidamente difundidos pelo mundo e a possibilidade de sua utilização como forma de tratamento na maior parte das causas de infertilidade masculina, diminuiu o interesse tanto pelo diagnóstico específico de doenças potencialmente curáveis quanto na pesquisa de novas opções de reais

tratamentos da infertilidade¹⁰. Nesse sentido, a importância da avaliação do homem infértil e a possibilidade de tratamento andrológico visando à restituição da fertilidade têm sido relegadas a segundo plano, em parte, por estratégias financeiras. Sendo assim, a FIV tem sido universalmente utilizada mesmo sabendo-se que doenças potencialmente graves podem ser encontradas em homens inférteis e que sua descoberta se dá apenas pela investigação cuidadosa e abrangente⁷.

A Associação Urológica Americana (AUA) e a ASRM produziram em conjunto diretrizes abrangendo vários aspectos do diagnóstico e tratamento adequados da infertilidade masculina visando um melhor custo-benefício com menor risco¹¹. O desenvolvimento dessas diretrizes práticas foi realizado utilizando-se como base estudos publicados com os melhores níveis de evidência disponíveis. Apesar do crescente estímulo à utilização dessas recomendações, os pacientes recorrem, frequentemente, com ou sem orientação profissional, a “tratamentos” com limitada evidência científica sem a prévia realização de exames diagnósticos essenciais. Além disso, a utilização amplamente difundida da internet na sociedade moderna permite acesso fácil a informações com grande variação na qualidade, podendo levar a falsas expectativas quanto à utilidade de métodos diagnósticos ou ilusões inapropriadas de opções de tratamentos impulsivos e resultados superestimados. Isso tudo reforça a necessidade dos médicos especialistas melhorarem seu conhecimento das bases do diagnóstico e tratamento da infertilidade com objetivo de restabelecer a fertilidade natural do casal sempre que possível.

Em 30% dos casais que não conseguem engravidar, o homem é o único responsável pela causa da infertilidade, sendo que causas femininas associadas às masculinas ocorrem em 20% dos casos^{12,13}. Sendo assim, pode-se dizer que

problemas masculinos estão presentes em cerca de 50% dos casais inférteis. Pelo fato dos problemas masculinos serem tão comuns, é essencial a investigação do homem infértil, iniciando-se com um histórico individual e familiar detalhado, além do exame físico completo. A avaliação do homem infértil engloba alguns objetivos sendo o principal deles a identificação de condições reversíveis que possibilitem, após o tratamento, o retorno do potencial de fertilidade espontânea do casal. Objetiva-se também a detecção de causas irreversíveis nas quais possam ser empregados corretamente os métodos disponíveis de reprodução assistida. Além destes, outro objetivo é o diagnóstico de causas irreversíveis que não permitam a utilização de nenhum método de fertilização assistida, oferecendo assim uma informação real da condição do casal, evitando desgastes desnecessários na realização de procedimentos não efetivos com custos e riscos excessivos. Outra situação importante é a detecção de alterações genéticas responsáveis pela infertilidade masculina com potencial de transmissão para os descendentes. Atualmente, ainda não são totalmente conhecidos os riscos genéticos e as implicações futuras da aplicação das técnicas de reprodução assistida, particularmente em homens com oligozoospermia grave ou azoospermia, tendo em vista que 28% desses pacientes apresentam microdeleção no cromossomo Y, alterações do cariótipo ou mutações dos genes relacionados à fibrose cística¹⁴. Sendo assim, a avaliação do homem permite ao casal um adequado conhecimento do potencial de fertilidade e possíveis opções terapêuticas, bem como, a obtenção de aconselhamento genético sempre que indicado.

1.2 Considerações sobre os radicais livres de oxigênio

Na última década, ocorreram avanços consideráveis na compreensão do processo reprodutivo masculino nos aspectos biológico, molecular e genético¹⁵. Esses avanços ressaltaram a importância do conhecimento da fisiologia do espermatozoide e da compreensão do mecanismo de fertilização, culminando com a introdução de marcadores bioquímicos de função espermática^{16,17}.

Defeitos na função espermática são responsáveis por aproximadamente 20% das causas de infertilidade masculina, envolvendo uma extensa gama de alterações das funções como movimento anormal do flagelo, falha no reconhecimento da zona pelúcida e inibição da fusão do espermatozoide com o oócito¹⁸⁻²³. Apesar de a análise seminal ser a ferramenta disponível mais utilizada na rotina de prática clínica, esse exame possui importantes limitações relacionadas à etiologia da disfunção espermática, assim como na determinação da capacidade de fertilização do espermatozoide. Aproximadamente 25% dos homens com análise seminal normal não conseguem engravidar suas parceiras, permanecendo sem diagnóstico da causa da infertilidade e sendo classificados como portadores de infertilidade idiopática²⁴. A introdução de marcadores de função espermática na prática clínica possibilitaria uma avaliação mais precisa da etiologia da disfunção do espermatozoide, contribuindo para o correto diagnóstico dos casos classificados como idiopáticos. Além disso, marcadores de função espermática poderiam ser utilizados como fatores prognósticos das taxas de gravidez, tanto espontânea quanto por meio dos métodos de reprodução assistida. Nesse sentido, foram descritos alguns testes nos últimos anos, incluindo reação acrossômica, penetração espermática e hemizona, níveis de creatina quinase,

radicais livres de oxigênio (em inglês: *Reactive Oxygen Species* – ROS), citocinas como Interleucina 6, capacidade antioxidante total, peroxidação lipídica e teste de fragmentação do ácido desoxirribonucleico (DNA)²⁵⁻³³. Além desses, recentemente foram descritas diferenças no perfil proteico do plasma seminal entre homens férteis e inférteis, podendo servir como mais um marcador diagnóstico de infertilidade masculina³⁴.

Nível aumentado de ROS tem sido demonstrado no sêmen de 25% a 40% dos homens inférteis^{35,36}. A toxicidade proveniente do oxigênio é um desafio inerente à vida. Os efeitos danosos das altas concentrações de oxigênio são atribuídos à formação de ROS³⁷. O radical livre é altamente reativo quimicamente, sendo definido como qualquer átomo, molécula ou fragmento de molécula contendo um ou mais elétrons desemparelhados nas suas camadas de valência³⁸. Essa última propriedade permite que os radicais livres reajam com as moléculas mais próximas, tornando-as, assim, novos radicais livres, iniciando uma reação em cadeia, com rápida oxidação de biomoléculas vizinhas, podendo representar influência negativa no funcionamento normal das células ao redor³⁹ (Figura 1).

O sêmen humano pode apresentar alguns tipos de células incluindo células epiteliais, células redondas provenientes de vários estágios da espermiogênese, leucócitos, espermatozoides maduros e imaturos. Destas células, os leucócitos e espermatozoides imaturos são reconhecidos como os maiores produtores de radicais livres^{40,41}.

Figura 1 – Mecanismo em cascata de formação do radical livre

As moléculas altamente reativas produzidas por essas células incluem alguns dos principais radicais de oxigênio, como o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$), o radical hidroxila ($\text{OH}^{\cdot}$), o íon hipoclorito (OCl^-) e o peróxido de hidrogênio (H_2O_2)⁴² (Tabela 1). Apesar da definição de ROS originalmente proposta incluir a existência de um ou mais elétrons não pareados em sua órbita mais externa, nem todos os radicais livres possuem essa propriedade⁴³. O peróxido de hidrogênio pode ser utilizado como exemplo observando-se sua estrutura molecular sem elétron livre ilustrado na Tabela 1. Desta maneira, apesar de serem convencionalmente chamados de “radicais livres de oxigênio”, existe uma tendência de mudança da nomenclatura para espécies reativas de oxigênio ou simplesmente moléculas altamente reativas.

Tabela 1 – Exemplos de moléculas altamente reativas

Moléculas	Fórmula química	Estrutura molecular
Ânion superóxido	$\cdot\text{O}_2^-$	
Peróxido de Hidrogênio	H_2O_2	
Radical hidroxila	$\text{OH}\cdot$	
Íon hipoclorito	OCl^-	

O metabolismo aeróbico normal está relacionado ao nível ideal de radicais livres que depende do equilíbrio entre os processos de produção e de eliminação desses radicais. Em condições normais, o espermatozoide produz pequenas quantidades de radicais livres necessários à realização de processos fisiológicos normais, como a capacitação, reação acrossômica e fusão do espermatozoide com o óvulo^{44,45}. No entanto, esses radicais livres gerados são continuamente neutralizados por meio de mecanismos de defesa, sendo o principal deles mediado pelos antioxidantes presentes no plasma seminal⁴⁶. Quando ocorre um aumento na produção de radicais livres ou uma insuficiente neutralização pelos antioxidantes, institui-se uma situação denominada estresse oxidativo^{18,35}. Aparentemente, o desequilíbrio entre ROS e antioxidantes é principalmente secundário ao aumento da produção de ROS, sendo dificilmente causado pela diminuição da capacidade antioxidativa seminal¹⁸.

Dois sistemas são propostos como geradores de ROS⁴⁷. O primeiro sistema é relacionado a fosfato de nicotinamida adenina dinucleotídeo desidrogenase (NADPH) oxidase estando presente na membrana plasmática. Neste, a enzima citoplasmática glicose-6-fosfato desidrogenase (G6PDH) controla a taxa de fluxo de glicose e a disponibilidade intracelular de NADPH através da via alternativa hexose monofosfato. O segundo sistema está relacionado à NADPH dependente de óxido redutase (diaforase), ocorre na peça intermediária e está integrado no sistema respiratório da mitocôndria do espermatozoide⁴⁸. O sistema mitocondrial é a maior fonte de ROS na membrana interna dos espermatozoides de homens inférteis, onde ocorre a fosforilação oxidativa⁴⁹. O espermatozoide humano produz o ânion superóxido (O_2^-) que, apesar de não ser muito prejudicial às células pela baixa reatividade e meia vida curta, transforma-se espontaneamente em peróxido de hidrogênio (H_2O_2)⁵⁰. O peróxido de hidrogênio é relativamente estável, contém alto potencial oxidativo e atravessa livremente a membrana do espermatozoide. A baixa concentração de ferro catalisa a formação do radical hidroxil ($\text{OH}^\bullet$) a partir do ânion superóxido (O_2^-) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2), sendo esse evento chamado de reação de Fenton^{51,52}.

Reação de Fenton

Por fim, o radical hidroxil ($\text{OH}^\bullet$), sendo altamente reativo, reage com qualquer componente celular e seus efeitos tóxicos são limitados apenas por sua meia-vida curta⁵⁰. Quando a produção excessiva desse radical ocorre dentro do espermatozoide, alguns efeitos relacionados à disfunção dessa célula são desencadeados, incluindo a peroxidação lipídica, dano a integridade do DNA do núcleo e ao DNA mitocondrial. O

DNA da mitocôndria parece ser mais sensível ao dano oxidativo que o DNA nuclear por não possuir histonas, que exercem um papel protetor no DNA nuclear, e também por apresentar pobre atividade reparadora da DNA polimerase mitocondrial em relação à nuclear. O estresse oxidativo produz um dano extenso nas proteínas e modificações no citoesqueleto, além de inibir mecanismos celulares⁵³. Além disso, causa alterações importantes na motilidade dos espermatozoides por danos peroxidativos dos radicais livres à membrana plasmática⁵⁴. A membrana plasmática dos espermatozoides é extremamente sensível aos ROS pela sua composição rica em ácidos graxos poli-insaturados, particularmente o ácido decosaenoico que contém seis duplas ligações por molécula. Os radicais livres causam a peroxidação lipídica ao oxidarem essas duplas ligações dos ácidos graxos insaturados da membrana plasmática. A peroxidação lipídica em cadeia resulta na perda da fluidez da membrana e consequente perda de sua função⁵⁰. Sendo assim, os espermatozoides são mais suscetíveis ao dano peroxidativo se comparados a outras células. Os espermatozoides dos mamíferos possuem uma exclusiva composição estrutural. Na fase final da espermatogênese, os espermatozoides sofrem importantes alterações morfológicas, especialmente a extrusão de grande parte do seu citoplasma. Durante o processo de eliminação do citoplasma, ocorre formação de gotículas citoplasmáticas que contém o citoplasma residual. Essas gotículas possuem altas concentrações de enzimas citoplasmáticas, incluindo a glicose-6-fosfato desidrogenase e a superóxido dismutase (SOD)⁵⁵. Os espermatozoides contendo essas gotículas são imaturos, apresentam alterações funcionais e constituem uma fonte importante de radicais livres^{16,56}. Portanto, a redução do citoplasma resulta na diminuição da capacidade de defesa dessas células, propiciando que elevados níveis de ROS resultem em disfunção espermática. A Figura 2 ilustra os mecanismos envolvidos na geração dos ROS e disfunção do espermatozoide.

Figura 2 – Mecanismo relacionado à geração dos Radicais Livres de Oxigênio e seus efeitos no espermatozoide

O corpo humano apresenta uma série de mecanismos para neutralizar e reparar os danos causados pelo excesso de ROS. Apesar de o ejaculado conter fontes produtoras de ROS, o plasma seminal concentra uma grande variedade de antioxidantes essenciais no mecanismo de defesa do espermatozoide^{42,53} (Tabela 2).

Tabela 2 – Principais antioxidantes presentes no sêmen humano

Antioxidantes enzimáticos

Superóxido dismutase

Catalase

Glutathione peroxidase

Antioxidantes de baixo peso molecular

α -tocoferol

β -caroteno

Ascorbato

Urato

Antioxidantes quelantes de Metais de transição

Transferrina

Lactoferrina

Caeruloplasmina

As enzimas antioxidantes encontradas no citoplasma do espermatozoide, incluindo a superóxido dismutase, glutathione peroxidase (GPx) e a catalase, não são eficientes contra ROS extracelulares⁵⁷. De maneira semelhante, os antioxidantes do plasma seminal não apresentam efeito significativo quando a produção é principalmente intracelular. A avaliação da efetividade de qualquer antioxidante de forma isolada parece ser muito complexa, tendo em vista que existe um sinergismo de ação entre inúmeros antioxidantes tanto enzimáticos como não enzimáticos.

Alguns estudos suportam o conceito de que a presença de estresse oxidativo é uma das principais causas de infertilidade masculina⁵⁸⁻⁶⁰. A elevação dos níveis de

ROS no sêmen está associada não somente à diminuição do potencial de fertilização natural, mas também com a redução da capacidade de fertilização durante métodos de reprodução assistida, como a FIV clássica e a ICSI⁶¹⁻⁶³. A identificação da fonte de produção, dos mecanismos de geração e dos danos causados pelos ROS poderiam representar importância vital no diagnóstico e tratamento desses pacientes⁶⁴. O mecanismo crítico da geração patológica de ROS e o sistema de proteção antioxidante no sêmen estão começando a ser elucidados para fins terapêuticos, porém mais estudos são necessários para direcionar as possibilidades de aplicação clínica⁴².

Algumas condições clínicas especiais estão relacionadas ao aumento da quantidade de ROS no sêmen. A presença de infecção do trato urinário ocasiona aumento de leucócitos no sêmen, estando também associada a alterações dos parâmetros seminais e níveis aumentados de ROS⁶⁴⁻⁶⁷. Pacientes com lesão da medula espinhal tendo alterações neurológicas associadas apresentam diminuição da motilidade e morfologia seminal, assim como, aumento dos níveis de ROS³⁶. O mecanismo sugerido para essas alterações estaria relacionado à estase no sistema reprodutivo dos pacientes com lesão neurológica, em associação à provável presença de leucócitos frequentemente presentes nessas condições. Além desses fatores, estilo de vida, idade avançada, poluição ambiental, drogas ilícitas, tabagismo e varicocele também já foram associados ao estresse oxidativo^{17, 68-73}. Condições sistêmicas como diabetes, câncer ou infecções também estão relacionadas ao desequilíbrio da produção dos ROS no corpo humano¹⁸. A Figura 3 resume os eventos que correlacionam o estresse oxidativo à infertilidade masculina.

Figura 3 – Causas ambientais, urológicas e sistêmicas relacionadas ao estresse oxidativo, disfunção espermática e infertilidade masculina

1.3 Considerações sobre a varicocele

Varicocele é uma condição envolvendo a dilatação anormal do plexo pampiniforme que realiza a drenagem venosa dos testículos. Na atualidade, a correção cirúrgica da varicocele é o procedimento mais realizado no tratamento da infertilidade masculina⁷⁴. Apesar do reconhecimento na literatura da existência da varicocele provir de séculos passados, somente em 1889, Bennet⁷⁵ demonstrou melhora da análise seminal após a correção cirúrgica bilateral em um paciente. Algumas décadas mais tarde, Tulloch⁷⁶, em 1952, publicou o primeiro caso de correção de varicocele bilateral em um paciente azoospermico, o que posteriormente resultou em uma gravidez espontânea. No entanto, somente em 1955, quando Tulloch⁷⁷ publicou a primeira série de resultados de pacientes submetidos à varicocelectomia, o procedimento passou a ser reconhecido como um importante tratamento na infertilidade masculina. Macleod⁷⁸, em 1965, foi o primeiro a relatar que a maioria dos pacientes com infertilidade e varicocele apresentava diminuição da concentração espermática, diminuição da motilidade e aumento dos espermatozoides com formas anormais. Posteriormente, em 1992, a OMS publicou alguns importantes aspectos do impacto da varicocele na fertilidade masculina. Esse estudo identificou varicocele em 25,4% dos homens com parâmetros seminais anormais contra apenas 11,7% nos homens sem alterações nos parâmetros seminais avaliados. O mesmo estudo mostrou associação da presença de varicocele clínica com a diminuição do volume testicular ipsilateral a varicocele⁷⁹. Na população de homens com infertilidade primária, a incidência de varicocele é de aproximadamente 35%, enquanto nos homens com infertilidade secundária a incidência chega a 80%.

Além disso, Canales et al.⁸⁰ avaliaram 354 homens voluntários para investigação de câncer prostático com idade média de 60 anos e encontraram varicocele em 42% dos homens examinados. Essa alta incidência em homens com idade avançada e naqueles apresentando infertilidade secundária sugere um aspecto progressivo dessa condição⁸¹⁻⁸³. Nos adolescentes, a incidência é semelhante a dos adultos, sendo o pico de seu aparecimento entre os 14 e 15 anos de idade⁸⁴.

Muitas hipóteses já foram propostas como sendo responsáveis pela fisiopatologia da varicocele, incluindo o mecanismo de contracorrente ocasionando aumento da temperatura escrotal, hipóxia causada pela estase venosa, diluição dos substratos intratesticulares, desequilíbrios do eixo hipotálamo-hipófise-gonadal, alteração da função acrossômica, aumento da concentração seminal do cátion cádmio, refluxo de metabólitos renais e da suprarrenal para a veia espermática⁸⁵⁻⁸⁷. Estudos mais recentes mostraram haver elevação dos níveis de ROS em pacientes com varicocele^{88,89}. Todos os mecanismos envolvidos acabam por determinar apoptose celular resultando em diminuição da espermatogênese⁸⁷. No entanto, o exato mecanismo responsável pela disfunção testicular associada à varicocele ainda não está totalmente elucidado, sendo provavelmente multifatorial⁹⁰. A Figura 4 demonstra a sequencia de eventos desencadeados pela presença da varicocele que resultam na lesão celular.

Figura 4 – Mecanismos envolvidos na fisiopatologia da varicocele

O conceito da relação entre varicocele e infertilidade é baseado em três aspectos importantes: 1) aumento da incidência de varicocele entre os homens com infertilidade⁷⁹; 2) associação entre varicocele e alteração de parâmetros seminais e diminuição do volume testicular⁷⁹; e 3) melhora dos parâmetros seminais e chance de gravidez após a correção cirúrgica de varicocele clínica^{91,92}. Apesar de esses aspectos mostrarem a estreita relação entre varicocele e infertilidade masculina, ainda existem duas questões importantes não perfeitamente respondidas. Primeira, por que 85% dos homens com varicocele conseguem engravidar suas parceiras naturalmente^{24,93-95}? Segunda, por que um número significativo de pacientes não restabelece a fertilidade

ou apresenta melhora dos parâmetros seminais após a correção cirúrgica da varicocele⁹⁶⁻⁹⁸?

Atualmente, a correção cirúrgica da varicocele é indicada nos pacientes inférteis com diagnóstico de varicocele clínica na presença de pelo menos um dos parâmetros seminais clássicos alterado (concentração, motilidade e morfologia) e/ou diminuição do volume testicular ipsilateral à varicocele. A melhora em um ou mais parâmetros seminais após a correção cirúrgica da varicocele tem sido relatada em aproximadamente 65% dos casos^{74,98-100}. Além disso, as taxas de gravidez dos casais anteriormente considerados inférteis são significativamente maiores após a varicocelectomia, em comparação aos casais em que o homem não foi submetido à cirurgia⁹⁸. No entanto, os métodos de investigação utilizados na atualidade, como a análise seminal e exame físico, não são suficientes para indicar com clareza quais pacientes se beneficiariam da correção cirúrgica da varicocele.

Estudos mais recentes demonstraram níveis elevados de ROS no sêmen de pacientes inférteis com varicocele, assim como em doadores de sêmen com varicocele diagnosticada incidentalmente, mas sem paternidade comprovada^{41,101,102}. No entanto, o real valor dos parâmetros seminais no diagnóstico da infertilidade masculina ainda não foi comprovado¹⁰³. Sendo assim, homens apresentando parâmetros seminais normais não podem ser considerados férteis na ausência de gravidez espontânea comprovada em suas parceiras. Homens selecionados da população geral sem prévia comprovação de paternidade, previamente considerados uma população ideal para criação de valores de referência, apresentam concentração de espermatozoides menor e motilidade maior quando comparados a homens com paternidade comprovada¹⁰⁴. A dosagem do radical livre no sêmen parece representar

um marcador mais sensível e preciso para o diagnóstico de infertilidade quando comparado aos parâmetros mensurados na análise seminal de rotina^{27,105}. Atualmente não existe ainda um consenso sobre a utilização dos níveis de ROS no sêmen na prática clínica. Isso ocorre pela falta de interesse e investimento no aprimoramento dessa tecnologia, tanto nos laboratórios de andrologia, como nas clínicas de reprodução assistida. Além disso, em 2010, a OMS classificou a mensuração dos níveis de ROS no sêmen, como um exame a ser realizado somente em pesquisa¹⁰⁶. Apesar disso, alguns laboratórios de andrologia em centros especializados têm utilizado esse marcador como uma ferramenta adicional na avaliação da fertilidade do homem após sua adequada padronização.

Nos últimos anos, vários laboratórios de andrologia publicaram a padronização dos níveis de ROS no sêmen em suas respectivas populações de homens férteis e inférteis^{57,66,67,102,107,108}. No entanto, a avaliação dos níveis de ROS no sêmen de homens com varicocele e fertilidade comprovada foi pouco relatada até o presente momento¹⁰⁹. Embora existam evidências clínicas da associação da varicocele com infertilidade masculina, a maioria dos homens com varicocele consegue estabelecer gravidez natural em suas parceiras e apresenta os parâmetros seminais dentro dos limites considerados normais pela OMS^{79,95,106,110}. Sendo assim, o conhecimento dos valores de ROS no sêmen de homens férteis com varicocele poderia ajudar na decisão do tratamento daqueles que não apresentam alteração na análise seminal e quando o potencial de fertilidade ainda não foi devidamente testado.

2. OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

Os objetivos deste estudo são:

1. Estudar o impacto da varicocele clínica em homens com fertilidade comprovada avaliando o volume testicular, critérios da análise seminal convencional e níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen.
2. Avaliar a correlação entre os níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen com os parâmetros da análise seminal e volume testicular dos pacientes férteis, com e sem varicocele.
3. Determinar a sensibilidade e especificidade da dosagem de radicais livres de oxigênio no sêmen como marcador de diferenciação entre os homens férteis com varicocele e pacientes inférteis com varicocele.

3. MÉTODOS

3 MÉTODOS

3.1 Local do estudo

As avaliações clínicas foram realizadas no Ambulatório de Urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP). As análises seminais e dosagens dos níveis de ROS no sêmen foram realizadas no Laboratório de Andrologia do Centro de Reprodução Humana Governador Mário Covas – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de Julho de 2004 a Janeiro de 2006 e no Laboratório de Poluição Atmosférica Experimental – Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, de Julho de 2007 a Abril de 2010.

3.2 Seleção de Pacientes

O presente estudo foi aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) da Diretoria Clínica do HCFMUSP sob Protocolo de Pesquisa número 0685/07 (Anexo 1). Todos os homens incluídos no estudo concordaram com os termos do consentimento previamente aprovado pela comissão de pesquisa.

Quinhentos e trinta e cinco homens foram avaliados para a pesquisa. Do total, 445 homens foram voluntários à realização de vasectomia no Ambulatório de Andrologia da Divisão de Clínica Urológica do HCFMUSP, sendo estes considerados uma população comprovadamente fértil e tendo todos, no mínimo, dois filhos previamente à avaliação.

O grupo controle foi selecionado a partir dos 90 pacientes restantes, provenientes do Ambulatório de Infertilidade Masculina do Centro de Reprodução Humana Governador Mário Covas do HCFMUSP. Todos esses pacientes apresentavam varicocele clínica e não conseguiram engravidar suas parceiras após, pelo menos, 12 meses sem uso de nenhum método contraceptivo pelo casal, sendo classificados como população infértil segundo a ASRM². Além disso, todos esses pacientes apresentavam alteração em pelo menos um dos seguintes parâmetros seminais, concentração, motilidade ou morfologia. As respectivas esposas foram devidamente avaliadas no Departamento de Ginecologia do HCFMUSP, sendo excluídas possíveis causas femininas da infertilidade do casal. A avaliação dessas mulheres incluiu avaliação clínica, laboratorial e histerosalpingografia.

Os seguintes critérios de exclusão foram aplicados a todos os homens avaliados:

- Uso de droga ilícita ou medicação com interferência na função testicular;
- Histórico de exposição a substâncias tóxicas, ambientais ou ocupacionais;
- Antecedente de doenças sistêmicas ou tropicais;
- Cirurgia prévia na região inguinal ou genital;
- Antecedente de criptorquia;
- Antecedente de orquite pós-caxumba;
- Homens que apresentaram no exame físico: estenose de meato uretral, hipospádia, alteração anatômica dos epidídimos ou ductos deferentes que sugerissem processo obstrutivo ou possível anomalia congênita;
- Azoospermia;
- Número superior a 1×10^6 de leucócitos / mL no sêmen (Teste de Endtz positivo).

Ao final da avaliação e aplicação dos critérios de exclusão, 194 homens foram incluídos no estudo, sendo divididos em três grupos:

113 Homens férteis sem varicocele (FSV)	43 Homens férteis com varicocele (FCV)	38 Pacientes inférteis (INF)
--	---	--

3.3 Critérios de Avaliação dos Pacientes

Os três grupos selecionados foram avaliados conforme os critérios abaixo listados:

- Exame físico para mensuração do volume testicular e classificação da varicocele, quando presente;
- Análise seminal com determinação do volume seminal, pH, número total de espermatozoides, concentração espermática, número total de espermatozoides móveis, motilidade total, motilidade progressiva (a + b), motilidade grau a, motilidade grau b, motilidade grau c, motilidade grau d, morfologia dos espermatozoides conforme critérios estabelecidos pela OMS e critério estrito de Kruger;
- Teste de leucocitospermia (Endtz);
- Mensuração do nível de ROS no sêmen puro;
- Cariótipo de linfócitos em sangue periférico e pesquisa de microdeleção do cromossomo Y nos pacientes com concentração de espermatozoides inferior a 5 milhões/ml;

- Os grupos foram analisados e comparados com objetivo de verificação da homogeneidade de acordo com as seguintes variáveis:
 - Idade;
 - Tabagismo (sim ou não);
 - Distribuição do grau de varicocele;
 - Presença de varicocele clínica bilateral.

3.4 Exame físico

O Exame físico urológico foi realizado em todos os homens pelo mesmo examinador. O volume testicular foi aferido com o orquidômetro de Prader¹¹¹, estando o paciente em decúbito dorsal. Este método gráfico para mensuração do volume testicular utiliza um conjunto de 12 modelos, de forma elipsóide, feitos de plástico com volumes de 1cm^3 , 2cm^3 , 3cm^3 , 4cm^3 , 5cm^3 , 6cm^3 , 8cm^3 , 10cm^3 , 12cm^3 , 15cm^3 , 20cm^3 e 25cm^3 (Figura 5). O volume testicular foi estimado por meio de comparação visual ao conjunto de modelos durante a palpação dos testículos.

Figura 5 - Orquidômetro de Prader

O exame físico para pesquisa de varicocele foi realizado em consultório aquecido, estando os pacientes em posição ortostática e solicitada realização de manobra de Valsava. A varicocele foi classificada, quando presente, de acordo com o critério modificado de Dubin & Amelar¹¹². Nos casos em que se evidenciou a presença de varicocele clínica bilateral, o lado com maior grau foi utilizado na classificação final.

- Grau 1: Dilatação do cordão espermático palpável somente durante a manobra de Valsalva;
- Grau 2: Dilatação do cordão espermático palpável sem a manobra de Valsalva;
- Grau 3: Dilatação volumosa do cordão espermático visível sem a manobra de Valsalva.

3.5 Análise Seminal

A análise foi realizada de acordo com as normas estabelecidas pela OMS¹¹³. Todas as amostras de sêmen foram obtidas em salas apropriadas para coleta por meio de masturbação. Recipiente plástico de boca larga identificado, estéril e atóxico, foi utilizado na coleta das amostras. Todos os pacientes realizaram a coleta com abstinência sexual de 48 a 72 horas. Os pacientes que apresentaram perda seminal durante a coleta foram submetidos à nova coleta após período adequado de abstinência.

3.5.1 Avaliação macroscópica

3.5.1.1 Volume

O volume do ejaculado foi medido por aspiração de toda a amostra com o auxílio de uma pipeta graduada (Eppendorff, Hamburg, Alemanha).

3.5.1.2 pH

O pH seminal foi dosado utilizando-se papel medidor de pH (faixa de pH 6,1 a 10).

3.5.2 Avaliação Microscópica

As amostras foram acondicionadas em uma incubadora (Fisher, Ontário, Canadá), à temperatura de 37°C, por 20 a 30 minutos, para que se procedesse à liquefação seminal. A avaliação microscópica inicial foi realizada após homogeneização do sêmen com o uso do agitador de tubos vortex (modelo AP 56, Cole-Parmer, São Paulo, Brasil), em velocidade média durante 5 segundos, determinando-se os seguintes parâmetros abaixo descritos.

3.5.2.1 Concentração espermática

A concentração espermática foi determinada através de câmaras de contagem do tipo Makler (Makler Counting Chamber – Mid Atlantic Diagnostics, Inc. Mount Laurel, EUA). A câmara de Makler possui uma profundidade de 0,01 mm e marcação graduada de 100 quadrados (área total de 1 mm²), cada um com 0,1 mm x 0,1 mm. O volume compreendido na área de 10 quadrados após a colocação da lamínula é de 0,001 mm³ ou milhão por ml. Sendo assim, a leitura direta da concentração da amostra de sêmen (10⁶/ ml) foi realizada pela simples contagem dos espermatozoides (spz) presentes na área de dez quadrados. Alíquota de 5 µl de sêmen liquefeito foi colocado no centro da câmara de contagem e, após a colocação de lamínula, a contagem foi realizada em microscopia de fase, com aumento de 200 vezes (objetiva x 20). Todos os espermatozoides móveis e imóveis foram contados em três fileiras não consecutivas. A concentração espermática foi determinada pela média da contagem das três fileiras, expressa em milhões de espermatozoides por mililitro de sêmen (10⁶/ ml).

Concentração espermática (10 ⁶ / ml) = N° de espermatozoides móveis + imóveis
--

3.5.2.2 Número total de espermatozoides

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

$\text{Nº total de espermatozoides (x10}^6\text{)} = \frac{\text{Concentração espermática x volume seminal}}{\text{seminal}}$

3.5.2.3 Número total de espermatozoides móveis

O número total de espermatozoides móveis no sêmen foi determinado pela multiplicação do número de espermatozoides móveis em milhões por mililitro pelo volume do ejaculado em mililitro. O valor é descrito em milhões ($\times 10^6$).

$\text{Nº total de espermatozoides móveis (x 10}^6\text{)} = \frac{\text{Concentração de espermatozoides móveis x volume seminal}}{\text{móveis x volume seminal}}$

3.5.2.4 Motilidade espermática

A avaliação da motilidade quantitativa e qualitativa, segundo os padrões estipulados pela OMS¹¹³, foi realizada na mesma câmara de contagem Makler com microscopia de fase, em aumento de 200 vezes (objetiva x 20). Alíquota de 5µl de sêmen foi colocada na câmara, sendo realizada avaliação de 100 espermatozoides.

Esse procedimento foi realizado duas vezes, sendo que em casos de diferença superior a 10% entre as duas avaliações, uma terceira contagem foi realizada. A média dessas avaliações foi utilizada no cálculo da motilidade. A motilidade espermática foi definida pela multiplicação do número de espermatozoides móveis por 100, dividido pela concentração espermática. O resultado foi expresso em porcentagem.

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

Com relação à motilidade qualitativa, os espermatozoides avaliados para a determinação da motilidade quantitativa foram distribuídos nas categorias a, b e c, de acordo com o grau de movimento. As definições dos graus de motilidade foram classificadas segundo as recomendações da OMS¹¹³. A motilidade total foi calculada a partir da soma das porcentagens de espermatozoides grau a, b e c. A motilidade progressiva foi calculada a partir da soma da motilidade grau a e grau b, segundo recomendações da OMS⁹⁴.

- Motilidade grau a – espermatozoides móveis com progressão rápida;
- Motilidade grau b – espermatozoides móveis com progressão lenta;
- Motilidade grau c – espermatozoides móveis, porém sem progressão;
- Motilidade grau d – espermatozoides imóveis.

3.5.2.5 Morfologia espermática

Na avaliação da morfologia espermática, foram preparadas lâminas pela técnica de esfregaço seminal. As lâminas foram coradas por corante tipo Panótico, constituído de três soluções: fixante, corante I e corante II. Cada lâmina foi imersa cinco vezes na primeira solução, após secas, três vezes no corante I, seguido de cinco imersões no corante II. O excesso dos corantes foi retirado com suave gotejamento de água destilada sobre as lâminas. Após a secagem em temperatura ambiente foi aplicado cimento celular (meio de inclusão rápida para microscopia [Entellan, Merck catálogo # 1079610100, São Paulo, Brasil]) para aderência da lamínula, conservando o aspecto do material corado. Duzentas células espermáticas, sob microscopia de imersão (1000x, objetiva x100), foram avaliadas em cada amostra. Dois tipos de classificação da morfologia foram realizados, conforme o critério estabelecido pela OMS e o critério estrito de Kruger, descritos em detalhes a seguir^{113,114}.

3.5.2.5.1 Critério da Organização Mundial de Saúde

Segundo o critério da OMS, o espermatozoide foi considerado normal quando a cabeça media entre 4,0 e 5,0 μm de comprimento e 2,5 e 3,5 μm de largura, sem apresentar defeitos grosseiros da cauda, peça intermediária ou gotas citoplasmáticas. A peça intermediária foi considerada normal quando media valor inferior a 1 μm de largura. A cauda foi considerada normal quando seu comprimento apresentava valor aproximado de 45 μm .

3.5.2.5.2 Critério estrito de Kruger

Segundo o critério estrito de Kruger, o espermatozoide foi considerado normal quando seu segmento cefálico possuía configuração oval, absolutamente perfeita, medindo entre 5 e 6 μm de comprimento e 2,5 e 3,5 μm de largura¹¹⁵. Além disso, quando possuía o acrossomo bem definido, abrangendo cerca de 40% a 70% da porção cefálica do espermatozoide. Os segmentos cefálicos com formato limítrofe foram considerados anormais, assim como a presença de qualquer vacúolo. A existência de qualquer anormalidade na peça intermediária ou na cauda foi considerada anormal. A peça intermediária foi considerada normal quando se apresentava delgada, anexada à parte central do corpo, medindo menos de 1 μm de largura, sendo o comprimento aproximadamente uma vez e meia o do segmento cefálico. A presença de inclusão citoplasmática também foi considerada anormal. A cauda foi considerada normal quando se apresentava uniforme, ligeiramente mais fina que a peça intermediária, medindo aproximadamente 45 μm , não podendo estar em espiral.

Sendo o critério estrito de Kruger mais rígido na classificação da morfologia espermática em comparação com o critério da OMS, os valores de referência sugeridos são significativamente inferiores. A Tabela 3 compara os dois critérios utilizados na classificação da morfologia espermática.

Tabela 3 – Classificação da morfologia conforme o critério estabelecido pela Organização Mundial da Saúde e o critério estrito de Kruger

Características do espermatozoide	Critério da Organização Mundial de Saúde ¹¹⁶	Critério Estrito de Kruger ¹¹⁴
Segmento Cefálico		
Comprimento	4 - 5 μm	5 - 6 μm
Largura	2,5 - 3,5 μm	2,5 - 3,5 μm
Formato	Configuração oval	Configuração oval perfeita
Vacúolo	ND	Ausente
Acrossomo	ND	Bem definido, abrangendo cerca de 40% a 70% da porção cefálica
Peça intermediária	Ausência de defeitos grosseiros	Delgada, anexada à parte central do corpo medindo menos de 1 μm de largura, sendo o comprimento aproximadamente uma vez e meia o do segmento cefálico
Cauda		
Comprimento	Aproximadamente 45 μm	Aproximadamente 45 μm , não podendo estar em espiral
Característica	Ausência de defeitos grosseiros	Uniforme, ligeiramente mais fina que a peça intermediária
Gotas citoplasmáticas	ND	Ausente

NOTA: ND = não definido

3.6 Teste de leucocitospermia (Endtz)

Esse teste identifica a presença de leucócitos do tipo granulócitos polimorfonucleares. O teste de Endtz foi realizado em todas as amostras juntamente com a avaliação microscópica da concentração e motilidade, porém em microscópio sem contraste de fase, sob aumento de 100x (objetiva x10). Misturou-se em um tubo para microcentrifugação, cor âmbar, 10 µL de sêmen liquefeito com 10 µL de meio Ham's F-10 com HEPES (Irvine Scientific, catálogo # 99168, Santa Ana, EUA) e 20 µL de solução de trabalho de benzidina – Endtz (4.0mL de solução estoque [25 mL de Ethanol a 96%, 0,0625 gramas de benzidina – Sigma Chemical CO., catálogo # B3503, St. Louis, EUA - 25mL de água destilada] e 50 µL de H₂O₂ a 3%). O tubo foi agitado com o auxílio de um agitador de tubos vortex e colocado em repouso por 5 minutos. Após esse período, 5 µL foram colocados na câmara de Makler e observados com aumento de 10x, sem contraste de fase. Todos os granulócitos corados positivamente com peroxidase (neutrófilos, leucócitos polimorfonucleares e macrófagos) tornaram-se marrom escuro. Após a contagem, o número de leucócitos foi multiplicado por 4 (fator de diluição) e dividido por 10, obtendo-se o resultado em milhões por mililitro de sêmen. Duas câmaras foram avaliadas por amostra. Foram considerados valores normais quando inferiores a 1×10^6 de leucócitos / mL (milhões/mL).

3.7 Mensuração do nível de ROS em sêmen puro

Após a determinação dos parâmetros microscópicos a fresco, foi realizada a mensuração dos ROS em sêmen puro através da quimiluminescência utilizando-se o Luminol como reagente. A solução estoque de Luminol 100-mmol/l foi preparada através da dissolução de 100 mg de pó Luminol (5-amino-2,3diidro-1,4 ftalazinediona, Sigma Chemical Co., catálogo # A8511, St. Louis, MO, EUA) em 5,64 ml de Dimetil Sulfóxido (DMSO, Sigma Chemical CO., catálogo # D5879, St. Louis, MO, EUA). A solução de trabalho do Luminol foi preparada misturando-se 380 µl de DMSO com 20 µl da solução estoque de Luminol, ou seja, diluindo o Luminol em 1:20 com DMSO.

Antes de iniciar a análise, os tubos foram numerados de 1 a 5. O tubo 1, considerado tampão, foi preenchido com 400 µl de meio de cultura *Human Tubal Fluid* (HTF) com tampão do tipo HEPES - HTF, (HTF HEPES buffered, Irvine Scientific, catálogo #90126, Santa Ana, EUA). Os tubos 2 e 3, considerados controles, foram preenchidos com 400 µl de HTF e 10 µl da solução de trabalho do Luminol. Os tubos 4 e 5, considerados testes para o sêmen puro, foram preenchidos com 400 µl da amostra seminal total e 10 µl da solução de trabalho do Luminol. O tubo 1 foi utilizado para avaliar a quimioluminescência do HTF sem a adição do Luminol, enquanto que os tubos controle foram utilizados para avaliar a quimioluminescência do HTF após a adição do Luminol. Para evitar contaminação, as ponteiros das pipetas utilizadas foram descartadas cada vez que entraram em contato com o Luminol (tubos 2 a 5). O agitador de tubos vortex foi utilizado para misturar uniformemente as alíquotas presentes nos tubos. Foram utilizados dois tubos

tanto na mensuração dos tubos controles quanto dos tubos testes, com intuito de minimizar os erros de pipetagem.

As amostras foram pipetadas nos respectivos microtubos somente quando foram avaliadas no luminômetro. A quimioluminescência foi medida, por 15 minutos, à 37°C. O luminômetro utilizado para as determinações foi o MicroBeta® Trilux (Perkin Elmer Life Sciences, Turku, Finlândia, software versão 4.7). Este equipamento recebeu um adaptador para leitura com microtubos do tipo Eppendorff (24-well cassette #1450-102 com adaptadores #1450-108, São Paulo, Brasil). Embora esse adaptador tenha possibilidade de leitura para os cinco microtubos simultaneamente, o equipamento foi adquirido somente com um leitor, portanto cada tubo foi avaliado isoladamente.

Os resultados dos tubos 2 e 3, assim como os dos tubos 4 e 5, foram somados e divididos por 2 para serem obtidos os resultados (médias) do controle e teste, respectivamente. Os resultados obtidos referentes aos tubos 4 e 5 foram multiplicados por 20×10^6 , sendo divididos pela concentração de espermatozoides (em milhões/ml). Os resultados foram expressos em fótons contados por minuto (cpm). O procedimento realizado na mensuração do nível de ROS no sêmen puro está esquematizado na Figura 6.

Figura 6 – Procedimento de mensuração do nível de ROS no sêmen puro

O cálculo do nível de ROS no sêmen foi realizado utilizando-se a fórmula abaixo:

$$\text{Sêmen puro: ROS (x } 10^4 \text{cpm)/ } 20 \times 10^6 \text{ espermatozoides} = \frac{\Delta T_p \times 20 \times 10^6}{[C]}$$

Onde:

$$\Delta T_p = \text{sêmen total } \frac{(\text{tubo 4} + \text{tubo 5})}{2}$$

$$20 \times 10^6 = \text{ajuste da concentração espermática para } 20 \times 10^6 / \text{ml de sêmen;}$$

$$[C] = \text{concentração de espermatozoides da amostra (milhões/ml);}$$

$$\Delta T_c = \text{controle } \frac{(\text{tubo 2} + \text{tubo 3})}{2}$$

3.8 Análise estatística

As variáveis quantitativas foram descritas como mediana e intervalo interquartil (25%, 75%). Foi utilizado o teste não paramétrico de Kruskal Wallis para comparar os grupos e, quando necessário, prosseguiu-se a análise através de comparações múltiplas com o teste de Mann-Whitney, controlando-se o nível de significância pela correção de Bonferroni.

As variáveis categóricas foram descritas como número e porcentagem e, neste caso, utilizou-se o teste Qui-Quadrado de Pearson ou Teste Exato de Fisher.

A correlação entre variáveis foi calculada usando o coeficiente de correlação de Spearman para dados não paramétricos.

Para a utilização do parâmetro ROS como marcador diagnóstico, foi calculada a sensibilidade, especificidade e acurácia em cada caso, aplicando-se diversos valores de corte. A comparação dos valores, buscando identificar qual seria o melhor número capaz de diferenciar os homens férteis com varicocele daqueles inférteis com varicocele, foi feita através da construção de uma curva ROC (do inglês: *Receiver Operating Characteristic*, anglicismo sem tradução para a língua portuguesa) e a respectiva determinação da área sob a curva (ASC).

Com o objetivo de avaliar se o tamanho da amostra utilizada no estudo foi representativo, calculou-se o poder do teste da comparação entre os grupos avaliados para a variável ROS. Nesse caso, foi fixado o nível de significância (Erro Tipo I) em 5%. O poder do teste é a probabilidade de rejeitar a hipótese nula quando esta é falsa, ou seja, indica a probabilidade de decisão correta.

Todas as análises estatísticas foram feitas com o programa SPSS[®] versão 16.0 (SPSS[®] Inc; Illinois, EUA). Todos os testes foram bicaudais e o valor $p < 0,05$ foi considerado estatisticamente significativo.

RESULTADOS

4 RESULTADOS

4.1 Comparação dos parâmetros seminais, volume testicular e níveis de ROS no sêmen entre os grupos FSV, FCV e INF

4.1.1 Comparação da idade entre os grupos FSV, FCV e INF

A média de idade dos 194 pacientes incluídos no estudo foi de 34,6 anos (desvio padrão = 6,1 anos), sendo a idade mínima de 21 anos e a máxima de 51 anos.

A Tabela 4 apresenta a distribuição de idade de acordo com os três grupos avaliados no estudo, sendo que o grupo INF foi o que apresentou a menor mediana quando comparado aos demais grupos. Através do teste Kruskal Wallis, verificou-se diferença estatisticamente significativa entre as medianas de idade apresentada entre os três grupos ($p=0,012$). Após a realização de comparações múltiplas, os grupos FSV e FCV não se diferenciaram em termos de idade ($p=0,689$). Dessa forma, pode-se dizer que o grupo INF apresentou mediana de idade estatisticamente menor do que a apresentada pelos demais grupos ($p=0,015$).

Tabela 4 – Comparação da idade dos homens de acordo com grupo

	FSV (n = 113)	FCV (n = 43)	INF (n = 38)	p-valor
Idade (anos)	35,0 (31,5 – 39,0)	34,5 (31,6 – 38,2)	31,1 (26,0 – 37,0)	0,012*

NOTA: FSV = férteis sem varicocele; FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis. Valores descritos são valores medianos e intervalos interquartis (25%, 75%). *O valor $p<0,05$ foi considerado significativo.

4.1.2 Distribuição do tabagismo entre os grupos FSV, FCV e INF

A Figura 7 apresenta a distribuição de tabagismo entre os grupos, podendo-se observar que os grupos mostraram-se homogêneos quanto ao hábito de fumar ($p=0,426$).

Figura 7 – Distribuição de tabagismo de acordo com o grupo

OBS: FSV = férteis sem varicocele; FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis.

4.1.3 Comparação do volume testicular entre os grupos FSV, FCV e INF

De acordo com a Tabela 5, observa-se que, em ambos os testículos, os grupos não se mostraram homogêneos quanto ao volume testicular ($p < 0,05$). Por meio de comparações múltiplas, verificou-se que os grupos FSV e FCV mostraram-se homogêneos quanto ao tamanho do testículo esquerdo ($p = 0,227$) e direito ($p = 0,401$). No entanto, o grupo INF apresentou volume testicular esquerdo ($p < 0,001$) e direito ($p < 0,001$) estatisticamente menor que os demais grupos.

Tabela 5 – Comparação do tamanho testicular de acordo com o grupo

	FSV (n = 113)	FCV (n = 43)	INF (n = 38)	p-valor
Testículo esquerdo (ml)	20 (15 – 25)	20 (18 – 20)	15 (12 – 20)	<0,001*
Testículo direito (ml)	20 (18 – 25)	20 (20 – 20)	18 (15 – 20)	0,002*

NOTA: FSV = férteis sem varicocele; FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis. Valores descritos são valores medianos e intervalos interquartis (25%, 75%). *O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.1.4 Frequência de varicocele bilateral nos grupos FCV e INF

A Tabela 6 apresenta a frequência de varicocele bilateral nos grupos FCV e INF. É possível notar que não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição apresentada ($p=0,315$).

Tabela 6 – Frequência de varicocele bilateral entre os grupos FCV e INF

	FCV	INF	p-valor
nº de varicocele bilateral	12 (27,9%)	7 (18,4%)	0,315

NOTA: FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis. O valor $p>0,05$ foi considerado não significativo.

4.1.5 Comparação dos parâmetros seminais entre os grupos FSV, FCV e INF

Os grupos mostraram-se homogêneos com relação ao volume, pH e motilidade grau c ($p>0,05$). Nos demais parâmetros, houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$), indicando comportamento distinto entre os grupos. Com o objetivo de detectar onde se encontravam essas diferenças, prosseguiu-se a análise por meio de comparações múltiplas, concluindo-se que os grupos FSV e FCV não apresentaram diferença significativa em nenhum parâmetro analisado. No entanto, o grupo INF apresentou valores significativamente menores em todos os parâmetros restantes, com exceção da motilidade grau d. Todos os valores e suas respectivas significâncias estão representados na Tabela 7.

Tabela 7 – Comparação dos parâmetros seminais entre os grupos FSV, FCV e INF

	FSV (n = 113)	FCV (n = 43)	INF (n = 38)	p-valor
Volume (ml)	3,0 (2,0–4,0)	3,0 (2,0–5,0)	3,0 (2,0–4,0)	0,879
pH	7,5 (7,5–8,0)	7,5 (7,5–8,0)	7,5 (7,5–7,5)	0,200
Número total de espermatozoides ($\times 10^6$)	240 (152–388)	247 (171–436)	69 (40–120)	<0,001*
Concentração ($\times 10^6$ /ml)	91 (52–143)	90 (47–145)	25 (15–41)	<0,001*
Número total de espermatozoides móveis ($\times 10^6$)	157 (83–262)	179 (100–298)	40 (18–71)	<0,001*
Motilidade total (%)	66 (57–73)	69 (61–74)	49 (32–55)	<0,001*
Motilidade Progressiva (a + b) (%)	40 (31–52)	45 (26–54)	23 (9–31)	<0,001*
Motilidade grau a (%)	5 (0–12)	6 (0–10)	0 (0–4)	<0,001*
Motilidade grau b (%)	33 (28–40)	36 (25–44)	20 (9–28)	<0,001*
Motilidade grau c (%)	20 (16–31)	23 (16–35)	20 (16–28)	0,434
Motilidade grau d (%)	34 (27–43)	31 (25 – 39)	51 (42–68)	<0,001*
Morfologia estrita (%)	5 (2–7)	4 (2–9)	1 (0–3)	<0,001*
Morfologia OMS (%)	19 (12 – 24)	20 (11 – 28)	6 (3 – 13)	<0,001*

NOTA: FSV = férteis sem varicocele; FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis. OMS = Organização Mundial da Saúde. Valores descritos são valores medianos e intervalos interquartis (25%, 75%). *O valor $p < 0,05$ foi considerado significante.

4.1.6 Comparação dos níveis de ROS no sêmen entre os grupos FSV, FCV e INF

Os grupos FSV e FCV não apresentaram diferença significativa na mediana de ROS no sêmen ($p=0,369$). No entanto, a mediana de ROS do grupo INF foi estatisticamente maior do que a apresentada pelos grupos de pacientes férteis ($p<0,001$). O poder do teste obtido para a comparação dos níveis de ROS no sêmen entre os grupos foi de 99,7%, ou seja, se de fato houver alguma diferença entre os grupos, a probabilidade de essa diferença ser detectada é praticamente de 100%.

Os valores de ROS no sêmen em cada grupo estão apresentados na Tabela 8. A Figura 8 ilustra o comportamento descrito acima.

Tabela 8 – Comparação dos níveis de ROS no sêmen entre os grupos

	FSV (n = 113)	FCV (n = 43)	INF (n = 38)	p-valor
ROS ($\times 10^4$ cpm)	0,16 (0,06–0,31)	0,18 (0,04–0,61)	0,99 (0,40–2,16)	<0,001*

NOTA: FSV = férteis sem varicocele; FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis. Valores descritos são medianas e intervalos interquartis (25%, 75%). *O valor $p<0,05$ foi considerado significativo. ROS (do inglês: *Reactive Oxygen Species*).

Figura 8 – Comparação dos níveis de ROS no sêmen entre os grupos

NOTA: FSV = férteis sem varicocele; FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis. ROS (do inglês: *Reactive Oxygen Species*).

4.2 Impacto do grau de varicocele nos parâmetros seminais, volume testicular e níveis de ROS seminais no grupo FCV

4.2.1 Distribuição do grau de varicocele no grupo FCV

O grupo FCV foi constituído por 43 homens distribuídos de acordo com o grau de varicocele, conforme descrito na Tabela 9 (Figura 9).

Tabela 9 – Distribuição do grau de varicocele no grupo FCV

Grau de varicocele	FCV (n = 43)
1	22 (51,2%)
2	11 (25,6%)
3	10 (23,2%)

NOTA: FCV = férteis com varicocele

Figura 9 – Distribuição do grau de varicocele no grupo FCV

NOTA: FCV = férteis com varicocele

4.2.2 Frequência de varicocele bilateral de acordo com o grau de varicocele no grupo FCV

A Tabela 10 apresenta a frequência do diagnóstico de varicocele bilateral de acordo com grau de varicocele no grupo FCV, observando-se que não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição apresentada ($p=0,333$).

Tabela 10 – Frequência de varicocele bilateral de acordo com o grau de varicocele nos homens FCV

	FCV nº de varicocele bilateral	p-valor
Grau de varicocele		0,333
1	4 (18,2%)	
2	4 (36,4%)	
3	4 (40,0%)	

NOTA: FCV = férteis com varicocele; O valor $p>0,05$ foi considerado não significativo.

4.2.3 Comparação da idade no grupo FCV de acordo com o grau de varicocele

A Tabela 11 apresenta a distribuição de idade no grupo FCV de acordo com o grau de varicocele. Pode-se observar que os grupos mostraram-se homogêneos quanto à idade.

Tabela 11 – Comparação da idade no grupo FCV de acordo com o grau de varicocele

	Grau 1 (n = 22)	Grau 2 (n = 11)	Grau 3 (n = 10)	p-valor
Idade (anos)	34,2 (32,7 – 37,4)	33,0 (30,0 – 35,8)	38,9 (30,7 – 40,4)	0,298

NOTA: FCV = férteis com varicocele; Valores descritos representam valores medianos e intervalos interquartis (25%, 75%). O valor $p > 0,05$ foi considerado não significativo.

4.2.4 Distribuição do tabagismo no grupo FCV de acordo com o grau de varicocele

A Figura 10 apresenta a distribuição de tabagismo dos pacientes férteis em cada um dos graus de varicocele. É possível observar que não houve diferença estatisticamente significativa na distribuição apresentada ($p=0,952$).

Figura 10 – Distribuição do tabagismo no grupo FCV de acordo com o grau de varicocele

4.2.5 Comparação do volume testicular no grupo FCV de acordo com o grau de varicocele

A Tabela 12 apresenta o volume testicular no grupo FCV de acordo com o grau de varicocele, podendo-se observar que não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos lados.

Tabela 12 – Comparação do volume testicular no grupo FCV de acordo com o grau de varicocele

	Grau 1 (n = 22)	Grau 2 (n = 11)	Grau 3 (n = 10)	p-valor
Testículo esquerdo (ml)	20 (20–20)	20 (15–20)	20 (15–20)	0,583
Testículo direito (ml)	20 (20–20)	20 (15–20)	20 (20–20)	0,287

NOTA: FCV = férteis com varicocele; Valores descritos são valores medianos e intervalos interquartis (25%, 75%). O valor $p > 0,05$ foi considerado não significativo.

4.2.6 Comparação dos parâmetros seminais no grupo FCV de acordo com o grau de varicocele

Os parâmetros seminais avaliados de acordo com o grau de varicocele não se mostraram homogêneos com relação à concentração dos espermatozoides. Com o objetivo de detectar onde se encontra essa diferença, prosseguiu-se a análise por meio de comparações múltiplas, concluindo-se que os homens com varicocele grau 1 e 2 não apresentaram diferença significativa na concentração dos espermatozoides ($p=0,693$). No entanto, os homens com varicocele grau 3 apresentaram concentração de espermatozoides significativamente menor que os homens com varicocele grau 1 e 2 ($p=0,010$). Nos demais parâmetros, não houve diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$), indicando comportamento distinto entre os graus de varicocele. Todos os valores e suas respectivas significâncias estão representados na Tabela 13.

Tabela 13 – Comparação dos parâmetros seminais nos pacientes férteis de acordo com o grau de varicocele

	Grau 1 (n = 22)	Grau 2 (n = 11)	Grau 3 (n = 10)	p-valor
Volume (ml)	3,0 (2,0 – 4,0)	3,0 (2,0 – 4,0)	4,0 (2,0 – 5,0)	0,366
pH	7,5 (7,5 – 8,0)	7,5 (7,5 – 7,5)	7,5 (7,5 – 7,5)	0,201
Número total de espermatozoides (x10 ⁶)	270 (202 – 450)	259 (174 – 468)	194 (103 – 238)	0,133
Concentração (x10 ⁶ /ml)	110 (60 – 158)	97 (56 – 142)	47 (32 – 52)	0,017*
Número total de espermatozoides móveis (x10 ⁶)	189 (111 – 330)	187 (108 – 347)	134 (63 – 164)	0,203
Motilidade total (%)	70 (59 – 75)	69 (64 – 75)	68 (57 – 73)	0,804
Motilidade Progressiva (a + b) (%)	44 (30 – 56)	50 (21 – 51)	38 (25 – 49)	0,671
Motilidade grau a (%)	10 (0 – 12)	8 (0 – 10)	1 (0 – 10)	0,518
Motilidade grau b (%)	38 (26 – 42)	38 (21 – 47)	29 (25 – 42)	0,775
Motilidade grau c (%)	22 (16 – 28)	19 (18 – 43)	27 (21 – 37)	0,603
Motilidade grau d (%)	30 (25 – 41)	31 (25 – 36)	32 (27 – 41)	0,864
Morfologia estrita (%)	6 (3 – 10)	4 (2 – 9)	2 (1 – 7)	0,202
Morfologia OMS (%)	22 (13 – 30)	15 (9 – 24)	13 (6 – 24)	0,147

NOTA: OMS = Organização Mundial da Saúde. Valores descritos representam valores medianos e intervalos interquartis (25%, 75%). *O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.2.7 Comparação dos níveis de ROS no sêmen no grupo FCV de acordo com o grau de varicocele

A Tabela 14 apresenta os valores de ROS no sêmen do grupo FCV de acordo com o grau de varicocele. Observou-se diferença significativa entre os referidos graus ($p=0,015$). Após a realização de comparações múltiplas, os homens com varicocele grau 1 e 2 não apresentaram diferença ($p=0,778$). No entanto, os homens com varicocele grau 3 apresentaram níveis de ROS no sêmen maiores que os homens com varicocele grau 1 ou 2 ($p=0,003$) (Figura 11).

O poder do teste obtido para a comparação dos níveis de ROS no sêmen do grupo FCV, de acordo com o grau de varicocele, foi de 81,8%, ou seja, se de fato houver alguma diferença entre os graus, a probabilidade de essa diferença ser detectada é de, aproximadamente, 82%.

Tabela 14 – Comparação dos níveis de ROS no sêmen no grupo FCV de acordo com o grau de varicocele

	FCV			p-valor
	Grau 1 (n = 22)	Grau 2 (n = 11)	Grau 3 (n = 10)	
ROS ($\times 10^4$ cpm)	0,12 (0,03–0,40)	0,08 (0,02–0,21)	1,02 (0,47–3,05)	0,015*

NOTA: FCV = férteis com varicocele. ROS (do inglês: *Reactive Oxygen Species*). Valores descritos são valores medianos e intervalos interquartis (25%, 75%). *O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

Figura 11– Comparação dos níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen no grupo FCV de acordo com grau de varicocele

NOTA: ROS (do inglês: *Reactive Oxygen Species*).

4.3 Comparação dos parâmetros seminais, volume testicular e níveis de ROS no sêmen entre os grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele

4.3.1 Distribuição do grau de varicocele entre os grupos FCV e INF

De acordo com a Tabela 15, observa-se que os grupos apresentaram-se homogêneos quanto à distribuição do grau de varicocele ($p=0,068$) (Figura 12).

Tabela 15 – Distribuição do grau de varicocele de acordo com grupo

	FCV	INF	p-valor
Grau de varicocele			0,068
1	22 (51,2%)	10 (26,3%)	
2	11 (25,6%)	13 (34,2%)	
3	10 (23,2%)	15 (39,5%)	

NOTA: FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis. O valor $p>0,05$ foi considerado não significativo.

Figura 12 – Distribuição do grau de varicocele de acordo com grupo

NOTA: FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis.

4.3.2 Frequência de varicocele bilateral nos grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele

A Tabela 16 apresenta a frequência do diagnóstico de varicocele bilateral nos grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele, observando-se que não houve diferença estatisticamente significativa nas distribuições apresentadas.

Tabela 16 – Frequência de varicocele bilateral nos grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele

Grau de varicocele	FCV nº de varicocele bilateral (%)	INF nº de varicocele bilateral (%)	p-valor
1	4 (18,2)	5 (50,0)	0,096
2	4 (36,4)	1 (7,7)	0,142
3	4 (40,0)	1 (6,7)	0,121

NOTA: FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis. O valor $p > 0,05$ foi considerado não significativo.

4.3.3 Comparação da idade entre os grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele

A Tabela 17 apresenta a distribuição de idade nos grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele. É possível notar que os homens com varicocele grau 1 e 2 mostraram-se homogêneos quanto à idade. No entanto, o grupo INF com varicocele grau 3 apresentou idade menor que FCV grau 3 ($p=0,002$).

Tabela 17 – Comparação da idade entre os grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele

Grau de varicocele	FCV	INF	p-valor
1	34,2 (32,7 – 37,4)	33,0 (32,0 – 35,0)	0,458
2	33,0 (30,0 – 35,8)	35,3 (29,6 – 39,0)	0,608
3	38,9 (30,7 – 40,4)	26,0 (25,0 – 29,9)	0,002*

NOTA: FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis. Valores descritos representam valores medianos e intervalos interquartis (25%, 75%) da idade. *O valor $p<0,05$ foi considerado significativo.

4.3.4 Distribuição do tabagismo nos grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele

A Tabela 18 apresenta a distribuição de tabagismo entre os grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele, observando-se que não houve diferença estatisticamente significativa em nenhuma distribuição apresentada.

Tabela 18 – Comparação do tabagismo entre os grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele

Grau de varicocele	FCV Tabagismo (%)	INF Tabagismo (%)	p-valor
1	22,7	20,0	>0,999
2	18,2	7,7	0,576
3	11,0	13,0	0,543

NOTA: FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis. O valor $p > 0,05$ foi considerado não significativo.

4.3.5 Comparação do volume testicular entre os grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele

A Tabela 19 apresenta a comparação do volume testicular entre os grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele, observando-se que não houve diferença estatisticamente significativa em nenhum dos lados ($p>0,05$).

Tabela 19 – Comparação do tamanho testicular entre os grupos FCV e INF de acordo com o grau de varicocele

Grau de varicocele	Testículo esquerdo (ml)			Testículo direito (ml)		
	FCV	INF	p-valor	FCV	INF	p-valor
1	20 (20 – 20)	20 (15 – 20)	0,366	20 (20 – 20)	20 (15 – 20)	0,287
2	20 (15 – 20)	15 (15 – 20)	0,134	20 (15 – 20)	18 (15 – 20)	0,361
3	20 (15 – 20)	15 (12 – 20)	0,129	20 (20 – 20)	18 (15 – 20)	0,091

NOTA: FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis. Valores descritos representam valores medianos e intervalos interquartis (25%, 75%) do tamanho testicular. O valor $p>0,05$ foi considerado não significativo.

4.3.6 Comparação dos parâmetros seminais entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 1

As medianas do número total de espermatozoides, concentração, número total de espermatozoides móveis, motilidade total e motilidade grau d foram significativamente inferiores nos homens com varicocele grau 1 do grupo INF quando comparados ao mesmo grau de varicocele no grupo FCV ($p<0,05$). Nos demais parâmetros não houve diferença estatisticamente significativa ($p>0,05$), indicando comportamento distinto entre os homens com varicocele grau 1 dos grupos FCV e INF. Todos os valores e suas respectivas significâncias estão representados na Tabela 20.

Tabela 20 – Comparação dos resultados dos parâmetros seminais entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 1

	FCV Varicocele grau 1 (n = 22)	INF Varicocele grau 1 (n = 10)	p-valor
Volume (ml)	3,0 (2,0 – 4,0)	3,0 (2,0 – 4,0)	0,952
pH	7,5 (7,5 – 8,0)	7,5 (7,5 – 7,5)	0,151
Número total de espermatozoides ($\times 10^6$)	270 (202 – 450)	113 (74 – 120)	0,001*
Concentração ($\times 10^6$ /ml)	110 (60 – 158)	40 (33 – 62)	0,003*
Número total de espermatozoides móveis ($\times 10^6$)	189 (111 – 330)	57 (19,2 – 70,2)	<0,001*
Motilidade total (%)	70 (59 – 75)	50 (32 – 55)	<0,001*
Motilidade Progressiva (a + b) (%)	44 (30 – 56)	23 (15 – 42)	0,113
Motilidade grau a (%)	10 (0 – 12)	3 (0 – 7)	0,411
Motilidade grau b (%)	38 (26 – 42)	20 (15 – 35)	0,075
Motilidade grau c (%)	22 (16 – 28)	24 (20 – 28)	0,650
Motilidade grau d (%)	30 (25 – 41)	47 (38 – 59)	0,016*
Morfologia estrita (%)	6 (3 – 10)	1 (1 – 8)	0,232
Morfologia OMS (%)	22 (13 – 30)	10 (7 – 26)	0,284

NOTA: FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis. Valores descritos representam valores medianos e intervalo interquartil (25%, 75%). *O valor $p < 0,05$ foi considerado significante. OMS = Organização Mundial da Saúde.

4.3.7 Comparação dos níveis de ROS no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 1

A Tabela 21 apresenta a distribuição dos níveis de ROS no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 1, verificando-se diferença significativa entre os grupos ($p=0,011$). Assim, pode-se dizer que os homens com varicocele grau 1 do grupo FCV apresentaram níveis de ROS no sêmen inferiores aos homens com varicocele grau 1 do grupo INF (Figura 13).

O poder do teste obtido para a comparação dos níveis de ROS no sêmen entre os grupos FCV e INF, nos homens com varicocele grau 1, foi de 76,6%, ou seja, se de fato houver alguma diferença entre os dois grupos, a probabilidade dessa diferença ser detectada é de, aproximadamente, 77%.

Tabela 21 – Comparação dos níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 1

	FCV Varicocele grau 1 (n = 22)	INF Varicocele grau 1 (n = 11)	p-valor
ROS ($\times 10^4$ cpm)	0,12 (0,03–0,40)	0,39 (0,27–0,94)	0,011*

NOTA: FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis. Valores descritos representam valores medianos e intervalos interquartis (25%, 75%). *O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo. ROS (do inglês: *Reactive Oxygen Species*).

Figura 13 – Comparação dos níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 1

NOTA: FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis; ROS (do inglês: *Reactive Oxygen Species*).

4.3.8 Comparação dos parâmetros seminais entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 2

Os homens com varicocele grau 2 dos grupos FCV e INF mostraram-se homogêneos com relação ao volume, pH e motilidade grau c ($p > 0,05$). Nos demais parâmetros, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), indicando comportamento distinto entre os grupos. Assim, os homens com varicocele grau 2 do grupo INF apresentaram todos os demais parâmetros seminais significativamente inferiores aos homens com varicocele grau 2 do grupo FCV, com exceção da motilidade grau d. Todos os valores e suas respectivas significâncias estão representados na Tabela 22.

Tabela 22 – Comparação dos parâmetros seminais entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 2

	FCV Varicocele grau 2 (n = 11)	INF Varicocele grau 2 (n = 13)	p-valor
Volume (ml)	3,0 (2,0 – 4,0)	3,0 (2,0 – 5,0)	0,361
pH	7,5 (7,5 – 7,5)	7,5 (7,0 – 8,0)	0,769
Número total de espermatozoides ($\times 10^6$)	259 (174 – 468)	90 (22 – 148)	0,022*
Concentração ($\times 10^6$ /ml)	97 (56 – 142)	18 (14 – 29)	0,003*
Número total de espermatozoides móveis ($\times 10^6$)	187 (108 – 347)	38 (4 – 88)	0,016*
Motilidade total (%)	69 (64 – 75)	49 (24 – 55)	<0,001*
Motilidade Progressiva (a + b) (%)	50 (21 – 51)	11 (7 – 26)	0,001*
Motilidade grau a (%)	8 (0 – 10)	0 (0 – 0)	0,041*
Motilidade grau b (%)	38 (21 – 47)	11 (7 – 26)	0,003*
Motilidade grau c (%)	19 (18 – 43)	20 (15 – 30)	0,776
Motilidade grau d (%)	31 (25 – 36)	51 (45 – 76)	<0,001*
Morfologia estrita (%)	4 (2 – 9)	1 (0 – 1)	0,002*
Morfologia OMS (%)	15 (9 – 24)	4 (2 – 6)	<0,001*

NOTA: FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis. OMS = Organização Mundial da Saúde. Valores descritos representam valores medianos e intervalos interquartis (25%, 75%). *O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.3.9 Comparação dos níveis de ROS no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 2

A Tabela 23 apresenta a distribuição dos níveis de ROS no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 2, sendo que verificou-se diferença significativa entre os grupos ($p=0,002$). Assim, pode-se dizer que os homens com varicocele grau 2 do grupo FCV apresentaram níveis de ROS no sêmen inferiores aos homens com varicocele grau 2 do grupo INF (Figura 14).

O poder do teste obtido para a comparação dos níveis de ROS no sêmen entre os grupos FCV e INF, nos homens com varicocele grau 2, foi de 99,1%.

Tabela 23 – Comparação dos níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 2

	FCV Varicocele grau 2 (n = 11)	INF Varicocele grau 2 (n = 13)	p-valor
ROS ($\times 10^4$ cpm)	0,08 (0,02–0,21)	1,34 (0,67–3,28)	0,002*

NOTA: FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis. Valores descritos são medianas e intervalos interquartis (25%, 75%). *O valor $p<0,05$ foi considerado significativo. ROS (do inglês: *Reactive Oxygen Species*).

Figura 14 – Comparação dos níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 2

NOTA: FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis; ROS (do inglês: *Reactive Oxygen Species*).

4.3.10 Comparação dos parâmetros seminais entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 3

Os homens com varicocele grau 3 dos grupos FCV e INF mostraram-se homogêneos com relação ao pH, motilidade grau a, motilidade grau c, morfologia estrita e morfologia baseada nos critérios da OMS ($p > 0,05$). Nos demais parâmetros, houve diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$), indicando comportamento distinto entre os grupos. Assim, os homens com varicocele grau 3 do grupo INF apresentaram todos os demais parâmetros seminais significativamente inferiores aos homens com varicocele grau 3 do grupo FCV, com exceção da motilidade grau d. Todos os valores e suas respectivas significâncias estão representados na Tabela 24.

Tabela 24 – Comparação dos parâmetros seminais entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 3

	FCV Varicocele grau 3 (n = 10)	INF Varicocele grau 3 (n = 15)	p-valor
Volume (ml)	4,0 (2,0 – 5,0)	2,0 (2,0 – 4,0)	0,036*
pH	7,5 (7,5 – 7,5)	7,5 (7,5 – 7,5)	0,909
Número total de espermatozoides ($\times 10^6$)	194 (103 – 238)	48 (29 – 71)	0,001*
Concentração ($\times 10^6$ /ml)	47 (32 – 52)	20 (11 – 31)	0,036*
Número total de espermatozoides móveis ($\times 10^6$)	134 (63 – 164)	27 (16 – 48)	0,004*
Motilidade total (%)	68 (57 – 73)	45 (35 – 59)	<0,001*
Motilidade Progressiva (a + b) (%)	38 (25 – 49)	24 (15 – 31)	0,048*
Motilidade grau a (%)	1 (0 – 10)	0 (0 – 4)	0,196
Motilidade grau a (%)	29 (25 – 42)	23 (15 – 28)	0,036*
Motilidade grau c (%)	27 (21 – 37)	18 (14 – 26)	0,080
Motilidade grau d (%)	32 (27 – 41)	54 (42 – 65)	<0,001*
Morfologia estrita (%)	2 (1 – 7)	1 (0 – 3)	0,216
Morfologia OMS (%)	13 (6 – 24)	7 (2 – 16)	0,144

NOTA: FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis. OMS = Organização Mundial da Saúde. Valores descritos representam valores medianos e intervalos interquartis (25%, 75%). *O valor $p < 0,05$ foi considerado significativo.

4.3.11 Comparação dos níveis de ROS no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 3

A Tabela 25 apresenta a distribuição dos níveis de ROS no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 3, observando-se que os grupos não apresentaram diferença significativa nos níveis de ROS no sêmen ($p=0,643$) (Figura 15).

Tabela 25 – Comparação dos níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 3

	FCV Varicocele grau 3 (n = 10)	INF Varicocele grau 3 (n = 15)	p-valor
ROS ($\times 10^4$ cpm)	1,02 (0,47–3,05)	1,27 (0,38–2,20)	0,643

NOTA: FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis. Valores descritos representam valores medianos e intervalos interquartis (25%, 75%). O valor $p>0,05$ foi considerado não significante. ROS (do inglês: *Reactive Oxygen Species*).

Figura 15 – Comparação dos níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen entre os grupos FCV e INF nos homens com varicocele grau 3

NOTA: FCV = férteis com varicocele; INF = inférteis; ROS (do inglês: *Reactive Oxygen Species*).

4.4 Correlação dos níveis de ROS no sêmen com parâmetros seminais, idade, volume testicular e grau de varicocele nos grupos FCV e INF

No grupo FSV, foi observada correlação positiva e significativa entre os níveis de ROS e o pH, enquanto que no grupo FCV essa correlação não se mostrou significativa. No grupo FCV foi observada correlação positiva e significativa entre os níveis de ROS e a motilidade grau c e grau d. Por outro lado, para o grupo FCV foi observada correlação negativa significativa entre os níveis de ROS no sêmen e motilidade total, motilidade grau b, motilidade grau c e motilidade grau d, no entanto no grupo FSV não foi observada correlação significativa para esses parâmetros.

De maneira semelhante, nos dois grupos (FSV e FCV) foi observada correlação significativamente negativa entre os níveis de ROS no sêmen com número total de espermatozoides, concentração, número total de espermatozoides móveis, motilidade progressiva, motilidade grau a, morfologia estrita e morfologia OMS ($p < 0,05$).

No grupo FSV, não foi observada correlação significativa do nível de ROS no sêmen com o volume testicular em nenhum dos lados, no entanto, no grupo FCV essa correlação se mostrou negativa e significativa apenas para o testículo esquerdo.

Nos homens FCV, foi encontrada uma correlação estaticamente significante entre os níveis de ROS e o grau de varicocele ($r = 0,344$ e $p = 0,024$). Sendo assim, pode-se dizer que quanto maior o grau de varicocele maior os níveis de ROS no sêmen.

Os demais parâmetros avaliados nos grupos não apresentaram correlação significativa com os valores de ROS no sêmen. Todos os valores e suas respectivas significâncias estão representados na Tabela 26.

Tabela 26 – Correlação dos níveis de ROS no sêmen com parâmetros seminais, idade, volume testicular e grau de varicocele nos grupos FSV e FCV

	FSV (n = 113)		FCV (n = 43)	
	ROS no sêmen		ROS no sêmen	
	r	p-valor	r	p-valor
Volume (ml)	0,050	0,594	0,108	0,820
pH	0,274	0,003*	-0,217	0,163
Número total de espermatozoides ($\times 10^6$)	-0,673	<0,001*	-0,721	<0,001*
Concentração ($\times 10^6$ /ml)	-0,749	<0,001*	-0,769	<0,001*
Número total de espermatozoides móveis ($\times 10^6$)	-0,652	<0,001*	-0,705	<0,001*
Motilidade total (%)	-0,056	0,553	-0,366	0,016*
Motilidade Progressiva (a + b) (%)	-0,189	0,045*	-0,429	0,004*
Motilidade grau a (%)	-0,307	0,001*	-0,429	0,004*
Motilidade grau b (%)	-0,097	0,305	-0,350	0,021*
Motilidade grau c (%)	0,165	0,081	0,350	0,021*
Motilidade grau d (%)	0,058	0,542	0,360	0,018*
Morfologia estrita (%)	-0,230	0,015*	-0,461	0,002*
Morfologia OMS (%)	-0,304	0,001*	-0,502	0,001*
Idade (anos)	0,051	0,594	-0,036	0,820
Volume Testículo E (ml)	-0,168	0,079	-0,320	0,037*
Volume Testículo D (ml)	-0,168	0,080	-0,142	0,365
Grau de varicocele	NA	NA	0,344	0,024*

NOTA: FSV = férteis sem varicocele; FCV = férteis com varicocele. OMS = Organização Mundial da Saúde. *O valor de $p < 0,05$ foi considerado como estatisticamente significativo (Teste de correlação de Spearman). NA = Não aplicável.

4.5 Correlação do grau de varicocele com parâmetros seminais, idade, volume testicular e níveis de ROS no sêmen no grupo FCV

No grupo FCV, foi encontrada uma correlação negativa significativa entre o grau de varicocele com a concentração de espermatozoides ($r=-0,373$ e $p=0,014$). Sendo assim, pode-se dizer que quanto maior o grau de varicocele menor a concentração dos espermatozoides. Além disso, foi encontrada uma correlação positiva significativa entre o grau de varicocele e os níveis de ROS no sêmen ($r=0,344$ e $p=0,024$). Sendo assim, pode-se dizer que quanto maior o grau de varicocele maior os níveis de ROS no sêmen.

Os demais parâmetros avaliados nos grupos não apresentaram correlação significativa com o grau de varicocele. Todos os valores e suas respectivas significâncias estão resumidos na Tabela 27.

Tabela 27 – Correlação do grau de varicocele com parâmetros seminais, idade, volume testicular e níveis de ROS no sêmen no grupo FCV

	FCV (n = 43) Grau de varicocele	
	r	p-valor
Volume (ml)	0,160	0,305
pH	-0,271	0,079
Número total de espermatozoides (x10 ⁶)	-0,275	0,075
Concentração (x10 ⁶ /ml)	-0,373	0,014*
Número total de espermatozoides móveis (x10 ⁶)	-0,247	0,110
Motilidade total (%)	-0,055	0,726
Motilidade Progressiva (a + b) (%)	-0,104	0,506
Motilidade grau a (%)	-0,175	0,263
Motilidade grau b (%)	-0,036	0,821
Motilidade grau c (%)	0,142	0,363
Motilidade grau d (%)	0,030	0,846
Morfologia estrita (%)	-0,276	0,073
Morfologia OMS (%)	-0,299	0,052
Idade (anos)	0,065	0,679
Volume Testículo E (ml)	-0,157	0,316
Volume Testículo D (ml)	-0,065	0,679
ROS (x10 ⁴ cpm)	0,344	0,024*

NOTA: FCV = férteis com varicocele. OMS = Organização Mundial da Saúde. *p<0,05 foi considerado como estatisticamente significativo (Teste de correlação de Spearman).

4.6 Curva ROC (do inglês: *Receiver Operating Characteristic*) e cálculo da área sob a curva (ASC) nos grupos FCV e INF utilizando o valor de ROS no sêmen

Com o objetivo de avaliar se os níveis de ROS no sêmen permitem diferenciar os homens férteis com varicocele dos inférteis com varicocele, foram avaliados alguns pontos de corte a fim de determinar aquele que apresentasse a maior sensibilidade, observando-se, porém, o valor da especificidade e da acurácia. Essa avaliação foi realizada gerando a curva ROC e calculando-se a área sob a curva (ASC), conforme mostra a Figura 16.

Figura 16 – Curva ROC realizada para diferenciar homens férteis com varicocele dos inférteis utilizando os níveis de ROS no sêmen
NOTA: ROS (do inglês: *Reactive Oxygen Species*)

A ASC sob curva da Figura 16 foi de 79,6% com um intervalo de confiança (IC) de 95% [69,8% ; 89,5%]. Sendo o valor da ASC maior que 50% e o IC não incluindo o valor 50%, pode-se dizer que os níveis de ROS mostraram-se significantes na diferenciação dos homens férteis com varicocele dos inférteis ($p < 0,001$).

Utilizando-se um ponto de corte de $0,20 \times 10^4$ cpm/ 20×10^6 espermatozoides para o ROS observou-se um alto valor de sensibilidade de 97,4% (IC 95% [86,5% ; 99,5%]), entretanto, a especificidade não foi tão alta (53,5% - IC 95% [38,9% ; 67,5%]). A acurácia foi de 74,1% (IC 95% [63,1% ; 83,2%]), sendo esta definida como a porcentagem de pacientes corretamente diagnosticados como férteis entre aqueles férteis, assim como, aqueles corretamente diagnosticados como inférteis entre os inférteis. Utilizando-se um ponto de corte de $0,40 \times 10^4$ cpm/ 20×10^6 espermatozoides, a sensibilidade foi de 76,3% (IC 95% [60,8% ; 87,0%]), enquanto a especificidade foi de 62,8% (IC 95% [47,9% ; 75,6%]).

O aumento na especificidade implica, invariavelmente, na correspondente diminuição da sensibilidade. Assim, a melhor maneira de contornar essa questão foi aplicar peso semelhante para ambos e então calcular a acurácia. O ponto de corte que resultou em valores próximos de sensibilidade e especificidade foi de $0,55 \times 10^4$ cpm/ 20×10^6 espermatozoides para o ROS. Com esse ponto de corte observou-se uma sensibilidade de 73,7% (IC 95% [58,0% ; 85,0%]), especificidade de 74,4% (IC 95% [59,8% ; 85,1%]) e acurácia de 74,1% (IC 95% [63,1% ; 83,2%]). Os principais valores de corte de ROS utilizados estão representados na Tabela 28.

Tabela 28 – Valores de corte de ROS utilizados na melhor diferenciação dos grupos FCV e INF com suas respectivas sensibilidades, especificidades e acurácias

Valor de corte (ROS)	Sensibilidade	Especificidade	Acurácia
0,20 ($\times 10^4$ cpm)	97,4%	53,5%	74,1%
0,40 ($\times 10^4$ cpm)	76,3%	62,8%	69,1%
0,55 ($\times 10^4$ cpm)	73,7%	74,4%	74,1%

NOTA: ROS (do inglês: *Reactive Oxygen Species*). FSV = férteis sem varicocele; FCV = férteis com varicocele.

5. DISCUSSÃO

5 DISCUSSÃO

A denominada “medicina baseada em evidências” (MBE) originou-se do movimento da epidemiologia clínica anglo-saxônica, iniciado na Universidade McMaster no Canadá, no início da década de 1990, sendo definida, em termos genéricos, como o “processo de sistematicamente descobrir, avaliar e usar achados de investigações como base para decisões clínicas”¹¹⁷. Atualmente, a MBE vem assumindo um papel de destaque, de tal modo que suas influências nas condutas médicas se manifestam significativamente. Vale ressaltar que sua utilização está baseada em uma escala tipológica da força das evidências, sendo ser consideradas durante as condutas nas práticas biomédicas. Apesar disso, ter a MBE como paradigma único da assistência ou da formação de profissionais médicos seria provavelmente catastrófico, pois significaria, em última instância, a tentativa de reduzir a prática e o ensino da medicina a seus aspectos puramente técnicos¹¹⁸. Nesse sentido, um dos pontos mais importantes na valorização das pesquisas é a seleção da amostra. Essa seleção baseia-se em critérios de inclusão e exclusão de indivíduos, tanto nos grupos de estudo, como controle, podendo representar sérias limitações para a validade externa da pesquisa.

A presença de infertilidade masculina é frequentemente definida pela existência de alterações nos parâmetros seminais, no entanto, o valor do achado de parâmetros seminais normais como diagnóstico de fertilidade masculina está muito longe de ser considerado aceitável. Sendo assim, a necessidade de testes diagnósticos com boa sensibilidade, acurácia e que sejam facilmente padronizados, tem estimulado a busca de critérios bioquímicos, por meio dos quais a qualidade do

ejaculado humano poderá ser melhor avaliada. O desenvolvimento ou aprimoramento de qualquer teste bioquímico, que possa ser utilizado no sêmen para diagnóstico da infertilidade masculina, tem como base os critérios de seleção dos homens incluídos no estudo. A seleção dos integrantes para criação de grupos ideais chamados de “referência” ou “normais” foi previamente descrita utilizando-se uma ampla variação de critérios incluindo, homens provenientes da população geral, isto é, sem conhecimento da fertilidade prévia^{119,120}, homens provenientes de casais atendidos para avaliação de infertilidade conjugal¹²¹⁻¹²³, homens candidatos a realização de vasectomia^{124,125} e doadores voluntários de sêmen^{126,127}. Embora o primeiro grupo possa refletir de uma maneira mais fidedigna a população geral, os candidatos a vasectomia possuem os melhores critérios referentes à fertilidade comprovada. Apesar disso, a paternidade pode ter sido atingida em momento significativamente diferente daquele em que a amostra seminal foi obtida para o estudo. Além disso, os valores de referência dos parâmetros seminais provenientes de homens com paternidade recente, não refletem adequadamente aqueles encontrados na população geral¹⁰⁶. Consequentemente, a grande maioria dos homens tem seu potencial de fertilidade indefinido na maior parte do tempo. Essas questões são frequentes durante as pesquisas de testes laboratoriais, além de representarem o maior desafio na seleção de populações válidas para definição dos valores de referência da análise seminal.

Recentemente, a utilização do critério “tempo para obter gravidez menor que 12 meses” foi sugerida como sendo “ideal”, porém esse critério de seleção é dificilmente questionado aos pacientes ou encontrado nos estudos¹⁰⁴. A aplicação de valores de referência corretos são essenciais na redução dos erros diagnósticos de

causas de infertilidade, além de serem essenciais para a determinação do valor dos novos testes disponíveis ou em desenvolvimento na investigação da infertilidade masculina.

A seleção das amostras para um estudo pode ser baseada em indivíduos (amostras sequenciais de um mesmo indivíduo) ou populações (amostras únicas de um grupo de indivíduos)¹²⁸. O nosso estudo foi realizado utilizando-se a segunda opção e, apesar de não termos a pretensão de criar um critério “perfeito” de inclusão, utilizamos pacientes com paternidade previamente comprovada, excluindo da nossa amostra todos os pacientes com características conhecidas que tenham impacto negativo nos parâmetros seminais ou níveis de ROS no sêmen³². Sendo assim, utilizamos os critérios de exclusão descritos detalhadamente na metodologia desse estudo, evitando que esses eventuais acontecimentos pudessem ser relevantes à função testicular, principalmente entre o período da última paternidade e a realização da coleta de sêmen para o estudo.

O sêmen pode apresentar outros elementos celulares além dos espermatozoides sendo chamados de células redondas incluindo, os espermatócitos, espermátides, leucócitos, eritrócitos, macrófagos e linfócitos. Além desses, células epiteliais, bactérias e fungos também podem estar presentes. A diferenciação das células redondas dos leucócitos do tipo granulócitos foi feita através do teste de Endtz, descrito na metodologia utilizada nessa pesquisa. Na análise seminal, é importante diferenciar as células redondas em leucócitos, células germinativas imaturas ou corpos grandes anucleados do citoplasma residual, os quais se originam do epitélio dos túbulos seminíferos. Quando as células redondas são superiores a 1 milhão/ml, utiliza-se o teste de Endtz para distinguir leucócitos de outros tipos de células⁶⁷.

Depuydt et al.¹²⁹ demonstraram a correlação da presença de leucócitos aumentados com alteração dos parâmetros seminais. Além disso, os leucócitos (granulócitos e macrófagos) consistem em uma das principais fontes de produção de ROS no sêmen⁶⁵. Mais recentemente, alguns estudos mostraram que a presença de leucocitospermia está associada ao aumento da fragmentação do DNA^{130,131}. O impacto da presença de leucócitos na função espermática depende claramente do número de células envolvidas, seu estado de ativação, níveis de ROS, tempo de exposição e local onde houve o contato com os espermatozoides¹³². No entanto, o verdadeiro significado clínico da produção de ROS durante uma infecção do trato urogenital masculino ainda não foi completamente elucidado¹³³⁻¹³⁵.

Atualmente, o diagnóstico laboratorial de leucocitospermia é baseado na definição da OMS da presença de valor igual ou superior a 1 milhão de leucócitos/ml^{106,136}. No entanto, o número mínimo de leucócitos que possivelmente altera a função espermática ainda não foi adequadamente estabelecido^{66,133,137}. Alguns estudos demonstraram que neutrófilos ativados no plasma seminal, mesmo em quantidades inferiores a 1 milhão/ml, estão associados a níveis elevados de ROS no sêmen^{66,69,133}. Sendo assim, a presença de leucócitos mesmo em níveis inferiores aos preconizados, pode causar danos consideráveis na qualidade seminal, indicando que os valores atualmente estabelecidos deveriam ser revistos. Embora o aumento de leucócitos seminais possa não obrigatoriamente representar uma infecção clínica, essas células influenciam nas taxas de fertilização, tanto *in vivo* como *in vitro*¹³⁸. Sendo assim, a pesquisa de leucócitos no sêmen deve ser realizada com atenção, e possivelmente, sua presença, ser tratada mesmo quando os valores forem inferiores aos atualmente considerados normais.

Lackner et al.¹³⁹ mostraram uma incidência de até 21% de leucocitospermia em pacientes assintomáticos. Os autores encontraram também uma variação considerável entre os valores de leucocitospermia em análises sequenciais de um mesmo indivíduo. Tendo em vista a alta incidência de leucocitospermia em homens assintomáticos e as evidências da associação de leucocitospermia e disfunção espermática, no nosso estudo realizamos o teste de Endtz em todas as amostras, incluindo apenas aquelas com valores inferiores a 1 milhão de leucócitos/ml.

Análises temporais demonstraram uma queda da qualidade espermática dos homens nas últimas décadas^{119,126,140,141}. No entanto, essas mudanças não ocorreram de forma homogênea, surgindo questões sobre viés de seleção das populações estudadas, metodologia aplicada na avaliação dos dados ou relações com áreas geográficas escolhidas¹⁴². A correlação de regiões específicas com variações da qualidade seminal sugere a presença de fatores específicos, principalmente, relacionados ao estilo de vida, exposição ocupacional a produtos químicos ou contaminantes ambientais^{15,143,144}. Devido à natureza das contaminações e da intensa dispersão de produtos tóxicos no ecossistema, muitas vezes é difícil apontar uma única fonte causadora, sendo mais provável um efeito sinérgico de origens variadas, incluindo emissão de gases por veículos automotores, indústrias e substâncias com forte capacidade de disrupção endócrina¹⁵. Os mecanismos responsáveis pela queda da fertilidade devido à contaminação ambiental ainda estão sob investigação e incluem toxicidade direta, indução de mutações, alterações epigenéticas, alterações hormonais simulando estrógenos no organismo humano, estresse oxidativo ou lesão do material genético celular com aumento da fragmentação do DNA^{15,145-149}. Apesar das dúvidas sobre o exato mecanismo de lesão na função testicular, acredita-se que o

sistema reprodutor represente um marcador sensível do impacto das alterações do meio ambiente no ser humano, tendo os ROS um papel central, como causa ou consequência desses acontecimentos^{15,126,150}.

A idade da mulher representa o fator isolado mais importante na concepção espontânea ou por meio de FIV, notando-se um declínio gradual da fertilidade que se inicia aos 33 anos, e acentua-se de maneira mais significativa após os 37 anos^{151,152}. A tendência atual de adiar a paternidade e/ou maternidade é um fato comum no mundo dito civilizado, contribuindo de maneira significativa para a diminuição do potencial de fertilidade com o aumento da idade¹⁵². Além disso, dados do Centro de Controle de Doenças e Prevenção dos Estados Unidos da América demonstram uma diminuição significativa da fertilidade em todas as faixas etárias nas últimas duas décadas¹⁵³.

Apesar de na mulher existir uma relação muito bem estabelecida entre o avanço da idade e a redução no potencial de fertilidade e aumento do risco de malformação congênita, o efeito da idade na fertilidade paterna ainda foi pouco documentado. Até pouco tempo, acreditava-se que a idade paterna tivesse pouco impacto na qualidade e função dos espermatozoides, principalmente pelas repetidas notícias de homens exibindo fertilidade com paternidade após os 80 anos de idade. Diferente da mulher, não existe um declínio universal ou abrupto da fertilidade no homem. Por esse motivo, apesar dos homens com idade avançada conseguirem estabelecer gravidez em suas parceiras, ainda não são totalmente conhecidos os riscos genéticos e as implicações futuras provenientes da utilização da FIV em homens nessas faixas etárias.

Atualmente, existe evidência do aumento de doenças genéticas, especialmente relacionadas a novas mutações autossômicas, associadas ao aumento da idade paterna, além de alto risco de espermatozoides com aneuploidia¹⁵⁴. Mais recentemente, foi demonstrado o aumento dos níveis de ROS em homens acima de 40 anos, assim como, maiores índices de fragmentação de DNA no sêmen associado ao aumento da idade^{68,155}. Essas alterações podem ser causadas pelo estresse oxidativo gerado no organismo relacionado ao avanço da idade. Isso ocorre em resposta as alterações das funções mitocondriais e diminuição na capacidade antioxidante do sistema reprodutivo com o passar do tempo^{156,157}.

No presente estudo, diferente de achados anteriores, não foi encontrada correlação significativa dos níveis de ROS no sêmen com a idade nos homens férteis⁶⁸. Isso pode ser explicado pela baixa idade média dos homens incluídos na pesquisa. Apesar disso, tendo em vista todas as implicações possíveis da idade nas avaliações incluídas nesse estudo, comparamos as idades entre todos os grupos utilizados, excluindo assim a possibilidade da interferência desse fator nos resultados encontrados. Assim, encontramos diferença significativa apenas em duas comparações. Primeiro os pacientes inférteis apresentaram idade inferior a dos homens férteis, com ou sem varicocele. A idade somente poderia interferir nos resultados das comparações entre esses grupos caso os pacientes inférteis fossem mais velhos, pois apresentaram todos os parâmetros seminais menores e os níveis de ROS no sêmen maiores que os demais grupos. O segundo achado foi na comparação entre homens férteis com varicocele grau 3 e os inférteis com o mesmo grau. Nessa comparação não acreditamos que a idade tenha sido um fator de interferência, pois apesar dos homens inférteis apresentarem idade mais baixa, apresentaram altos níveis

de ROS no sêmen e os parâmetros seminais diminuídos. Além disso, os dois grupos apresentaram as medianas de idade inferiores a 40 anos, sendo que não existe evidência de alterações dos níveis de ROS ou parâmetros seminais em homens nessa faixa etária.

O processo de fertilização em humanos, assim como o desenvolvimento embrionário, depende da integridade do DNA dos espermatozoides¹⁵⁸. Diferente da estrutura da cromatina das células somáticas, a cromatina espermática é extremamente compactada. Sendo assim, nos últimos estágios da espermatogênese, as histonas são trocadas por proteínas de transição e depois por protaminas¹⁵⁹. As ligações inter e intramoleculares entre as protaminas ricas em cisteína com pontes dissulfídicas permitem uma compactação e estabilização ainda maior do núcleo espermático, protegendo o DNA espermático de fatores externos. A etiologia do dano ao DNA espermático é multifatorial e pode ocorrer como consequência a fatores intrínsecos ou extrínsecos. Os defeitos intrínsecos que predisõem ao dano do DNA incluem a deficiência de protamina, mutações que afetam adversamente a compactação do DNA, ou outros defeitos do empacotamento¹⁶⁰. Espermatozoides que iniciam o processo de apoptose e posteriormente interrompem esse ciclo apresentam um maior dano ao DNA¹⁶¹. Esse mecanismo é semelhante ao que ocorre com o envelhecimento do homem¹⁶².

Elevação dos níveis de ROS no sêmen é detectada em um a cada quatro homens com diagnóstico de infertilidade, existindo uma associação entre esse aumento e as alterações da estrutura do DNA do espermatozoide⁵². Fatores externos como o calor, agentes quimioterápicos, radiação e outras gonadotoxinas estão associados com um aumento na quantidade de espermatozoides ejaculados com dano

do DNA¹⁶³. De maneira semelhante, infecções do trato reprodutivo, a presença de varicocele, disfunções hormonais e o tabagismo foram previamente relacionados com aumento do dano ao DNA dos espermatozoides, tanto em modelos experimentais, como em humanos^{70,164-167}.

Desde o início dos anos 90, já existiam publicações sugerindo que o tabagismo apresentava impacto negativo sobre os parâmetros seminais¹⁶⁸. Estudos populacionais subsequentes com grande número de homens comprovaram essas suspeitas^{70,169,170}. Esses achados se mantiveram mesmo após ser realizado controle para possíveis fatores de confusão, como etilismo e consumo de cafeína associados, enfatizando o efeito do tabagismo como fator isolado na função testicular¹⁷¹. A quantidade de cigarros fumados diariamente pode ser um fator determinante para o tipo de lesão encontrada no espermatozoide¹⁷². Aparentemente, a primeira alteração a ser encontrada é a diminuição da motilidade em fumantes esporádicos, seguido da morfologia nos casos de tabagismo mais intenso¹⁷³. O principal mecanismo responsável pelas alterações causadas pelo tabagismo parece ser a retenção citoplasmática na peça intermediária dos espermatozoides, encontrada em maior quantidade em tabagistas¹⁷⁴. Além disso, aumento do número de leucócitos no sêmen também tem sido demonstrado em fumantes⁷¹. A associação desses últimos achados justifica o aumento significativo do estresse oxidativo relacionado ao cigarro^{71,175,176}. Isso ocorre, pois tanto a retenção citoplasmática quanto a presença de leucócitos são os principais responsáveis pela produção de ROS no sêmen^{40,41}.

Devido a todas essas evidências relacionando o tabagismo com alterações dos parâmetros seminais e níveis de ROS no sêmen, no presente estudo, realizamos a comparação da incidência de tabagistas em todos os grupos estudados sem ter

encontrado nenhuma diferença significativa. Sendo assim, acreditamos que os resultados encontrados não tenham influência do tabagismo nas diferenças ou semelhanças entre os parâmetros avaliados. Apesar disso, a avaliação do tempo de tabagismo e quantidade de cigarros utilizados por cada indivíduo, poderia fornecer melhores informações do impacto do tabagismo em cada grupo.

Embora a etiologia e fisiopatologia da varicocele mantenham-se enigmáticas, as alterações testiculares associadas à varicocele foram bem documentadas na literatura. A primeira descrição da relação entre varicocele e infertilidade aparece em 1856 quando Curling¹⁷⁷ descreveu que os testículos apresentavam uma diminuição do “poder de secreção das glândulas”, quando a varicocele estava presente. Em 1885, Barwell¹⁷⁸ observou que o testículo ipsilateral em pacientes com varicocele esquerda apresentava tamanho inferior e consistência mais amolecida que o lado contralateral. Esses achados foram confirmados um século mais tarde por Marks et al.⁹¹, quando demonstraram que 77% dos pacientes inférteis com varicocele apresentavam atrofia testicular unilateral ou bilateral. Lipshultz e Corriere¹⁷⁹ mostraram que ambos os testículos dos pacientes com varicocele apresentavam tamanho significativamente inferior, quando comparados a pacientes com diminuição da concentração espermática sem varicocele, ou homens voluntários sem alterações nos parâmetros seminais. Algumas outras publicações mais recentes documentaram a presença de diminuição do volume testicular e danos histológicos associadas ao diagnóstico clínico de varicocele^{79,180-182}. Além disso, essas alterações foram encontradas em ambos os testículos, incluindo os casos em que a varicocele estava presente somente no lado esquerdo^{183,184}.

A reversão dos efeitos histológicos encontrados em pacientes submetidos à correção da varicocele enfatiza os efeitos deletérios da varicocele, além de mostrar o potencial benefício da varicocelectomia no tratamento da infertilidade masculina. Essas alterações foram bem documentadas por Johnsen e Agger¹⁸⁵ que demonstraram aumento do número de túbulos seminíferos contendo espermatozoides na biópsia testicular após a cirurgia em comparação com a biópsia realizada antes do procedimento, em pacientes com infertilidade.

Alguns autores propuseram o mecanismo fisiopatológico da associação entre diminuição do volume testicular e alterações dos parâmetros seminais nos homens inférteis^{179,186,187}. Essas alterações podem ocorrer porque os túbulos seminíferos são responsáveis por cerca de 80% do volume testicular, sendo o restante composto pelas células de Leydig e estruturas de sustentação^{188,189}. Dessa forma, é provável que o volume testicular consiga refletir o potencial da espermatogênese. Por esse motivo, o exame físico merece atenção especial, pois a medida correta do volume testicular pode ser utilizada como um importante marcador da sua função. O testículo adulto mede, em média, 4,6 cm de comprimento e 2,6 cm de largura, sendo que o volume considerado normal varia entre 18 e 20 ml³². Esse volume é compatível com os encontrados no presente estudo, tanto nos homens férteis sem varicocele, quanto nos férteis com varicocele, no entanto, os pacientes inférteis com varicocele apresentaram volume testicular significativamente inferior.

O tamanho do testículo pode ser aferido através de alguns métodos, incluindo a utilização do paquímetro, orquidômetro ou ultrassonografia^{190,191}. A medida do volume por meio da ultrassonografia testicular é reconhecida como o método de maior precisão^{192,193}. Apesar disso, esse método apresenta grandes variações dos

resultados dependendo da experiência do examinador e das fórmulas aplicadas para o cálculo do volume final¹⁹³. O orquidômetro de Prader é o método clínico mais prático, apresentando a melhor correlação com as medidas ultrassonográficas e funcionais do testículo em pacientes inférteis¹⁹⁴. Sakamoto et al.¹⁹⁰, em 2007, realizaram um estudo interessante comparando as medidas ultrassonográficas com as obtidas na utilização do orquidômetro em pacientes com câncer prostático. Os resultados dessas medidas foram comparados com o volume do deslocamento de água ocasionado pelos testículos após a orquiectomia, realizada como forma de tratamento oncológico desses pacientes. Os autores mostraram que ambos os métodos apresentam uma boa correlação com o volume de deslocamento de água, sendo que a utilização do orquidômetro resulta em medidas discretamente superiores em comparação ao ultrassom. No entanto, essa avaliação superestimada do volume testicular somente acontece nos casos em que os testículos apresentam tamanhos reduzidos¹⁹⁵. No nosso estudo, realizamos a medida do volume dos testículos durante o exame clínico utilizando o orquidômetro de Prader, por sua simplicidade e também por apresentar a correlação mais próxima com a medida obtida ao ultrassom.

Apesar da maioria dos estudos confirmar a presença da associação entre alterações testiculares e a presença de varicocele em homens inférteis, poucos avaliaram esses efeitos na população de homens férteis. Pinto et al.⁹⁵, em 1994, demonstraram a existência de correlação entre varicocele em homens férteis com diminuição do volume testicular. Os autores mostraram que o valor da diferença do volume entre o testículo esquerdo e direito de homens férteis sem varicocele é menor que nos homens férteis e inférteis, com varicocele. Além disso, não encontraram diferenças entre os homens férteis com varicocele ou inférteis com varicocele. Esses

resultados não estão de acordo com os apresentados no presente estudo, em que os pacientes inférteis com varicocele apresentaram volume testicular menor que os homens férteis, com ou sem varicocele. Além disso, não foi encontrada diferença do volume testicular entre os pacientes férteis, com ou sem varicocele. Essa diferença de resultados pode ser explicada pelas medidas utilizadas no estudo de Pinto et al.⁹⁵. Esses autores chegaram aos resultados através da comparação da diferença entre o volume do testículo esquerdo e direito, justificando essa metodologia por estarem avaliando apenas homens com varicocele esquerda. No entanto, mesmo a presença de varicocele somente unilateral pode causar efeito em ambos os testículos, podendo representar um erro na metodologia^{183,184}. Isso pode ser explicado pois, tendo os dois testículos afetados pela varicocele, a medida final da diferença entre os dois volumes pode ser igual aquela encontrada em testículos sem o efeito da varicocele ou vice-versa. Nossos resultados estão em concordância com os achados por Handelsman et al.¹⁹⁶ que não encontraram diferença no volume testicular ou nos parâmetros seminais entre homens voluntários doadores de sêmen, com ou sem varicocele. No entanto, o potencial de fertilidade dos homens incluídos no estudo de Handelsman não havia sido previamente testado.

Até o presente momento, nenhum estudo na literatura comparou o volume testicular entre homens férteis com varicocele e homens inférteis também com varicocele, levando-se em consideração os diferentes graus de varicocele. No presente estudo, não encontramos nenhuma diferença entre o volume testicular dos homens férteis e inférteis, comparando os três graus de varicocele. Isso poderia sugerir um declínio progressivo do volume testicular nos homens férteis associado ao aumento do grau de varicocele, em concordância com os acontecimentos encontrados

nos pacientes inférteis⁷⁹. No entanto, também não encontramos diferença comparando o volume testicular somente entre homens férteis com varicocele de acordo com cada grau. Esses achados sugerem que os homens férteis tenham um mecanismo de defesa mais eficiente, sendo que a diminuição do volume testicular ocorra mais tardiamente aos efeitos encontrados nos parâmetros seminais e, especialmente, nos níveis de ROS no sêmen. Isso deve estar principalmente relacionado ao grau 3 de varicocele, em que os homens férteis apresentaram menor concentração de espermatozoides e níveis mais altos de ROS no sêmen quando comparados aos férteis com grau 1 ou 2, sem no entanto apresentar diferença no volume testicular.

Apesar de Allamaneni et al.¹⁹⁷, em 2004, terem publicado um estudo mostrando que o volume testicular não apresentava impacto nos níveis de ROS no sêmen de pacientes inférteis com varicocele, nossos achados em homens com fertilidade comprovada foram diferentes. Nos homens férteis sem varicocele não foi observada correlação significativa do nível de ROS no sêmen com o volume testicular em nenhum dos lados. No entanto, nos homens férteis com varicocele essa correlação se mostrou negativa e significativa apenas para o volume do testículo esquerdo. A associação da disfunção testicular ipsilateral com a varicocele esquerda foi extensamente documentada nos últimos anos, tanto em homens férteis, como nos inférteis^{79,95,196}. Sendo assim, essa correlação entre diminuição do volume testicular esquerdo em homens férteis com varicocele e o aumento dos níveis de ROS no sêmen pode significar o efeito progressivo da varicocele no testículo, semelhante aquele encontrado nos pacientes inférteis. No entanto, provavelmente, os homens férteis, por apresentarem os mecanismos de regulação do estresse oxidativo ainda

preservados, conseguem postergar o declínio do potencial de fertilidade. Esses achados sugerem que esses homens férteis, de alguma maneira, conseguem preservar sua fertilidade sem, no entanto, conseguirem evitar os danos progressivos e implacáveis da varicocele no volume testicular. Além disso, ressalta a importância da medida correta do volume testicular na avaliação dos homens com varicocele, principalmente, daqueles apresentando parâmetros seminais normais onde o potencial de fertilização ainda não foi testado.

Na prática clínica, a análise tradicional dos parâmetros seminais ainda mantém um papel central na avaliação da fertilidade masculina. Provas biológicas de fertilidade ou infertilidade masculina são raramente encontradas nos parâmetros seminais. Apenas nos casos extremos de azoospermia ou quando houver ausência total da motilidade dos espermatozoides, podemos sugerir diagnóstico de infertilidade. No entanto, na imensa maioria dos valores encontrados no sêmen, não é possível quantificar ou correlacionar o potencial de fertilidade com os parâmetros seminais¹⁰³. Sendo assim, o adequado conhecimento das limitações nas informações contidas na análise seminal e sua associação com as condições clínicas do homem são essenciais para a prática da andrologia.

Macleod e Gold^{198,199}, em 1951, foram os primeiros a descrever as diferenças entre características do sêmen de homens férteis e inférteis. Desde então, diversos estudos retrospectivos demonstraram que os parâmetros seminais são, em média, superiores em homens férteis. Apesar disso, existe uma falta substancial de estudos prospectivos, que comparem as características do sêmen entre as populações comprovadamente férteis e inférteis. A OMS tem tentado padronizar as técnicas convencionais para a avaliação da amostra de sêmen, no entanto, qualquer método

utilizado apresenta um caráter subjetivo e os resultados acabam apresentando variações consideráveis^{94,106,116,200,201}. Apesar da importância dessas publicações, existem muitas dúvidas quanto ao real valor desses parâmetros seminais sugeridos pela OMS como referência ou normalidade²⁰². A interpretação desses resultados é difícil e limitada, pois os dados coletados são frequentemente realizados em países, populações e períodos diferentes. Quando utilizamos valores altos de referência, um elevado número de homens férteis é classificado como subférteis²⁰³. Além disso, muito mais homens seriam submetidos a tratamentos inapropriados por meio de métodos de fertilização assistida, por apresentarem valores inferiores aos “normais”. De maneira inversa, quando valores baixos são utilizados como referência, mais homens são classificados como “normais”^{204,205}. O principal fator que dificulta a diferenciação dessas populações utilizando-se os parâmetros seminais é que os valores de concentração, motilidade e morfologia espermática apresentam, invariavelmente, distribuição anormal, ampla e sobreposta nas populações férteis e inférteis¹⁰³.

A morfologia estrita é considerada um bom teste preditivo para o sucesso da FIV, porém, apesar de relativamente simples, existe uma grande variabilidade nos resultados, tanto nos diversos laboratórios, como entre os técnicos de um mesmo laboratório²⁰⁶. Na avaliação da morfologia espermática publicada por Kruger et al.¹¹⁴ em 1988, um resultado da morfologia superior a 14% indicaria normalidade, enquanto que valores inferiores a 4% seriam considerados anormais. No entanto, esses números foram baseados na morfologia apenas de espermatozoides que migraram pela cérvix uterina e apresentaram correlação direta com resultados da FIV. Nesse sentido, alguns estudos sugerem que esses valores não correspondem à

realidade, tendo sido propostos valores inferiores de morfologia, utilizando os mesmos critérios de avaliação^{200,207}.

Recentemente, a OMS publicou estudo reunindo dados de 4.500 homens em 14 países na criação da nova edição do manual de referência laboratorial para análise seminal¹⁰⁴. O principal critério de inclusão para classificação da população de homens chamados “férteis” foi o tempo para obtenção de gravidez inferior a 12 meses. Nesse estudo, como exemplo, foram sugeridos valores de concentração espermática de 15 milhões/ml (12 - 16), motilidade total de 40% (38 - 42), motilidade progressiva de 32% (31 - 34) e morfologia de 4% (3 - 4). Atualmente, esses valores estão sendo utilizados como referência de normalidade em muitos laboratórios de andrologia. No entanto, é importante lembrar que são apenas valores de limite inferior de referência (percentil 5) em análise unicaudal, com os devidos intervalos de confiança para cada parâmetro. Assim sendo, homens com valores inferiores aos descritos acima podem ser orientados a menor probabilidade de atingirem gravidez. No entanto, homens com valores acima dos descritos, não podem, em hipótese alguma, serem considerados “férteis” ou “normais”. O baixo valor da morfologia apresentado (4%) deve ser encarado como uma forte mensagem da dificuldade de utilização desse parâmetro, tanto no diagnóstico de infertilidade, como na indicação de tratamentos de reprodução assistida baseados exclusivamente nesse resultado. Uma crítica ao desenho do estudo foi a inclusão de dados de laboratórios variados e populações diferentes. Além disso, informações importantes como idade da esposa, definição de fertilidade ou estilo de vida não estavam adequadamente disponíveis em todos os grupos¹⁰⁶.

Provavelmente, a melhor maneira de interpretar os parâmetros seminais parece ser por meio da utilização de um intervalo de valores de normalidade. Dessa maneira, ainda é recomendado que cada laboratório tenha seus próprios valores de referência, realizado em sua população específica. Além disso, que cada profissional fique atento ao risco da utilização isolada desses valores na indicação do tratamento da infertilidade do casal.

Tendo em vista a dificuldade de utilização dos parâmetros seminais avaliados na análise seminal tradicional, em nosso estudo optamos por não classificar nossos grupos segundo os valores de referência sugeridos pela OMS¹⁰⁶. Realizamos as comparações entre as medianas e os respectivos intervalos interquartis, devido à alta anormalidade da distribuição dos valores, evitando assim que fossem criados grupos controles, seguindo critérios ainda não perfeitamente esclarecidos. Todas as análises seminais foram realizadas no mesmo laboratório com os protocolos descritos anteriormente nos métodos deste estudo.

Apesar da maioria das pesquisas realizadas ter sido direcionada aos efeitos da varicocele nos parâmetros seminais em homens inférteis, poucos estudos foram realizados a fim de avaliar o impacto da varicocele na população de homens férteis ou provenientes da população geral^{208,209}. Esses estudos, em geral, mostram não existir diferença significativa na concentração espermática, motilidade ou morfologia entre esses homens férteis, com ou sem varicocele^{210,211}. Esses achados estão em concordância com nosso estudo, em que não houve diferença em nenhum dos parâmetros seminais quando comparados homens férteis com varicocele ou sem varicocele, incluindo a mensuração dos níveis de ROS. No entanto, os pacientes inférteis com varicocele apresentam diminuição de todos os parâmetros seminais e

aumento dos níveis de ROS no sêmen em comparação com os homens férteis, com ou sem varicocele. Uma das explicações para esses resultados é que a baixa concentração de espermatozoides, nesses pacientes inférteis, estimula a liberação de espermatozoides imaturos no ejaculado tentando corrigir a concentração reduzida. No entanto, esses espermatozoides produzem altos níveis de ROS pela excessiva retenção de citoplasma residual²¹².

O nível de ROS no sêmen pode ser medido por testes diretos e indiretos²¹³. O teste indireto mais utilizado mede os níveis de malonaldeído, um dos produtos finais da peroxidação lipídica da membrana celular do espermatozoide¹⁸. Os testes indiretos medem o resultado oxidativo proveniente do balanço entre a produção de ROS e a presença de antioxidantes intra e extracelulares que agem neutralizando os ROS.

Embora alguns outros métodos tenham sido descritos para a mensuração dos níveis de radicais livres, a quimioluminescência é o teste direto mais utilizado na atualidade^{18,213}. Esse método quantifica, tanto os níveis de radicais livres extracelulares, como os intracelulares, por meio da utilização de um reagente, também chamado de probe, sensível aos ROS. Dependendo do tipo de probe utilizado na realização do teste, pode-se diferenciar a presença de superóxido ou peróxido de hidrogênio, ambos produzidos pelo espermatozoide. Os dois probes que podem ser utilizados na reação de quimioluminescência são o luminol e a lucigenina. A lucigenina realiza uma reação de quimioluminescência mais específica para os anions superóxidos, liberados somente no meio extracelular⁵⁸. A reação de quimioluminescência mediada pelo luminol ocorre quando o substrato do luminol é oxidado pelo peróxido de hidrogênio ou perborato, na reação catalisada pela peroxidase de raiz forte (em inglês: *Horseradish peroxidase* – HRP), substância que

catalisa a reação entre o aceptor de hidrogênio, oxidante, e o doador de oxigênio. A reação utilizando luminol apresenta algumas vantagens incluindo a mensuração de ambos os níveis de ROS, extracelular e intracelular¹⁸. O luminol reage com vários ROS (H_2O_2 , $\text{OH}^\bullet$, $^\bullet\text{O}_2^-$), sendo ainda mais específico para o peróxido de hidrogênio. No entanto, não é possível distinguir os tipos de oxidantes durante a reação. Sua interação com esses ROS resulta na emissão de luz proporcional aos níveis de radicais livres presentes nas amostras seminais²¹⁴.

Os dois aspectos mais importantes para a introdução de um marcador molecular na prática clínica são a sua reprodutibilidade e a padronização dos valores normais. Athayde et al.⁶⁶, em 2007, encontraram como valores de referência do sêmen de homens férteis, puro e lavado, respectivamente, $1,25 \times 10^4$ cpm/ 20×10^6 espermatozoides e $51,50 \times 10^4$ cpm/ 20×10^6 espermatozoides. Utilizando-se as medidas de ROS no sêmen puro e lavado de pacientes sem leucócitos no sêmen, realizando uma curva ROC, o teste foi capaz de diferenciar homens férteis dos inférteis com uma sensibilidade de 73,3%, nos valores de corte $0,56 \times 10^4$ cpm/ 20×10^6 espermatozoides e $10,0 \times 10^4$ cpm/ 20×10^6 espermatozoides, respectivamente. No entanto, embora os autores tenham realizado esse cálculo em amostras coletadas prospectivamente em uma população de homens com fertilidade comprovada, não foram excluídos homens que apresentavam varicocele na determinação dos valores de corte da curva ROC⁶⁶. Nesse mesmo estudo, houve uma correlação positiva significativa da presença de leucócitos no sêmen de homens férteis com os níveis de ROS seminais, confirmando as afirmativas de estudos anteriores da influência dos leucócitos nos níveis de ROS no sêmen^{69,133}.

Apesar dos níveis de ROS poderem ser medidos no sêmen puro ou após processamento seminal, os valores encontrados apresentam grandes diferenças numéricas e na aplicabilidade prática^{66,215}. Isso ocorre, pois durante as etapas de preparo seminal é realizada a retirada do plasma seminal que contém a maior parte dos mecanismos de defesa do sêmen contra os radicais livres, isto é, os antioxidantes plasmáticos²¹³. Sendo assim, a dosagem do radical livre no sêmen a fresco provavelmente reflete mais precisamente a real condição de estresse oxidativo seminal, tendo maior valor na prática clínica⁶⁶. A retirada do plasma seminal durante a preparação do sêmen pode ser considerada um fator de variação nos valores reais de estresse oxidativo, pois estariam sendo extraídos todos os antioxidantes do sêmen que se encontram no plasma seminal. Quando não há a presença do líquido seminal, não há resistência antioxidante, portanto o nível de ROS é maior no sêmen após processamento⁶⁶. Sendo assim, no presente estudo apenas utilizamos os níveis de ROS no sêmen puro, procurando esclarecer melhor o papel desse marcador na população de homens férteis, com e sem a presença de varicocele, na tentativa de facilitar sua introdução na prática clínica.

Apesar de inúmeros estudos demonstrarem melhora nos parâmetros seminais e na taxa de gravidez após a correção da varicocele⁷⁴, quase todos são baseados em dados retrospectivos, não controlados, com seguimento irregular e com grande diversidade de técnicas cirúrgicas utilizadas²¹⁶. Além disso, os dois melhores desenhos epidemiológicos na avaliação da eficácia de um método terapêutico são estudos controlados randomizados duplo cego ou estudos controlados randomizados prospectivos. Claramente, o primeiro seria impossível, pois o paciente estaria ciente da realização de sua cirurgia, e o segundo desenho é eticamente questionável devido

à expectativa do casal e a presença de inúmeras publicações sobre os benefícios da varicocelectomia^{91,92}.

Dois estudos controlados randomizados prospectivos foram realizados até o momento. Nieschlag et al.¹⁰⁰, em 1998, avaliaram 125 casais mostrando melhora significativa dos parâmetros seminais no grupo em que a varicocele foi corrigida em comparação com o grupo de homens não operados, no entanto, não encontraram diferença na taxa de gravidez. Nesse estudo, a ausência de benefício da cirurgia pode ser explicada por metade dos pacientes incluídos apresentarem varicocele grau 1. Além disso, 25% terem sido submetidos à embolização radiológica, técnica ainda com resultados duvidosos, e no restante dos pacientes a técnica realizada foi a ligadura retroperitonal alta, técnica também não considerada ideal²¹⁷. Outra crítica ao estudo foi a baixa taxa de gravidez encontrada no grupo operado, sendo aproximadamente a metade da descrita em outras publicações^{96,218}. O segundo estudo, conduzido por Madgar et al.⁹⁸, em 1995, utilizou o melhor desenho epidemiológico realizado até o momento. No primeiro ano, o grupo submetido à varicocelectomia atingiu 60% de gravidez comparado a apenas 10% dos casais acompanhados, sem a correção cirúrgica. Após o primeiro ano, o grupo controle também foi submetido à cirurgia, sendo que, durante os 12 meses seguintes, 44% desses casais atingiram gravidez espontânea⁹⁸.

Schlegel²¹⁹, em 1997, publicou uma revisão avaliando o custo benefício do tratamento da varicocele em comparação com a utilização de técnicas de reprodução assistida. O autor mostrou com cálculos convincentes que o tratamento da varicocele traria maior taxa de nascimento com um custo significativamente inferior. O grande debate sobre os benefícios do tratamento da varicocele no tratamento da infertilidade

masculina parecia estar chegando ao final quando, em 2003, uma revisão realizada por dois ginecologistas foi publicada na revista *Lancet*. Os autores concluíram que a correção cirúrgica da varicocele não traria benefícios evidentes²¹⁶. No ano seguinte, os mesmos autores publicaram uma revisão sistemática na *Cochrane*, incluindo apenas estudos randomizados controlados de pacientes submetidos à embolização ou correção cirúrgica da varicocele²²⁰. Os autores concluíram não existir dados suficientes para considerar a correção da varicocele um tratamento adequado em casais com infertilidade. Esses dois artigos tiveram grande impacto na literatura médica pela importância das revistas em que foram divulgados.

No entanto, Ficarra et al.²²¹, em 2006, publicaram um artigo contendo somente críticas a essa revisão da *Cochrane*. Os autores mostraram que dos oito artigos incluídos no estudo, um incluía pacientes com parâmetros seminais normais²²², dois incluíam pacientes com parâmetros seminais normais ou varicocele subclínica^{223,224} e outros dois incluíam pacientes com varicocele subclínica somente^{225,226}. Recentemente, duas meta-análises, que incluíram somente estudos randomizados controlados e estudos observacionais, mostraram evidências de um melhor cenário no tratamento da varicocele. A primeira, exclusivamente demonstrando melhora em todos os parâmetros seminais nos pacientes submetidos à cirurgia em comparação a pacientes não tratados²²⁷. A segunda mostrando uma chance 2,87 vezes maior de gravidez nos casais cujo homem havia sido submetido à correção da varicocele²²⁸.

A correção da varicocele não melhora os parâmetros seminais ou resulta em gravidez espontânea em todos os pacientes. No entanto, após a correção cirúrgica, alguns pacientes conseguem atingir a gravidez utilizando-se de técnicas de

reprodução assistida mais simples ou de baixa complexidade, como a inseminação intrauterina. Daitch et al.²²⁹ compararam dois grupos de casais submetidos à inseminação intrauterina, cujos homens tinham diagnóstico de varicocele, no entanto, apenas um dos grupos havia sido submetido a correção cirúrgica da varicocele previamente à inseminação. Apesar de não terem encontrado diferença significativa nos parâmetros seminais antes e após o processamento seminal entre os grupos, as taxas de gravidez e de nascidos vivos foram significativamente maiores nos pacientes do grupo operado antes da inseminação. Esses dados sugerem haver uma melhora da capacidade funcional dos espermatozoides nos pacientes operados, provavelmente relacionada a algum marcador não mensurado nos parâmetros seminais tradicionais. O aumento do estresse oxidativo presente em pacientes inférteis com varicocele parece justificar esses resultados⁴¹. Apesar disso, o mecanismo bioquímico pelo qual essa condição resulta na disfunção da espermatogênese ainda não foi completamente esclarecido.

A presença de varicocele está associada a um aumento do número de espermatozoides imaturos que estão fortemente relacionados à produção excessiva de ROS²³⁰. Essa elevação dos níveis de ROS no trato reprodutivo ocasiona tanto a perda da fluidez da membrana citoplasmática do espermatozoide como dano na integridade do DNA^{54,231}. Níveis elevados de fragmentação de DNA no sêmen têm sido associado a alterações em diversos parâmetros utilizados como marcadores de fertilidade incluindo, desenvolvimento embrionário, taxa de fertilização e implantação dos embriões¹⁰¹. A frequência de espermatozoides apresentando fragmentação de DNA é significativamente elevada nos pacientes com varicocele inférteis, provavelmente, resultante do estresse oxidativo¹⁶⁵.

Cervellione et al.²³², em 2006, demonstraram a redução do estresse oxidativo no plasma seminal de pacientes submetidos à correção da varicocele. Chen et al., em 2008, mostraram que, após seis meses de tratamento da varicocele, ocorreu uma diminuição da quantidade de espermatozoides com fragmentação do DNA²³³. Além disso, Smit et al.²³⁴, em 2010, publicaram um estudo prospectivo mostrando que, após a correção da varicocele, além de ter ocorrido melhora nos parâmetros seminais, ocorreu uma diminuição significativa dos índices de fragmentação do DNA no sêmen. Os autores mostraram também que a diminuição nas taxas de fragmentação do DNA seminal foi associada a maior chance, tanto de gravidez espontânea, quanto por meio de reprodução assistida. Lacerda et al.²³⁵ também mostraram que a correção da varicocele melhora a integridade do DNA e atividade mitocondrial, mas em adolescentes. No entanto, os autores não encontraram diferença nos níveis de peroxidação lipídica, medidos através da concentração do malonaldeído, antes do procedimento e após três meses de acompanhamento. O curto tempo esperado para realização dos exames após o procedimento pode justificar a ausência de diminuição da peroxidação lipídica nesses adolescentes.

As controvérsias sobre o impacto do grau de varicocele na intensidade das alterações dos parâmetros seminais ou no prognóstico do tratamento dessa condição existem desde estudos da década de 1970^{112,236}. Dubin e Amelar¹¹², em 1970, mostraram que 81% dos pacientes submetidos à varicocelectomia apresentaram melhora significativa nos parâmetros seminais, enquanto 48% atingiram gravidez. No entanto, os autores concluíram que o grau de varicocele não teria nenhuma relação com os resultados obtidos. Essas afirmativas sugeriam que os resultados do tratamento da varicocele seriam independentes do grau, sendo mais importantes os

efeitos do refluxo no plexo pampiniforme. Dessa forma, um grande número de pacientes seria submetido à cirurgia desnecessariamente, pois a incidência de refluxo venoso no plexo pampiniforme é de aproximadamente 50%, tanto nos homens inférteis como na população geral^{237,238}.

O termo varicocele subclínica passou a ser utilizado quando ocorre o refluxo retrógrado de sangue pelo plexo pampiniforme que não pode ser sentido no exame físico, mesmo durante a manobra de Valsalva. Esse refluxo é diagnosticado somente através de um exame de imagem como uma ultrassonografia com Doppler ou venografia²³⁹. Alguns estudos retrospectivos e não controlados mostraram que apesar da maioria dos pacientes submetidos à correção cirúrgica de varicocele subclínica não se beneficiarem do procedimento, alguns pacientes apresentaram melhora da concentração de espermatozoides^{240,241}. No entanto, esses estudos não encontraram aumento significativo na taxa de gravidez. Jarow et al.²⁴⁰, em 1996, descreveram melhora significativa nos parâmetros seminais de pacientes cuja varicocele subclínica apresentava diâmetro da veia superior a 3 mm. Os autores sugeriram que o diâmetro da veia mensurada na ultrassonografia, com o paciente em posição ortostática, poderia ser um fator prognóstico nos resultados da correção da varicocele subclínica. Apesar dos debates sobre os verdadeiros benefícios do tratamento da varicocele subclínica ainda persistirem, o único estudo prospectivo randomizado não recomenda sua correção²²⁴. No nosso estudo, devido à insuficiência de dados disponíveis na literatura até o momento, somente incluímos pacientes com varicocele clinicamente palpável, não avaliando assim os efeitos, ainda não adequadamente conhecidos, da varicocele subclínica. A dificuldade da indicação cirúrgica e avaliação de resultados nesses pacientes podem ser justificadas pela falta de

padronização da classificação da varicocele através do exame físico²⁴². Acreditamos que a realização do exame físico urológico em todos os homens, incluídos nessa pesquisa, pelo mesmo examinador, tenha contribuído para uma adequada padronização da classificação da varicocele.

O mecanismo que relaciona o grau de varicocele com a gravidade das alterações seminais ainda é desconhecido. Alguns estudos demonstraram que a qualidade seminal estaria inversamente correlacionada com o grau de varicocele^{240,243}. Apesar disso, nem todos os estudos confirmam a existência dessa correlação^{112,236}. A ausência de associação entre parâmetros seminais e grau de varicocele em pacientes inférteis, em alguns estudos, pode corresponder ao efeito direto dos ROS diminuindo a capacidade de fertilização sem, no entanto, afetar proporcionalmente os parâmetros seminais.

O impacto da varicocele subclínica no lado direito concomitante à presença de varicocele clínica à esquerda ainda está sob investigação²⁴⁴⁻²⁴⁶. Apesar disso, alguns estudos mostraram que a realização da correção de varicocele bilateral, nos casos de varicocele clínica em ambos os lados, estaria associada à melhora significativamente superior dos parâmetros seminais e taxa de gravidez quando comparada a cirurgia unilateral^{247,248}. Essa diferença de evolução relacionada à presença de varicocele bilateral sugere ainda mais a existência de correlação entre o grau de varicocele e o dano testicular. Embora a incidência da varicocele bilateral tenha sido historicamente reportada como sendo aproximadamente 10%, estudos mais recentes mostraram que sua frequência ocorre em até 30% dos casos, sendo compatível com os resultados do presente estudo^{211,249,250}. No nosso estudo, não encontramos diferenças significativas na frequência do diagnóstico de varicocele

bilateral em nenhuma das comparações realizadas entre os grupos, diminuindo assim o efeito dessa variável nos resultados apresentados.

A controvérsia sobre a correlação entre grau de varicocele em pacientes inférteis e prognóstico da correção cirúrgica começou a ser esclarecida após dois importantes estudos sugerirem existir correlação inversa do grau de varicocele com os parâmetros seminais, assim como, correlação direta com o potencial de melhora após a correção cirúrgica^{243,251}. Takahara et al.²⁵¹ mostraram que quanto maior o grau de varicocele nos pacientes, maior o aumento na concentração espermática seis meses após a correção cirúrgica. Além disso, mostraram os mesmos achados em relação à melhora da motilidade, no entanto, sem significância estatística. Koksai et al.²⁵², em 2000, incluíram também a mensuração dos ROS e foram os primeiros a mostrarem que os níveis de malonaldeído, um marcador indireto da peroxidação lipídica causada pelos ROS, são maiores em pacientes inférteis com varicocele grau 3 quando comparados à varicocele subclínica, grau 1 ou grau 2. No entanto, esses autores utilizaram apenas 15 pacientes com varicocele, sendo que apenas dois apresentavam varicocele grau 3.

Allamaneni et al.¹⁹⁷ estudaram 46 pacientes inférteis com varicocele e mostraram que a presença de varicocele grau 2 ou 3 implicava em níveis significativamente mais altos de ROS no sêmen em comparação ao grau 1. Mori et al.²⁵³, em 2008, avaliaram o impacto do grau de varicocele nos parâmetros seminais de adolescentes e mostraram que os pacientes com varicocele grau 2 ou 3 apresentaram maior assimetria testicular, menor concentração espermática, menor motilidade progressiva (a + b) e menor número total de espermatozoides móveis. Apesar de todos os parâmetros seminais, incluindo morfologia, serem menores nos

adolescentes com varicocele grau 3 em comparação ao grau 2, somente o número total de móveis teve diferença significativa. Um aspecto interessante em relação à importância do grau de varicocele e seu impacto na disfunção testicular, apresentado no mesmo estudo, foi a comparação de todos os parâmetros avaliados entre adolescentes sem varicocele com aqueles apresentando varicocele grau 1, em que não foi encontrada nenhuma diferença significativa entre os grupos. Esses achados sugerem uma valorização da varicocele grau 2 e 3, assim como, aumentam a dúvida sobre o verdadeiro significado da varicocele grau 1.

Apesar de a literatura ser extensa sobre a associação da varicocele ao dano na função testicular nos homens inférteis, pouco foi publicado até o presente momento sobre seus efeitos na população fértil^{233,234}. Tendo em vista que a grande maioria dos homens com varicocele terá, de alguma forma, sua fertilidade preservada e que apenas 15% serão inférteis, estudos direcionados a esclarecer melhor essa condição na população fértil tornam-se essenciais²⁵⁴. Além disso, passa a ser um desafio realizar pesquisas no sentido de identificar quais pacientes se beneficiariam da correção da varicocele antes mesmo de apresentarem infertilidade ou alteração dos parâmetros seminais. Nagao et al.²⁵⁵, em 1986, mostraram que, embora homens férteis com varicocele apresentem concentração de espermatozoides maior que homens inférteis com varicocele, ambos teriam valores menores quando comparados à população controle. Os autores sugeriram que a presença da varicocele estivesse associada à lesão testicular, independente do potencial de fertilização.

O presente estudo não mostrou associação entre a presença de varicocele e diminuição dos parâmetros seminais, redução do volume testicular ou elevação dos níveis de ROS na população fértil, supondo uma ação fisiopatológica diferente nos

pacientes que não apresentam infertilidade. Sendo assim, os mecanismos fisiopatológicos da varicocele parecem não apresentar grande interferência nos parâmetros seminais de homens férteis, tal como ocorre em homens inférteis. Os pacientes férteis, independente da presença de varicocele, devem apresentar mais eficazes mecanismos de defesa atuando contra possíveis alterações relacionadas à regulação da temperatura testicular e níveis de ROS. Além disso, esses homens devem possuir um melhor equilíbrio entre oxidantes e antioxidantes, sendo mais eficientes no combate aos ROS seminais. Apesar disso, devemos lembrar que existem características distintas, mesmo dentro de uma população de homens com paternidade prévia, que podem influenciar ao longo do tempo e diferenciar cada indivíduo, como exemplo, o grau de varicocele.

Embora alterações na termorregulação testicular resultando no aumento da temperatura sejam encontradas em pacientes férteis e inférteis com varicocele, aumento do estresse oxidativo é mais frequentemente observado no segundo grupo de pacientes¹⁶⁵. Esse achado pode indicar que alterações no mecanismo de neutralização dos ROS no sêmen exerçam um papel muito importante na fisiopatologia da associação da varicocele com diminuição da função testicular.

Hendin et al.⁴¹, em 1999, compararam os níveis de ROS e a capacidade total antioxidante entre 21 homens com varicocele inférteis, 15 homens com diagnóstico de varicocele incidental e 17 homens doadores de sêmen sem varicocele, estes últimos, considerados como grupo controle. Os autores mostraram que níveis elevados de ROS e baixa capacidade total de antioxidantes estariam associados à presença de varicocele, tanto nos pacientes inférteis, como nos homens com varicocele incidental. Esse estudo apresenta duas importantes diferenças da presente

pesquisa. Em primeiro lugar o grupo constituído de homens com varicocele incidental, que deveria representar a população de homens férteis, é um grupo completamente heterogêneo constituído de apenas dois homens com fertilidade comprovada, quatro homens tentando engravidar suas parceiras, sem sucesso, por um período inferior a 12 meses, e nove homens sem prévia tentativa de gravidez. Sendo assim, esse grupo não representa população específica nenhuma e não é possível concluir que a varicocele seja responsável pelos resultados encontrados. Em segundo, não foi considerado o grau de varicocele na avaliação dos pacientes e muito menos comparado as diferenças de proporções de graus presentes em cada grupo.

De maneira semelhante, Pasqualotto et al.¹⁰², em 2007, encontraram os mesmos resultados, empregando fórmulas diferentes, no mesmo grupo de homens utilizados por Hendin, em 1999. No entanto, nesse novo estudo, a população anteriormente descrita como incidental, foi considerada comprovadamente fértil, pois, provavelmente, todos os homens desse grupo conseguiram engravidar suas esposas durante o período transcorrido entre as duas publicações. Esses achados levaram a conclusão que a varicocele estaria relacionada ao dano testicular, tanto nos homens férteis, como nos homens inférteis. Os resultados desses estudos foram contrários aos nossos achados, nos quais a população infértil com varicocele apresentou todos os parâmetros seminais diminuídos e níveis mais altos de ROS no sêmen quando comparados a população de homens férteis com varicocele. Nossa maior casuística permitiu a avaliação desses parâmetros de acordo com o grau de varicocele, mostrando que quanto maior o grau de varicocele, maior os níveis de ROS no sêmen dos homens férteis. Além disso, nossos homens férteis com varicocele grau 3 apresentaram menor concentração espermática quando comparados aos homens

férteis com varicocele grau 1 ou 2. Afim de calcular se o número de indivíduos, em cada grupo, poderia influenciar os resultados encontrados no presente estudo, foi realizado o cálculo do poder do teste nas comparações dos níveis de ROS no sêmen, obtendo sempre valores ao redor de 80%.

Os dois estudos, publicados por Hendin⁴¹ e Pasqualotto¹⁰², apresentam deficiências semelhantes de seleção de sua população para comparação dos parâmetros propostos. Isso ocorreu principalmente pela ausência da inclusão do grau como variável significativa, tendo em vista o considerável número de publicações existentes que mostram o impacto desse critério, tanto nos parâmetros seminais, como nos níveis de ROS no sêmen^{197,243,251}. Além disso, o pequeno número da amostra, constituída por apenas 15 pacientes férteis com varicocele, provavelmente, não permitiu a avaliação estatística dos parâmetros avaliados de acordo com os diferentes graus de varicocele. Os achados de Hendin⁴¹ e Pasqualotto¹⁰² poderiam ser justificados pela inclusão de um número maior de homens férteis com varicocele grau 3 ou um maior número de pacientes inférteis com varicocele grau 1.

Mostafa et al²⁵⁶, em 2009, avaliaram um maior número de homens e encontraram resultados semelhantes aos estudos de Hendin⁴¹ e Pasqualotto¹⁰². Os autores concluíram que a varicocele ocasionou estresse oxidativo mesmo em homens férteis. Apesar da metodologia da pesquisa ser superior a dos estudos anteriores, também não foi relatado o grau de varicocele em cada grupo estudado. Recentemente, esse mesmo grupo de pesquisadores demonstrou que homens inférteis com varicocele grau 2 ou 3 apresentam maior estresse oxidativo que homens com varicocele grau 1. No entanto, os autores não avaliaram o impacto do grau de varicocele no homens férteis²⁵⁷.

No presente estudo, homens férteis com varicocele grau 1 ou 2 apresentaram níveis mais baixos de ROS no sêmen quando comparados a pacientes inférteis com os mesmos graus de varicocele. No entanto, homens férteis com varicocele grau 3 apresentaram níveis de ROS no sêmen igualmente elevados quando comparados a pacientes inférteis com varicocele do mesmo grau. Além disso, os homens férteis com varicocele grau 3 apresentaram níveis de ROS no sêmen maior que os homens férteis com varicocele grau 1 ou 2. Esses achados sugerem que o dano associado ao testículo seja relacionado ao grau de varicocele mesmo em pacientes férteis, particularmente ao grau 3. Os altos níveis de ROS no sêmen encontrados nos homens férteis com varicocele grau 3 parecem representar um sinal inicial de lesão testicular, podendo as alterações no volume testicular e os parâmetros seminais serem encontradas mais tardiamente nesses homens.

Apesar de inúmeros estudos mostrarem uma maior incidência de varicocele na população de homens inférteis em comparação com homens férteis ou provenientes da população geral, não existe na literatura uma comparação da incidência dos graus de varicocele entre essas populações^{211,218,258,259}. Aparentemente, a incidência de varicocele grau 3 é menor que a grau 1 em homens férteis, assim como, a incidência de varicocele grau 1 é menor que a grau 3 em homens inférteis^{95,110,259}. Essas diferenças podem ser explicadas pelo maior diagnóstico de varicocele, principalmente grau 2 e 3, em centros especializados em andrologia onde os pacientes com infertilidade são atendidos⁷⁹. Essa seleção é diferente da realizada para homens férteis que são recrutados em estudos populacionais onde, geralmente, não são examinados por especialistas. No entanto, essa tendência na diferença dos graus

de varicocele em relação à fertilidade pode sugerir um maior peso da varicocele grau 3 em associação com a infertilidade masculina.

A sistemática utilizada para seleção da população neste estudo não permite essa conclusão, mas encontramos no grupo dos férteis 39,5% dos pacientes apresentando varicocele grau 3 contra apenas 26,3% com varicocele grau 1. De maneira contrária, dentre os homens férteis com varicocele encontramos 51,2% com varicocele grau 1 contra apenas 23,2% com grau 3. Apesar dessa tendência na diferença dos graus de varicocele em cada grupo, não foi encontrada significância nessa distribuição após o cálculo estatístico adequado. Sendo assim, não podemos atribuir esses achados aos resultados do presente estudo.

Um dos principais argumentos a favor do impacto da varicocele na fertilidade masculina é sua incidência maior nos homens inférteis comparado aos férteis²⁶⁰. Assim sendo, entre 25% e 40% dos pacientes inférteis com alterações dos parâmetros seminais apresentam o diagnóstico de varicocele^{79,258}. Nesses pacientes, a literatura é clara a respeito dos benefícios que a correção dessa condição pode trazer ao potencial de fertilidade. No entanto, aproximadamente 12% dos homens inférteis com diagnóstico de varicocele clínica apresentam todos os parâmetros seminais normais⁷⁹. Tendo em vista que o nível de ROS no sêmen parece representar um marcador mais sensível e preciso no diagnóstico de infertilidade quando comparado aos parâmetros seminais tradicionais, seria muito conveniente a utilização desse marcador na diferenciação entre homens férteis com varicocele dos inférteis com varicocele^{27,105}. Sendo assim, alguns pontos de corte foram avaliados a fim de determinar aquele que apresentasse a maior sensibilidade, porém observando-se o valor da especificidade e da acurácia. O ponto de corte que produziu valores mais

próximos de sensibilidade e especificidade foi de $0,55 \times 10^4$ cpm/20 x 10^6 espermatozoides para o ROS no sêmen. Com esse ponto de corte, observou-se uma sensibilidade de 73,7% (IC 95% [58,0% ; 85,0%]), especificidade de 74,4% (IC 95% [59,8% ; 85,1%]) e acurácia de 74,1% (IC 95% [63,1% ; 83,2%]). Na literatura atual, ainda não existe outra avaliação semelhante que possibilite a diferenciação desses pacientes e possa ser comparada com o obtido nesse estudo. Esse valor de ROS no sêmen poderia auxiliar na identificação dos homens com varicocele que terão o diagnóstico de infertilidade somente 12 meses após iniciarem a tentativa de gravidez em suas esposas, mesmo apresentando parâmetros seminais normais.

Apesar do presente estudo não esclarecer se a produção dos ROS é causa ou efeito das alterações encontradas nos parâmetros seminais dos homens férteis, com ou sem varicocele, encontramos correlação positiva do nível de ROS no sêmen com o grau de varicocele. Além disso, uma correlação negativa entre o grau de varicocele com a concentração de espermatozoides. Esses achados sugerem um provável mecanismo fisiopatológico da disfunção testicular ligado ao grau de varicocele. Essa correlação do grau de varicocele com a concentração dos espermatozoides e os níveis de ROS no sêmen ainda não foi descrita na literatura para a população fértil.

O aparecimento da varicocele ocorre geralmente no início da puberdade, sendo sua incidência na adolescência muito semelhante a dos adultos⁸⁴. Estudos prospectivos mostram que o testículo de adolescentes com varicocele apresenta déficit de crescimento ou até mesmo redução do volume ao longo do tempo, quando a varicocele não é corrigida^{261,262}. Além disso, existe uma maior incidência de varicocele em homens apresentando infertilidade secundária⁸¹⁻⁸³. Todas essas informações enfatizam o caráter progressivo e contínuo da disfunção testicular

causada pela varicocele. Se associarmos a essas afirmativas o conhecimento que mais de 85% dos homens com varicocele apresentam sua fertilidade preservada em algum momento da vida, uma questão essencial ainda permanece sem resposta⁹³. Homens com varicocele, com um sem paternidade comprovada, apresentando parâmetros seminais normais, podem sofrer danos testiculares mediados pela varicocele, causando redução no seu potencial de fertilidade ao longo do tempo? Não existe dúvida que a resposta correta a essa questão ainda dependerá de futuras pesquisas relacionadas a fisiopatologia da varicocele, no entanto, nos próximos anos, aumentará consideravelmente o número de homens nessa situação. Essa mudança pode ser explicada pela introdução dos novos parâmetros de referência, os quais são inferiores aos propostos anteriormente, resultando na diminuição da sensibilidade do exame e, conseqüentemente, em mais homens com análise seminal classificada como “normal”. Sendo assim, a utilização de marcadores seminais como os ROS torna-se ainda mais importantes durante a avaliação de homens ou adolescentes, principalmente, aqueles que não tenham testado seu potencial de fertilidade e apresentem alguma condição de risco como a varicocele.

6. CONCLUSÕES

6 CONCLUSÕES

As conclusões deste estudo são:

1. Homens férteis sem varicocele não apresentam diferenças nos parâmetros seminais, volume testicular ou níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen quando comparados aos homens férteis com varicocele.
2. Pacientes inférteis com varicocele apresentam diminuição dos parâmetros seminais, volume testicular inferior e níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen mais altos quando comparados aos homens férteis, com ou sem varicocele.
3. Homens férteis com varicocele grau 3 apresentam menor concentração espermática e níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen mais altos quando comparados a homens férteis com varicocele grau 1 ou 2.
4. Homens férteis com varicocele grau 1 ou 2 apresentam níveis mais baixos de radicais livres de oxigênio no sêmen quando comparados a pacientes inférteis com os mesmos graus de varicocele. No entanto, homens férteis com varicocele grau 3 apresentam níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen igualmente elevados quando comparados a pacientes inférteis com varicocele grau 3.

5. O grau de varicocele nos homens férteis apresenta correlação negativa com a concentração espermática e positiva com os níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen. Além disso, nos homens férteis com varicocele, os níveis de radicais livres de oxigênio no sêmen apresentam correlação negativa com o volume testicular esquerdo.

6. O nível de radical livre de oxigênio de $0,55 \times 10^4$ cpm/ 20×10^6 espermatozoides permite diferenciar os homens férteis com varicocele dos pacientes inférteis com varicocele, tendo sensibilidade de 73,7% (IC 95% [58,0% ; 85,0%]), especificidade de 74,4% (IC 95% [59,8% ; 85,1%]) e acurácia de 74,1% (IC 95% [63,1% ; 83,2%]).

7. ANEXOS

7 ANEXOS**Anexo 1 – Aprovação do projeto de pesquisa** **APROVAÇÃO**

A Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa - CAPPesq da Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, em sessão de 12/09/2007, **APROVOU** o Protocolo de Pesquisa nº **0685/07**, intitulado: **"IMPACTO DA VARICOCELE CLÍNICA NO NÍVEIS SEMINAIS DE RADICAIS LIVRES DE OXIGÊNIO EM HOMENS FÉRTEIS "** apresentado pelo Departamento de **CIRURGIA**, inclusive o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Cabe ao pesquisador elaborar e apresentar à CAPPesq, 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: **Jorge Hallak**

Pesquisador (a) Executante: **Marcello Antonio Signorelli Cocuzza**

CAPPesq, 18 de Setembro de 2007

Prof. Dr. Eduardo Massad
**Presidente da Comissão
de Ética para Análise de
Projetos de Pesquisa**

Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do HCFMUSP e da FMUSP Diretoria Clínica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo Rua Ovídio Pires de Campos, 255, 5º andar - CEP 05403 010 - São Paulo - SP Fone: 011 3069 6442 Fax: 011 3069 6492 e-mail: cappesq@hcnet.usp.br / secretariacappesq2@hcnet.usp.br -sol

8. REFERÊNCIAS

8 REFERÊNCIAS

1. Daar AS, Merali Z. Infertility and social suffering: the case of ART in developing countries. In: Vayena E, Rowe P, Griffin P, (eds.) Current practices and controversies in assisted reproduction. Geneva, Switzerland: World Health Organization; 2002. p.15-21.
2. Definition of "infertility". *Fertil Steril*. 2006;86(5 Suppl):S228.
3. Zargar AH, Wani AI, Masoodi SR, Laway BA, Salahuddin M. Epidemiologic and etiologic aspects of primary infertility in the Kashmir region of India. *Fertil Steril*. 1997;68(4):637-43.
4. Schmidt L, Munster K. Infertility, involuntary infecundity, and the seeking of medical advice in industrialized countries 1970-1992: a review of concepts, measurements and results. *Hum Reprod*. 1995;10(6):1407-18.
5. Social determinants of human reproduction. *Hum Reprod*. 2001;16(7):1518-26.
6. Jarow J, M. S. Office evaluation of the infertile male. *AUA Update Series*. 1999;18:177-84.
7. Honig SC, Lipshultz LI, Jarow J. Significant medical pathology uncovered by a comprehensive male infertility evaluation. *Fertil Steril*. 1994;62(5):1028-34.
8. Devroey P, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Silber SJ, Van Steirteghem AC. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril*. 1994;62(3):639-41.
9. Silber SJ, Van Steirteghem AC, Liu J, Nagy Z, Tournaye H, Devroey P. High fertilization and pregnancy rate after intracytoplasmic sperm injection with spermatozoa obtained from testicle biopsy. *Hum Reprod*. 1995;10(1):148-52.

10. Shefi S, Turek PJ. Definition and current evaluation of subfertile men. *Int Braz J Urol.* 2006;32(4):385-97.
11. Sharlip ID, Jarow JP, Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ, Schlegel PN, Howards SS, Nehra A, Damewood MD, Overstreet JW, Sadovsky R. Best practice policies for male infertility. *Fertil Steril.* 2002;77(5):873-82.
12. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J, Lopes P, Tabaste JM, Spira A. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod.* 1991;6(6):811-6.
13. MacLeod J. Human male infertility. *Obstet Gynecol Surv.* 1971;26(5):335-51.
14. In't Veld PA, Halley DJ, van Hemel JO, Niermeijer MF, Dohle G, Weber RF. Genetic counselling before intracytoplasmic sperm injection. *Lancet.* 1997;350(9076):490.
15. Aitken RJ, Koopman P, Lewis SE. Seeds of concern. *Nature.* 2004;432(7013):48-52.
16. Huszar G, Sbracia M, Vigue L, Miller DJ, Shur BD. Sperm plasma membrane remodeling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. *Biol Reprod.* 1997;56(4):1020-4.
17. Aitken RJ, Krausz C. Oxidative stress, DNA damage and the Y chromosome. *Reproduction.* 2001;122(4):497-506.
18. Sharma RK, Agarwal A. Role of reactive oxygen species in male infertility. *Urology.* 1996;48(6):835-50.

19. Aitken RJ, Sawyer D. The human spermatozoon--not waving but drowning. *Adv Exp Med Biol.* 2003;518:85-98.
20. Miesel R, Drzejczak PJ, Kurpisz M. Oxidative stress during the interaction of gametes. *Biol Reprod.* 1993;49(5):918-23.
21. Aitken RJ, Best FS, Richardson DW, Djahanbakhch O, Lees MM. The correlates of fertilizing capacity in normal fertile men. *Fertil Steril.* 1982;38(1):68-76.
22. Aitken RJ, Best FS, Richardson DW, Djahanbakhch O, Mortimer D, Templeton AA, Lees MM. An analysis of sperm function in cases of unexplained infertility: conventional criteria, movement characteristics, and fertilizing capacity. *Fertil Steril.* 1982;38(2):212-21.
23. Lundin K, Soderlund B, Hamberger L. The relationship between sperm morphology and rates of fertilization, pregnancy and spontaneous abortion in an in-vitro fertilization/intracytoplasmic sperm injection programme. *Hum Reprod.* 1997;12(12):2676-81.
24. Greenberg SH, Lipshultz LI, Wein AJ. Experience with 425 subfertile male patients. *J Urol.* 1978;119(4):507-10.
25. Hallak J, Sharma RK, Pasqualotto FF, Ranganathan P, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Creatine kinase as an indicator of sperm quality and maturity in men with oligospermia. *Urology.* 2001;58(3):446-51.
26. Siciliano L, Tarantino P, Longobardi F, Rago V, De Stefano C, Carpino A. Impaired seminal antioxidant capacity in human semen with hyperviscosity or oligoasthenozoospermia. *J Androl.* 2001;22(5):798-803.

27. Agarwal A, Sharma RK, Nallella KP, Thomas AJ, Jr., Alvarez JG, Sikka SC. Reactive oxygen species as an independent marker of male factor infertility. *Fertil Steril*. 2006;86(4):878-85.
28. Alvarez JG, Touchstone JC, Blasco L, Storey BT. Spontaneous lipid peroxidation and production of hydrogen peroxide and superoxide in human spermatozoa. Superoxide dismutase as major enzyme protectant against oxygen toxicity. *J Androl*. 1987;8(5):338-48.
29. Yanagimachi R, Yanagimachi H, Rogers BJ. The use of zona-free animal ova as a test-system for the assessment of the fertilizing capacity of human spermatozoa. *Biol Reprod*. 1976;15(4):471-6.
30. Coddington CC, Franken DR, Burkman LJ, Oosthuizen WT, Kruger T, Hodgen GD. Functional aspects of human sperm binding to the zona pellucida using the hemizona assay. *J Androl*. 1991;12(1):1-8.
31. de Lamirande E, Gagnon C. Human sperm hyperactivation and capacitation as parts of an oxidative process. *Free Radic Biol Med*. 1993;14(2):157-66.
32. Burrows PJ, Schrepferman CG, Lipshultz LI. Comprehensive office evaluation in the new millennium. *Urol Clin North Am*. 2002;29(4):873-94.
33. Evenson DP, Jost LK, Marshall D, Zinaman MJ, Clegg E, Purvis K, de Angelis P, Claussen OP. Utility of the sperm chromatin structure assay as a diagnostic and prognostic tool in the human fertility clinic. *Hum Reprod*. 1999;14(4):1039-49.
34. Thacker S, Yadav SP, Sharma RK, Kashou A, Willard B, Zhang D, Agarwal A. Evaluation of sperm proteins in infertile men: a proteomic approach. *Fertil Steril*. 2011;95(8):2745-8.

35. de Lamirande E, Gagnon C. Impact of reactive oxygen species on spermatozoa: a balancing act between beneficial and detrimental effects. *Hum Reprod.* 1995;10 Suppl 1:15-21.
36. Padron OF, Brackett NL, Sharma RK, Lynne CM, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Seminal reactive oxygen species and sperm motility and morphology in men with spinal cord injury. *Fertil Steril.* 1997;67(6):1115-20.
37. Aitken RJ. The Amoroso Lecture. The human spermatozoon--a cell in crisis? *J Reprod Fertil.* 1999;115(1):1-7.
38. Urso ML, Clarkson PM. Oxidative stress, exercise, and antioxidant supplementation. *Toxicology.* 2003;189(1-2):41-54.
39. Warren JS, Johnson KJ, Ward PA. Oxygen radicals in cell injury and cell death. *Pathol Immunopathol Res.* 1987;6(5-6):301-15.
40. Aitken RJ, West KM. Analysis of the relationship between reactive oxygen species production and leucocyte infiltration in fractions of human semen separated on Percoll gradients. *Int J Androl.* 1990;13(6):433-51.
41. Hendin BN, Kolettis PN, Sharma RK, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. *J Urol.* 1999;161(6):1831-4.
42. Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni S. What an andrologist/urologist should know about free radicals and why. *Urology.* 2006;67(1):2-8.
43. Gutteridge JM, Halliwell B. Iron toxicity and oxygen radicals. *Baillieres Clin Haematol.* 1989;2(2):195-256.

44. Lewis SE, Boyle PM, McKinney KA, Young IS, Thompson W. Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil Steril*. 1995;64(4):868-70.
45. Sies H. Strategies of antioxidant defense. *Eur J Biochem*. 1993;215(2):213-9.
46. Agarwal A, Prabakaran SA. Mechanism, measurement, and prevention of oxidative stress in male reproductive physiology. *Indian J Exp Biol*. 2005;43(11):963-74.
47. Gavella M, Lipovac V. NADH-dependent oxidoreductase (diaphorase) activity and isozyme pattern of sperm in infertile men. *Arch Androl*. 1992;28(2):135-41.
48. Aitken RJ, Clarkson JS. Cellular basis of defective sperm function and its association with the genesis of reactive oxygen species by human spermatozoa. *J Reprod Fertil*. 1987;81(2):459-69.
49. Wang X, Sharma RK, Gupta A, George V, Thomas AJ, Falcone T, Agarwal A. Alterations in mitochondria membrane potential and oxidative stress in infertile men: a prospective observational study. *Fertil Steril*. 2003;80 Suppl 2:844-50.
50. Aitken RJ. A free radical theory of male infertility. *Reprod Fertil Dev*. 1994;6(1):19-23; discussion -4.
51. St John JC, Sakkas D, Barratt CL. A role for mitochondrial DNA and sperm survival. *J Androl*. 2000;21(2):189-99.
52. Zini A, de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species in semen of infertile patients: levels of superoxide dismutase- and catalase-like activities in seminal plasma and spermatozoa. *Int J Androl*. 1993;16(3):183-8.
53. Sanocka D, Kurpisz M. Reactive oxygen species and sperm cells. *Reprod Biol Endocrinol*. 2004;2:12.

54. Jones R, Mann T, Sherins R. Peroxidative breakdown of phospholipids in human spermatozoa, spermicidal properties of fatty acid peroxides, and protective action of seminal plasma. *Fertil Steril*. 1979;31(5):531-7.
55. Gomez E, Buckingham DW, Brindle J, Lanzafame F, Irvine DS, Aitken RJ. Development of an image analysis system to monitor the retention of residual cytoplasm by human spermatozoa: correlation with biochemical markers of the cytoplasmic space, oxidative stress, and sperm function. *J Androl*. 1996;17(3):276-87.
56. Gomez E, Irvine DS, Aitken RJ. Evaluation of a spectrophotometric assay for the measurement of malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals in human spermatozoa: relationships with semen quality and sperm function. *Int J Androl*. 1998;21(2):81-94.
57. Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. The reactive oxygen species-total antioxidant capacity score is a new measure of oxidative stress to predict male infertility. *Hum Reprod*. 1999;14(11):2801-7.
58. Aitken RJ, Buckingham DW, West KM. Reactive oxygen species and human spermatozoa: analysis of the cellular mechanisms involved in luminol- and lucigenin-dependent chemiluminescence. *J Cell Physiol*. 1992;151(3):466-77.
59. Aitken RJ, Gordon E, Harkiss D, Twigg JP, Milne P, Jennings Z, Irvine DS. Relative impact of oxidative stress on the functional competence and genomic integrity of human spermatozoa. *Biol Reprod*. 1998;59(5):1037-46.
60. de Lamirande E, Gagnon C. Reactive oxygen species and human spermatozoa. I. Effects on the motility of intact spermatozoa and on sperm axonemes. *J Androl*. 1992;13(5):368-78.

61. Haaf T, Ward DC. Higher order nuclear structure in mammalian sperm revealed by in situ hybridization and extended chromatin fibers. *Exp Cell Res.* 1995;219(2):604-11.
62. Sakkas D, Mariethoz E, Manicardi G, Bizzaro D, Bianchi PG, Bianchi U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. *Rev Reprod.* 1999;4(1):31-7.
63. Aitken RJ, Irvine DS, Wu FC. Prospective analysis of sperm-oocyte fusion and reactive oxygen species generation as criteria for the diagnosis of infertility. *Am J Obstet Gynecol.* 1991;164(2):542-51.
64. Saleh RA, Agarwal A, Kandirali E, Sharma RK, Thomas AJ, Nada EA, Evenson DP, Alvarez JG. Leukocytospermia is associated with increased reactive oxygen species production by human spermatozoa. *Fertil Steril.* 2002;78(6):1215-24.
65. Lemkecher T, Dartigues S, Vaysse J, Kulski O, Barraud-Lange V, Gattegno L, Wolf JP. [Leucocytospermia, oxidative stress and male fertility: facts and hypotheses]. *Gynecol Obstet Fertil.* 2005;33(1-2):2-10.
66. 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.
67. Shekarriz M, Sharma RK, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Positive myeloperoxidase staining (Endtz test) as an indicator of excessive reactive oxygen species formation in semen. *J Assist Reprod Genet.* 1995;12(2):70-4.
68. Cocuzza M, Athayde KS, Agarwal A, Sharma R, Pagani R, Lucon AM, Srougi M, Hallak J. Age-related increase of reactive oxygen species in neat semen in healthy fertile men. *Urology.* 2008;71(3):490-4.

69. Novotny J, Oborna II, Brezinova J, Svobodova M, Hrbac J, Fingerova H. The occurrence of reactive oxygen species in the semen of males from infertile couples. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2003;147(2):173-6.
70. Kunzle R, Mueller MD, Hanggi W, Birkhauser MH, Drescher H, Bersinger NA. Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil Steril.* 2003;79(2):287-91.
71. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Jr. Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril.* 2002;78(3):491-9.
72. Gate L, Paul J, Ba GN, Tew KD, Tapiero H. Oxidative stress induced in pathologies: the role of antioxidants. *Biomed Pharmacother.* 1999;53(4):169-80.
73. De Rosa M, Zarrilli S, Paesano L, Carbone U, Boggia B, Petretta M, Maisto A, Cimmino F, Puca G, Colao A, Lombardi G. Traffic pollutants affect fertility in men. *Hum Reprod.* 2003;18(5):1055-61.
74. Schlesinger MH, Wilets IF, Nagler HM. Treatment outcome after varicocele. A critical analysis. *Urol Clin North Am.* 1994;21(3):517-29.
75. Bedaiwy MA, Falcone T. Peritoneal fluid environment in endometriosis. Clinicopathological implications. *Minerva Ginecol.* 2003;55(4):333-45.
76. Tulloch WS. A consideration of sterility factors in the light of subsequent pregnancies. *Edinburgh Med J.* 1952;59:29-34.
77. Tulloch WS. Varicocele in subfertility; results of treatment. *Br Med J.* 1955;2(4935):356-8.

78. MacLeod J. Seminal cytology in the presence of varicocele. *Fertil Steril*. 1965;16(6):735-57.
79. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. World Health Organization. *Fertil Steril*. 1992;57(6):1289-93.
80. Canales BK, Zapzalka DM, Ercole CJ, Carey P, Haus E, Aeppli D, Pryor JL. Prevalence and effect of varicoceles in an elderly population. *Urology*. 2005;66(3):627-31.
81. Green KF, Turner TT, Howards SS. Varicocele: reversal of the testicular blood flow and temperature effects by varicocele repair. *J Urol*. 1984;131(6):1208-11.
82. Witt MA, Lipshultz LI. Varicocele: a progressive or static lesion? *Urology*. 1993;42(5):541-3.
83. Gorelick JJ, Goldstein M. Loss of fertility in men with varicocele. *Fertil Steril*. 1993;59(3):613-6.
84. Oster J. Varicocele in children and adolescents. An investigation of the incidence among Danish school children. *Scand J Urol Nephrol*. 1971;5(1):27-32.
85. Naughton CK, Nangia AK, Agarwal A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update*. 2001;7(5):473-81.
86. Fretz PC, Sandlow JJ. Varicocele: current concepts in pathophysiology, diagnosis, and treatment. *Urol Clin North Am*. 2002;29(4):921-37.
87. Benoff S, Gilbert BR. Varicocele and male infertility: part I. Preface. *Hum Reprod Update*. 2001;7(1):47-54.

88. Mitropoulos D, Deliconstantinos G, Zervas A, Villiotou V, Dimopoulos C, Stavrides J. Nitric oxide synthase and xanthine oxidase activities in the spermatic vein of patients with varicocele: a potential role for nitric oxide and peroxynitrite in sperm dysfunction. *J Urol*. 1996;156(6):1952-8.
89. Ozbek E, Turkoz Y, Gokdeniz R, Davarci M, Ozugurlu F. Increased nitric oxide production in the spermatic vein of patients with varicocele. *Eur Urol*. 2000;37(2):172-5.
90. Jarow JP. Effects of varicocele on male fertility. *Hum Reprod Update*. 2001;7(1):59-64.
91. Marks JL, McMahon R, Lipshultz LI. Predictive parameters of successful varicocele repair. *J Urol*. 1986;136(3):609-12.
92. Rageth JC, Unger C, DaRugna D, Steffen R, Stucki D, Barone C, Eijsten A, Rutishauser G, Leibundgut B, Gallo LM, et al. Long-term results of varicocelectomy. *Urol Int*. 1992;48(3):327-31.
93. Sylora JA, Pryor JL. Varicocele. *Curr Ther Endocrinol Metab*. 1994;5:309-14.
94. WHO. World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press; 1992.
95. Pinto KJ, Kroovand RL, Jarow JP. Varicocele related testicular atrophy and its predictive effect upon fertility. *J Urol*. 1994;152(2 Pt 2):788-90.
96. Marmar JL, Kim Y. Subinguinal microsurgical varicocelectomy: a technical critique and statistical analysis of semen and pregnancy data. *J Urol*. 1994;152(4):1127-32.

97. Matthews GJ, Matthews ED, Goldstein M. Induction of spermatogenesis and achievement of pregnancy after microsurgical varicocelectomy in men with azoospermia and severe oligoasthenospermia. *Fertil Steril*. 1998;70(1):71-5.
98. Madgar I, Weissenberg R, Lunenfeld B, Karasik A, Goldwasser B. Controlled trial of high spermatic vein ligation for varicocele in infertile men. *Fertil Steril*. 1995;63(1):120-4.
99. Dubin L, Amelar RD. Varicocelectomy as therapy in male infertility: a study of 504 cases. *J Urol*. 1975;113(5):640-1.
100. Nieschlag E, Hertle L, Fishedick A, Abshagen K, Behre HM. Update on treatment of varicocele: counselling as effective as occlusion of the vena spermatica. *Hum Reprod*. 1998;13(8):2147-50.
101. Agarwal A, Prabakaran S, Allamaneni SS. Relationship between oxidative stress, varicocele and infertility: a meta-analysis. *Reprod Biomed Online*. 2006;12(5):630-3.
102. Pasqualotto FF, Sundaram A, Sharma RK, Borges E, Jr., Pasqualotto EB, Agarwal A. Semen quality and oxidative stress scores in fertile and infertile patients with varicocele. *Fertil Steril*. 2008;89(3):602-7.
103. Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, Nakajima ST, Coutifaris C, Carson SA, Cisneros P, Steinkampf MP, Hill JA, Xu D, Vogel DL. Sperm morphology, motility, and concentration in fertile and infertile men. *N Engl J Med*. 2001;345(19):1388-93.
104. Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HW, Behre HM, Haugen TB, Kruger T, Wang C, Mbizvo MT, Vogelsong KM. World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Hum Reprod Update*. 2010;16(3):231-45.

105. Zini A, Kamal K, Phang D, Willis J, Jarvi K. Biologic variability of sperm DNA denaturation in infertile men. *Urology*. 2001;58(2):258-61.
106. WHO. World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination and processing of human semen - 5th ed. Geneva: WHO Press; 2010.
107. Nallella KP, Sharma RK, Allamaneni SS, Agarwal A. Identification of male factor infertility using a novel semen quality score and reactive oxygen species levels. *Clinics*. 2005;60(4):317-24.
108. Allamaneni SS, Agarwal A, Nallella KP, Sharma RK, Thomas AJ, Jr., Sikka SC. Characterization of oxidative stress status by evaluation of reactive oxygen species levels in whole semen and isolated spermatozoa. *Fertil Steril*. 2005;83(3):800-3.
109. 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.
110. Uehling DT. Fertility in men with varicocele. *Int J Fertil*. 1968;13(1):58-60.
111. Prader A. Testicular size: assessment and clinical importance. *Triangle*. 1966;7(6):240-3.
112. Dubin L, Amelar RD. Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. *Fertil Steril*. 1970;21(8):606-9.
113. World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: Cambridge University Press; 1999.

114. Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S. Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 1988;49(1):112-7.
115. Kruger TF. Atlas of Human Sperm Morphology Evaluation. first ed. London: Taylor & Francis 2004.
116. WHO. World Health Organization: WHO Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. New York: Cambridge University Press; 1999.
117. Evidence-based medicine. A new approach to teaching the practice of medicine. *Jama*. 1992;268(17):2420-5.
118. Glasziou P, Ogrinc G, Goodman S. Can evidence-based medicine and clinical quality improvement learn from each other? *BMJ Qual Saf*. 20 Suppl 1:i13-7.
119. Irvine S, Cawood E, Richardson D, MacDonald E, Aitken J. Evidence of deteriorating semen quality in the United Kingdom: birth cohort study in 577 men in Scotland over 11 years. *Bmj*. 1996;312(7029):467-71.
120. Paulsen CA, Berman NG, Wang C. Data from men in greater Seattle area reveals no downward trend in semen quality: further evidence that deterioration of semen quality is not geographically uniform. *Fertil Steril*. 1996;65(5):1015-20.
121. MacLeod J, Wang Y. Male fertility potential in terms of semen quality: a review of the past, a study of the present. *Fertil Steril*. 1979;31(2):103-16.
122. Bostofte E, Serup J, Rebbe H. Has the fertility of Danish men declined through the years in terms of semen quality? A comparison of semen qualities between 1952 and 1972. *Int J Fertil*. 1983;28(2):91-5.

123. Berling S, Wolner-Hanssen P. No evidence of deteriorating semen quality among men in infertile relationships during the last decade: a study of males from Southern Sweden. *Hum Reprod.* 1997;12(5):1002-5.
124. Sultan Sheriff D. Setting standards of male fertility I. Semen analyses in 1500 patients--a report. *Andrologia.* 1983;15(6):687-92.
125. Fisch H, Goluboff ET, Olson JH, Feldshuh J, Broder SJ, Barad DH. Semen analyses in 1,283 men from the United States over a 25-year period: no decline in quality. *Fertil Steril.* 1996;65(5):1009-14.
126. Auger J, Kunstmann JM, Czyglik F, Jouannet P. Decline in semen quality among fertile men in Paris during the past 20 years. *N Engl J Med.* 1995;332(5):281-5.
127. Bujan L, Mansat A, Pontonnier F, Mieusset R. Time series analysis of sperm concentration in fertile men in Toulouse, France between 1977 and 1992. *Bmj.* 1996;312(7029):471-2.
128. Solberg HE. The IFCC recommendation on estimation of reference intervals. The RefVal program. *Clin Chem Lab Med.* 2004;42(7):710-4.
129. Depuydt C, Zalata A, Christophe A, Mahmoud A, Comhaire F. Mechanisms of sperm deficiency in male accessory gland infection. *Andrologia.* 1998;30 Suppl 1:29-33.
130. Fariello RM, Del Giudice PT, Spaine DM, Fraietta R, Bertolla RP, Cedenho AP. Effect of leukocytospermia and processing by discontinuous density gradient on sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity. *J Assist Reprod Genet.* 2009;26(2-3):151-7.
131. Henkel R, Kierspel E, Stalf T, Mehnert C, Menkveld R, Tinneberg HR, Schill WB, Kruger TF. Effect of reactive oxygen species produced by spermatozoa

- and leukocytes on sperm functions in non-leukocytospermic patients. *Fertil Steril*. 2005;83(3):635-42.
132. Pasqualotto FF, Sharma RK, Nelson DR, Thomas AJ, Agarwal A. Relationship between oxidative stress, semen characteristics, and clinical diagnosis in men undergoing infertility investigation. *Fertil Steril*. 2000;73(3):459-64.
133. Sharma RK, Pasqualotto AE, Nelson DR, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Relationship between seminal white blood cell counts and oxidative stress in men treated at an infertility clinic. *J Androl*. 2001;22(4):575-83.
134. Ochsendorf FR. Infections in the male genital tract and reactive oxygen species. *Hum Reprod Update*. 1999;5(5):399-420.
135. Wolff H. The biologic significance of white blood cells in semen. *Fertil Steril*. 1995;63(6):1143-57.
136. Henkel R, Maass G, Hajimohammad M, Menkveld R, Stalf T, Villegas J, Sanchez R, Kruger TF, Schill WB. Urogenital inflammation: changes of leucocytes and ROS. *Andrologia*. 2003;35(5):309-13.
137. Potts JM, Pasqualotto FF. Seminal oxidative stress in patients with chronic prostatitis. *Andrologia*. 2003;35(5):304-8.
138. Baker HW, Brindle J, Irvine DS, Aitken RJ. Protective effect of antioxidants on the impairment of sperm motility by activated polymorphonuclear leukocytes. *Fertil Steril*. 1996;65(2):411-9.
139. Lackner JE, Lakovic E, Waldhor T, Schatzl G, Marberger M. Spontaneous variation of leukocytospermia in asymptomatic infertile males. *Fertil Steril*. 2008;90(5):1757-60.

140. Nelson CM, Bunge RG. Semen analysis: evidence for changing parameters of male fertility potential. *Fertil Steril*. 1974;25(6):503-7.
141. Bendvold E, Gottlieb C, Bygdeman M, Eneroth P. Depressed semen quality in Swedish men from barren couples: a study over three decades. *Arch Androl*. 1991;26(3):189-94.
142. Multigner L, Oliva A. Secular variations in sperm quality: fact or science fiction? *Cad Saude Publica*. 2002;18(2):403-12.
143. Homan GF, Davies M, Norman R. The impact of lifestyle factors on reproductive performance in the general population and those undergoing infertility treatment: a review. *Hum Reprod Update*. 2007;13(3):209-23.
144. Tielemans E, Burdorf A, te Velde ER, Weber RF, van Kooij RJ, Veulemans H, Heederik DJ. Occupationally related exposures and reduced semen quality: a case-control study. *Fertil Steril*. 1999;71(4):690-6.
145. Baranowska I. Lead and cadmium in human placentas and maternal and neonatal blood (in a heavily polluted area) measured by graphite furnace atomic absorption spectrometry. *Occup Environ Med*. 1995;52(4):229-32.
146. Borgeest C, Greenfeld C, Tomic D, Flaws JA. The effects of endocrine disrupting chemicals on the ovary. *Front Biosci*. 2002;7:d1941-8.
147. Bove F, Shim Y, Zeitz P. Drinking water contaminants and adverse pregnancy outcomes: a review. *Environ Health Perspect*. 2002;110 Suppl 1:61-74.
148. Hruska KS, Furth PA, Seifer DB, Sharara FI, Flaws JA. Environmental factors in infertility. *Clin Obstet Gynecol*. 2000;43(4):821-9.

149. Dummer TJ, Dickinson HO, Parker L. Adverse pregnancy outcomes near landfill sites in Cumbria, northwest England, 1950--1993. *Arch Environ Health*. 2003;58(11):692-8.
150. Adamopoulos DA, Pappa A, Nicopoulou S, Andreou E, Karamertzanis M, Michopoulos J, Deligianni V, Simou M. Seminal volume and total sperm number trends in men attending subfertility clinics in the greater Athens area during the period 1977-1993. *Hum Reprod*. 1996;11(9):1936-41.
151. Aging and infertility in women. *Fertil Steril*. 2006;86 Suppl 5:S248-52.
152. Baird DT, Collins J, Egozcue J, Evers LH, Gianaroli L, Leridon H, Sunde A, Templeton A, Van Steirteghem A, Cohen J, Crosignani PG, Devroey P, Diedrich K, Fauser BC, Fraser L, Glasier A, Liebaers I, Mautone G, Penney G, Tarlatzis B. Fertility and ageing. *Hum Reprod Update*. 2005;11(3):261-76.
153. Hamilton B, Martin J, Sutton P. Births: Preliminary data for 2002. National vital statistics reports; 2003. 51(11).
154. Guidelines for gamete and embryo donation. *Fertil Steril*. 2006;86 Suppl 5:S38-50.
155. Moskovtsev SI, Willis J, Mullen JB. Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility. *Fertil Steril*. 2006;85(2):496-9.
156. Wei YH, Lu CY, Wei CY, Ma YS, Lee HC. Oxidative stress in human aging and mitochondrial disease-consequences of defective mitochondrial respiration and impaired antioxidant enzyme system. *Chin J Physiol*. 2001;44(1):1-11.

157. Zubkova EV, Robaire B. Effect of glutathione depletion on antioxidant enzymes in the epididymis, seminal vesicles, and liver and on spermatozoa motility in the aging brown Norway rat. *Biol Reprod.* 2004;71(3):1002-8.
158. Ahmadi A, Ng SC. Fertilizing ability of DNA-damaged spermatozoa. *J Exp Zool.* 1999;284(6):696-704.
159. Balhorn R. A model for the structure of chromatin in mammalian sperm. *J Cell Biol.* 1982;93(2):298-305.
160. Carrell DT, Liu L. Altered protamine 2 expression is uncommon in donors of known fertility, but common among men with poor fertilizing capacity, and may reflect other abnormalities of spermiogenesis. *J Androl.* 2001;22(4):604-10.
161. Sakkas D, Seli E, Bizzaro D, Tarozzi N, Manicardi GC. Abnormal spermatozoa in the ejaculate: abortive apoptosis and faulty nuclear remodelling during spermatogenesis. *Reprod Biomed Online.* 2003;7(4):428-32.
162. Singh NP, Muller CH, Berger RE. Effects of age on DNA double-strand breaks and apoptosis in human sperm. *Fertil Steril.* 2003;80(6):1420-30.
163. Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS, Agarwal A. Clinical relevance of oxidative stress and sperm chromatin damage in male infertility: an evidence based analysis. *Int Braz J Urol.* 2007;33(5):603-21.
164. Xing W, Krishnamurthy H, Sairam MR. Role of follitropin receptor signaling in nuclear protein transitions and chromatin condensation during spermatogenesis. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;312(3):697-701.

165. Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Said TM, Sikka SC, Thomas AJ, Jr. Evaluation of nuclear DNA damage in spermatozoa from infertile men with varicocele. *Fertil Steril*. 2003;80(6):1431-6.
166. Potts RJ, Newbury CJ, Smith G, Notarianni LJ, Jefferies TM. Sperm chromatin damage associated with male smoking. *Mutat Res*. 1999;423(1-2):103-11.
167. Blumer CG, Fariello RM, Restelli AE, Spaine DM, Bertolla RP, Cedenho AP. Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. *Fertil Steril*. 2008;90(5):1716-22.
168. Moskova P, Popov I. [Sperm quality in smokers and nonsmokers among infertile families]. *Akush Ginekol (Sofia)*. 1993;32(1):28-30.
169. Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm AS, Jensen MS, Toft G, Bonde JP. Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum Reprod*. 2007;22(1):188-96.
170. Zhang JP, Meng QY, Wang Q, Zhang LJ, Mao YL, Sun ZX. Effect of smoking on semen quality of infertile men in Shandong, China. *Asian J Androl*. 2000;2(2):143-6.
171. Vine MF, Tse CK, Hu P, Truong KY. Cigarette smoking and semen quality. *Fertil Steril*. 1996;65(4):835-42.
172. Chia SE, Ong CN, Tsakok FM. Effects of cigarette smoking on human semen quality. *Arch Androl*. 1994;33(3):163-8.
173. Gaur DS, Talekar M, Pathak VP. Effect of cigarette smoking on semen quality of infertile men. *Singapore Med J*. 2007;48(2):119-23.

174. Taszarek HG, Depa-Martynow M, Derwich K, Pawelczyk L, Jedrzejczak P. [The influence of cigarette smoking on sperm quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples]. *Przegl Lek.* 2005;62(10):978-81.
175. Belcheva A, Ivanova-Kicheva M, Tzvetkova P, Marinov M. Effects of cigarette smoking on sperm plasma membrane integrity and DNA fragmentation. *Int J Androl.* 2004;27(5):296-300.
176. Pasqualotto FF, Umezu FM, Salvador M, Borges E, Jr., Sobreiro BP, Pasqualotto EB. Effect of cigarette smoking on antioxidant levels and presence of leukocytospermia in infertile men: a prospective study. *Fertil Steril.* 2008;90(2):278-83.
177. Curling TB. A Practical Treatise on the Disease of the Testis and of the Spermatic Cord and Scrotum. Philadelphia, PA: Blanchard & Lea 1956.
178. Barwell R. 100 cases of varicocele treated by the subcutaneous wire loop. *Lancet.* 1885;1:978.
179. Lipshultz LI, Corriere JN, Jr. Progressive testicular atrophy in the varicocele patient. *J Urol.* 1977;117(2):175-6.
180. Zini A, Buckspan M, Berardinucci D, Jarvi K. Loss of left testicular volume in men with clinical left varicocele: correlation with grade of varicocele. *Arch Androl.* 1998;41(1):37-41.
181. Sigman M, Jarow JP. Ipsilateral testicular hypotrophy is associated with decreased sperm counts in infertile men with varicoceles. *J Urol.* 1997;158(2):605-7.
182. Sakamoto H, Ogawa Y. Does a clinical varicocele influence the relationship between testicular volume by ultrasound and testicular function in patients with infertility? *Fertil Steril.* 2009;92(5):1632-7.

183. Dubin L, Hotchkiss RS. Testis biopsy in subfertile men with varicocele. *Fertil Steril*. 1969;20(1):51-7.
184. Agger P, Johnsen SG. Quantitative evaluation of testicular biopsies in varicocele. *Fertil Steril*. 1978;29(1):52-7.
185. Johnsen SG, Agger P. Quantitative evaluation of testicular biopsies before and after operation for varicocele. *Fertil Steril*. 1978;29(1):58-63.
186. Sakamoto H, Yajima T, Nagata M, Okumura T, Suzuki K, Ogawa Y. Relationship between testicular size by ultrasonography and testicular function: measurement of testicular length, width, and depth in patients with infertility. *Int J Urol*. 2008;15(6):529-33.
187. Takihara H, Cosentino MJ, Sakatoku J, Cockett AT. Significance of testicular size measurement in andrology: II. Correlation of testicular size with testicular function. *J Urol*. 1987;137(3):416-9.
188. Chipkevitch E, Nishimura RT, Tu DG, Galea-Rojas M. Clinical measurement of testicular volume in adolescents: comparison of the reliability of 5 methods. *J Urol*. 1996;156(6):2050-3.
189. Sakamoto H, Saito K, Ogawa Y, Yoshida H. Testicular volume measurements using Prader orchidometer versus ultrasonography in patients with infertility. *Urology*. 2007;69(1):158-62.
190. Sakamoto H, Saito K, Oohta M, Inoue K, Ogawa Y, Yoshida H. Testicular volume measurement: comparison of ultrasonography, orchidometry, and water displacement. *Urology*. 2007;69(1):152-7.
191. Bailey TL, Hudson RS, Powe TA, Riddell MG, Wolfe DF, Carson RL. Caliper and ultrasonographic measurements of bovine testicles and a

- mathematical formula for determining testicular volume and weight in vivo. *Theriogenology*. 1998;49(3):581-94.
192. Behre HM, Nashan D, Nieschlag E. Objective measurement of testicular volume by ultrasonography: evaluation of the technique and comparison with orchidometer estimates. *Int J Androl*. 1989;12(6):395-403.
193. Lenz S, Giwercman A, Elsborg A, Cohr KH, Jelnes JE, Carlsen E, Skakkebaek NE. Ultrasonic testicular texture and size in 444 men from the general population: correlation to semen quality. *Eur Urol*. 1993;24(2):231-8.
194. Sakamoto H, Ogawa Y, Yoshida H. Relationship between testicular volume and testicular function: comparison of the Prader orchidometric and ultrasonographic measurements in patients with infertility. *Asian J Androl*. 2008;10(2):319-24.
195. Shiraishi K, Takihara H, Kamiryo Y, Naito K. Usefulness and limitation of punched-out orchidometer in testicular volume measurement. *Asian J Androl*. 2005;7(1):77-80.
196. Handelsman DJ, Conway AJ, Boylan LM, Turtle JR. Testicular function in potential sperm donors: normal ranges and the effects of smoking and varicocele. *Int J Androl*. 1984;7(5):369-82.
197. Allamaneni SS, Naughton CK, Sharma RK, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Increased seminal reactive oxygen species levels in patients with varicoceles correlate with varicocele grade but not with testis size. *Fertil Steril*. 2004;82(6):1684-6.
198. Macleod J, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. II. Spermatozoon counts in 1000 men of known fertility and in 1000 cases of infertile marriage. *J Urol*. 1951;66(3):436-49.

-
199. Macleod J, Gold RZ. The male factor in fertility and infertility. III. An analysis of motile activity in the spermatozoa of 1000 fertile men and 1000 men in infertile marriage. *Fertil Steril*. 1951;2(3):187-204.
200. Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, Cox A, Vlasselaer J, Gyselaers W, Vandeput H, Gielen J, Pollet H, Maes M, Steeno O, Kruger T. Semen parameters in a fertile versus subfertile population: a need for change in the interpretation of semen testing. *Hum Reprod*. 1997;12(5):987-93.
201. WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile male. Cambridge: Cambridge University Press; 2003.
202. Helmerhorst FM, Oei SG, Bloemenkamp KW, Keirse MJ. Consistency and variation in fertility investigations in Europe. *Hum Reprod*. 1995;10(8):2027-30.
203. Nallella KP, Sharma RK, Aziz N, Agarwal A. Significance of sperm characteristics in the evaluation of male infertility. *Fertil Steril*. 2006;85(3):629-34.
204. Bonde JP, Ernst E, Jensen TK, Hjollund NH, Kolstad H, Henriksen TB, Scheike T, Giwercman A, Olsen J, Skakkebaek NE. Relation between semen quality and fertility: a population-based study of 430 first-pregnancy planners. *Lancet*. 1998;352(9135):1172-7.
205. Slama R, Eustache F, Ducot B, Jensen TK, Jorgensen N, Horte A, Irvine S, Suominen J, Andersen AG, Auger J, Vierula M, Toppari J, Andersen AN, Keiding N, Skakkebaek NE, Spira A, Jouannet P. Time to pregnancy and semen parameters: a cross-sectional study among fertile couples from four European cities. *Hum Reprod*. 2002;17(2):503-15.
206. Ombelet W, Bosmans E, Janssen M, Cox A, Maes M, Punjabi U, Blaton V, Gunst J, Haidl G, Wouters E, Spiessens C, Bornman MS, Pienaar E,

- Menkveld R, Lombard CJ. Multicenter study on reproducibility of sperm morphology assessments. *Arch Androl.* 1998;41(2):103-14.
207. Menkveld R, Wong WY, Lombard CJ, Wetzels AM, Thomas CM, Merkus HM, Steegers-Theunissen RP. Semen parameters, including WHO and strict criteria morphology, in a fertile and subfertile population: an effort towards standardization of in-vivo thresholds. *Hum Reprod.* 2001;16(6):1165-71.
208. Hauser R, Paz G, Botchan A, Yogev L, Yavetz H. Varicocele: effect on sperm functions. *Hum Reprod Update.* 2001;7(5):482-5.
209. Marmar JL. The pathophysiology of varicoceles in the light of current molecular and genetic information. *Hum Reprod Update.* 2001;7(5):461-72.
210. Fariss BL, Fenner DK, Plymate SR, Brannen GE, Jacob WH, Thomason AM. Seminal characteristics in the presence of a varicocele as compared with those of expectant fathers and prevasectomy men. *Fertil Steril.* 1981;35(3):325-7.
211. de Castro MP, Mastroiocco DA. Reproductive history and semen analysis in prevasectomy fertile men with and without varicocele. *J Androl.* 1984;5(1):17-20.
212. Aitken RJ, Clarkson JS, Fishel S. Generation of reactive oxygen species, lipid peroxidation, and human sperm function. *Biol Reprod.* 1989;41(1):183-97.
213. Agarwal A, Allamaneni SS, Said TM. Chemiluminescence technique for measuring reactive oxygen species. *Reprod Biomed Online.* 2004;9(4):466-8.
214. Kricka LJ, Whitehead TP. Chemiluminescent and bioluminescent immunoassays. *J Pharm Biomed Anal.* 1987;5(8):829-33.

215. Shekarriz M, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Incidence and level of seminal reactive oxygen species in normal men. *Urology*. 1995;45(1):103-7.
216. Evers JL, Collins JA. Assessment of efficacy of varicocele repair for male subfertility: a systematic review. *Lancet*. 2003;361(9372):1849-52.
217. Cayan S, Shavakhabov S, Kadioglu A. Treatment of palpable varicocele in infertile men: a meta-analysis to define the best technique. *J Androl*. 2009;30(1):33-40.
218. Pryor JL, Howards SS. Varicocele. *Urol Clin North Am*. 1987;14(3):499-513.
219. Schlegel PN. Is assisted reproduction the optimal treatment for varicocele-associated male infertility? A cost-effectiveness analysis. *Urology*. 1997;49(1):83-90.
220. Evers JL, Collins JA. Surgery or embolisation for varicocele in subfertile men. *Cochrane Database Syst Rev*. 2004;(3):CD000479.
221. Ficarra V, Cerruto MA, Liguori G, Mazzoni G, Minucci S, Tracia A, Gentile V. Treatment of varicocele in subfertile men: The Cochrane Review--a contrary opinion. *Eur Urol*. 2006;49(2):258-63.
222. Nilsson S, Edvinsson A, Nilsson B. Improvement of semen and pregnancy rate after ligation and division of the internal spermatic vein: fact or fiction? *Br J Urol*. 1979;51(6):591-6.
223. Breznik R, Vlasisavljevic V, Borko E. Treatment of varicocele and male fertility. *Arch Androl*. 1993;30(3):157-60.
224. Yamamoto M, Hibi H, Hirata Y, Miyake K, Ishigaki T. Effect of varicocelectomy on sperm parameters and pregnancy rate in patients with

- subclinical varicocele: a randomized prospective controlled study. *J Urol*. 1996;155(5):1636-8.
225. Grasso M, Lania C, Castelli M, Galli L, Franzoso F, Rigatti P. Low-grade left varicocele in patients over 30 years old: the effect of spermatic vein ligation on fertility. *BJU Int*. 2000;85(3):305-7.
226. Unal D, Yeni E, Verit A, Karatas OF. Clomiphene citrate versus varicocelectomy in treatment of subclinical varicocele: a prospective randomized study. *Int J Urol*. 2001;8(5):227-30.
227. 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.
228. Marmar JL, Agarwal A, Prabakaran S, Agarwal R, Short RA, Benoff S, Thomas AJ, Jr. Reassessing the value of varicocelectomy as a treatment for male subfertility with a new meta-analysis. *Fertil Steril*. 2007.
229. Daitch JA, Bedaiwy MA, Pasqualotto EB, Hendin BN, Hallak J, Falcone T, Thomas AJ, Jr., Nelson DR, Agarwal A. Varicocelectomy improves intrauterine insemination success rates in men with varicocele. *J Urol*. 2001;165(5):1510-3.
230. Macleod J. Further observations on the role of varicocele in human male infertility. *Fertil Steril*. 1969;20(4):545-63.
231. Gil-Guzman E, Ollero M, Lopez MC, Sharma RK, Alvarez JG, Thomas AJ, Jr., Agarwal A. Differential production of reactive oxygen species by subsets of human spermatozoa at different stages of maturation. *Hum Reprod*. 2001;16(9):1922-30.

- 232. Cervellione RM, Cervato G, Zampieri N, Corroppo M, Camoglio F, Cestaro B, Ottolenghi A. Effect of varicocelectomy on the plasma oxidative stress parameters. *J Pediatr Surg.* 2006;41(2):403-6.
- 233. Chen SS, Huang WJ, Chang LS, Wei YH. Attenuation of oxidative stress after varicocelectomy in subfertile patients with varicocele. *J Urol.* 2008;179(2):639-42.
- 234. Smit M, Romijn JC, Wildhagen MF, Veldhoven JL, Weber RF, Dohle GR. Decreased sperm DNA fragmentation after surgical varicocelectomy is associated with increased pregnancy rate. *J Urol.* 2010;183(1):270-4.
- 235. Lacerda JI, Del Giudice PT, da Silva BF, Nichi M, Fariello RM, Fraietta R, Restelli AE, Blumer CG, Bertolla RP, Cedenho AP. Adolescent varicocele: improved sperm function after varicocelectomy. *Fertil Steril.* 95(3):994-9.
- 236. Fogh-Andersen P, Nielsen NC, Rebbe H, Stakemann G. The effect on fertility of ligation of the left spermatic vein in men without clinical signs of varicocele. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 1975;54(1):29-32.
- 237. Kursh ED. What is the incidence of varicocele in a fertile population? *Fertil Steril.* 1987;48(3):510-1.
- 238. Meacham RB, Townsend RR, Rademacher D, Droese JA. The incidence of varicoceles in the general population when evaluated by physical examination, gray scale sonography and color Doppler sonography. *J Urol.* 1994;151(6):1535-8.
- 239. Trum JW, Gubler FM, Laan R, van der Veen F. The value of palpation, varicoscreen contact thermography and colour Doppler ultrasound in the diagnosis of varicocele. *Hum Reprod.* 1996;11(6):1232-5.

- 240. Jarow JP, Ogle SR, Eskew LA. Seminal improvement following repair of ultrasound detected subclinical varicoceles. *J Urol*. 1996;155(4):1287-90.
- 241. Yarborough MA, Burns JR, Keller FS. Incidence and clinical significance of subclinical scrotal varicoceles. *J Urol*. 1989;141(6):1372-4.
- 242. Hargreave TB, Liakatas J. Physical examination for varicocele. *Br J Urol*. 1991;67(3):328.
- 243. Steckel J, Dicker AP, Goldstein M. Relationship between varicocele size and response to varicocelectomy. *J Urol*. 1993;149(4):769-71.
- 244. Elbendary MA, Elbadry AM. Right subclinical varicocele: how to manage in infertile patients with clinical left varicocele? *Fertil Steril*. 2009.
- 245. Dhabuwala CB, Hamid S, Moghissi KS. Clinical versus subclinical varicocele: improvement in fertility after varicocelectomy. *Fertil Steril*. 1992;57(4):854-7.
- 246. Grasso M, Lania C, Castelli M, Galli L, Rigatti P. Bilateral varicocele: impact of right spermatic vein ligation on fertility. *J Urol*. 1995;153(6):1847-8.
- 247. Scherr D, Goldstein M. Comparison of bilateral versus unilateral varicocelectomy in men with palpable bilateral varicoceles. *J Urol*. 1999;162(1):85-8.
- 248. Libman J, Jarvi K, Lo K, Zini A. Beneficial effect of microsurgical varicocelectomy is superior for men with bilateral versus unilateral repair. *J Urol*. 2006;176(6 Pt 1):2602-5; discussion 5.
- 249. Gat Y, Bachar GN, Zukerman Z, Belenky A, Gornish M. Varicocele: a bilateral disease. *Fertil Steril*. 2004;81(2):424-9.

250. Gat Y, Bachar GN, Zukerman Z, Belenky A, Gorenish M. Physical examination may miss the diagnosis of bilateral varicocele: a comparative study of 4 diagnostic modalities. *J Urol.* 2004;172(4 Pt 1):1414-7.
251. Takahara M, Ichikawa T, Shiseki Y, Nakamura T, Shimazaki J. Relationship between grade of varicocele and the response to varicocelectomy. *Int J Urol.* 1996;3(4):282-5.
252. Koksall IT, Tefekli A, Usta M, Erol H, Abbasoglu S, Kadioglu A. The role of reactive oxygen species in testicular dysfunction associated with varicocele. *BJU Int.* 2000;86(4):549-52.
253. 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.
254. Saypol DC. Varicocele. *J Androl.* 1981;2:61-71.
255. Nagao RR, Plymate SR, Berger RE, Perin EB, Paulsen CA. Comparison of gonadal function between fertile and infertile men with varicoceles. *Fertil Steril.* 1986;46(5):930-3.
256. Mostafa T, Anis T, Imam H, El-Nashar AR, Osman IA. Seminal reactive oxygen species-antioxidant relationship in fertile males with and without varicocele. *Andrologia.* 2009;41(2):125-9.
257. Mostafa T, Anis T, El Nashar A, Imam H, Osman I. Seminal plasma reactive oxygen species-antioxidants relationship with varicocele grade. *Andrologia.* In press 2011.
258. Dubin L, Amelar RD. Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility. *Fertil Steril.* 1971;22(8):469-74.

259. Thomason AM, Fariss BL. The prevalence of varicoceles in a group of healthy young men. *Mil Med.* 1979;144(3):181-2.
260. Redmon JB, Carey P, Pryor JL. Varicocele--the most common cause of male factor infertility? *Hum Reprod Update.* 2002;8(1):53-8.
261. Sayfan J, Siplovich L, Koltun L, Benyamin N. Varicocele treatment in pubertal boys prevents testicular growth arrest. *J Urol.* 1997;157(4):1456-7.
262. Haans LC, Laven JS, Mali WP, te Velde ER, Wensing CJ. Testis volumes, semen quality, and hormonal patterns in adolescents with and without a varicocele. *Fertil Steril.* 1991;56(4):731-6.