

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

VICTOR CÉSAR DE PAULA SILVEIRA DO NASCIMENTO

Comprimento telomérico de espermatozoides de homens com varicocele

Ribeirão Preto

2022

VICTOR CÉSAR DE PAULA SILVEIRA DO NASCIMENTO

Comprimento telomérico de espermatozoides de homens com varicocele

Dissertação apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Versão Corrigida: A versão original encontra-se disponível tanto na Biblioteca da Unidade que aloja o Programa, quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Rosana Maria dos Reis

Ribeirão Preto

2022

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho por qualquer meio convencional ou eletrônico para fins de estudo e pesquisa, desde que seja citada a fonte.

Nascimento, Victor César de Paula Silveira do

Comprimento telomérico de espermatozoides de homens com varicocele, 2022.

80p: il.; 30cm

Dissertação apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Orientadora: Prof^a Dr^a Rosana Maria dos Reis.

1. Varicocele. 2. Telômero 3. Espermatozoide
2. 4. Qualidade seminal 5. Infertilidade.

Folha de Aprovação

FOLHA DE APROVAÇÃO

Victor César de Paula Silveira do Nascimento

Comprimento telomérico de espermatozoides de homens com varicocele.

Dissertação apresentada ao Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção do Título de Mestre em Ciências Médicas.

Área de Concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof^aDr^a. Rosana Maria dos Reis

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes Molina

Instituição: FMRP-USP

Assinatura: _____

Prof. Dr. Jorge Hallak

Instituição: FM-USP

Assinatura: _____

Dedicatória

À Deus, por estar sempre comigo.

À minha esposa, Marina, por todo amor, incentivo e apoio.

*Aos meus filhos, Benício e Vicente, mesmo pequenos, demonstraram carinhos nos
momentos necessários.*

Aos meus pais, por serem exemplos em tudo.

Agradecimientos

Agradeço à minha orientadora, Prof^a Dra. Rosana Maria dos Reis, pela oportunidade de realizar este trabalho. Sempre me apoiando e dando todo o suporte necessário em todo o trajeto de pesquisa.

A todos os médicos colaboradores: Dra. Bruna Sesma Barreto, Dr. Luis Carlos Hornburg Jr e Dr. Leopoldo Ruiz Machado, por orientar os pacientes e convidá-los a participar da pesquisa. .

Aos pacientes e voluntários, pela colaboração e disponibilidade em participar, e por acreditarem no potencial deste estudo.

À CAPES e ao PROEX, pelo apoio na realização deste trabalho.

Aos colegas: Murilo Racy Soares e Carolina Gennari Verruma., Cristina Padova e, Prof^a Dra. Juliana Meola, pelo suporte na execução dos experimentos. O auxílio de vocês foram fundamentais para que tudo chegasse ao final.

Ao Prof. Dr. Rodrigo Tocantis Calado pela parceria.

À Barbara Santana, pela colaboração no projeto, auxiliando na execução da técnica de qPCR, para análise do comprimento telomérico.

A Cristina Libardi Miranda Furtado, pela orientação técnica em todo o projeto, auxiliando na interpretação dos resultados, monitorando as extrações de DNA, dando todo suporte necessário, mesmo distante.

A Suleimy Cristina Mazin, por toda análise estatística.

A minha esposa Marina Mendonça Silva do Nascimento, por me dar todo suporte emocional, estando ao meu lado em todos os momentos difíceis.

Aos meus filhos, Benício Mendonça do Nascimento e Vicente Mendonça do Nascimento, por fazerem parte desta conquista, pois eles foram determinantes para que tudo isso se concretizasse.

Epífase

*“O que vale na vida não é o ponto de partida e sim a caminhada. Caminhando e
semeando, no fim terás o que colher.”*

(Cora Coralina)

Resumo

NASCIMENTO, V.C.P.S. **Comprimento telomérico de espermatozoides de homens com varicocele**. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

A varicocele é encontrada em cerca de 20% da população, e é considerada a maior causa de infertilidade masculina, podendo levar a um declínio progressivo da fertilidade, provavelmente ocasionado por alterações dos parâmetros seminais e aumento dos danos ao DNA espermático, principalmente associados ao aumento do estresse oxidativo. A baixa qualidade seminal e o estresse oxidativo em homens com varicocele podem estar relacionados à instabilidade genômica. Os telômeros possuem papel fundamental na manutenção da estabilidade genômica e da viabilidade celular, e o estresse oxidativo pode levar ao encurtamento telomérico. Trata-se de um estudo prospectivo observacional do tipo caso-controle, sendo o grupo de estudo formado por 15 homens com varicocele e 19 homens férteis que não apresentavam a doença. A qualidade seminal foi avaliada através do espermograma, e foram dosadas as concentrações séricas dos hormônios luteinizantes (LH), folículo estimulante (FSH) e testosterona total. O comprimento telomérico espermático e leucocitário, foi aferido pelo método quantitativo da reação em cadeia da polimerase em tempo real (qPCR), comparando-se a sequência de um gene único conhecido (*single gene*) pela razão T/S. Nos resultados foram observadas alterações nos parâmetros seminais: concentração espermática, motilidade progressiva rápida, motilidade progressiva lenta, e morfologia de espermática segundo OMS, sendo estes com valores menores no grupo varicocele comparados com os parâmetros encontrados no grupo controle, apesar dos valores em ambos os grupos apresentarem dentro dos parâmetros de normalidade. Os níveis de hormônios gonadotróficos foram mais elevados no grupo varicocele (LH e FSH), sendo os níveis de testosterona total menores comparado ao grupo controle. A análise do comprimento dos telômeros foi realizada em uma subpopulação em ambos os grupos, sendo 9 casos no grupo com varicocele e 18 casos no grupo controle, e não foi encontrada diferença no comprimento dos telômeros nos leucócitos ou dos espermatozoides nos grupos varicocele e controle. Neste estudo o comprimento telomérico tanto no sangue quanto nos espermatozoides não se diferenciaram entre os grupos controle e varicocele. Possivelmente o reduzido número de casos analisados possa ser um limitante no estudo.

Palavras-chave: Varicocele, telômero, hormônios qualidade seminal.

Abstract

NASCIMENTO, V.C.P.S. **Telomeric length of sperm from men with varicocele.** Ribeirão Preto School of Medicine, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2022.

Varicocele is found in about 20% of the population, and is considered the major cause of male infertility, possibly leading to a progressive decline in fertility, probably caused by changes in seminal parameters and increased damage to sperm DNA, mainly associated with the increase of oxidative stress. Low seminal quality and oxidative stress in men with varicocele may be related to genomic instability. Telomeres play a key role in maintaining both genomic stability and cell viability, and oxidative stress can lead to telomere shortening. This is a prospective observational case-control study, with the study group comprising 15 men with varicocele and 19 fertile men who did not have the disease. The seminal quality was evaluated through the spermogram, and the serum concentrations of luteinizing hormones (LH), follicle stimulating hormone (FSH) and total testosterone were measured. The sperm and leukocyte telomere length was measured by the quantitative method of polymerase chain reaction in real time (qPCR), comparing the sequence of a single known gene (*single gene*) by means of the T/S ratio. In the results, alterations in the seminal parameters of sperm concentration, fast progressive motility, slow progressive motility, and sperm morphology according to WHO were observed, with lower values in the varicocele group compared with the parameters found in the control group, despite the values in both groups being within normal parameters. The levels of gonadotropic hormones were higher in the varicocele group (LH and FSH), with lower total testosterone levels compared to the control group. Telomere length analysis was performed on a subpopulation in both groups, 9 cases in the varicocele group and 18 cases in the control group, and no difference was found in telomere length in leukocytes or spermatozoa in the varicocele and control groups. In this study, telomere length in both blood and sperm did not differ between the control and varicocele groups. The small number of cases analyzed may be a limiting factor in the study.

Keywords: Varicocele, telomere, seminal quality hormones.

Lista de Figuras

Figura 1: Balanço entre produção de ROS e substâncias antioxidantes no ambiente testicular.....	27
Figura 2: : Fragmentos de DNA extraídos de sangue e espermatozoides em pacientes do grupo Varicocele e Controle . Gel de agarose 1,5% com 20ng DNA por poço em 20ng/μL.....	45
Figura 3: Fluxograma dos participantes do estudo.....	51
Figura4: Comprimento do telômero entre grupos.....	57

Lista de Tabelas

Tabela 1: Análise seminal dos grupos varicocele e controle	53
Tabela 2: Análise seminal de homens do grupo varicocele, de acordo com o grau da doença, comparado ao grupo controle.....	54
Tabela 3: Níveis hormonais dos homens do grupo varicocele e controle.....	55
Tabela 4: Comprimento do telômero nos leucócitos e nos espermatozoides dos homens com varicocele e controle	56
Tabela 5: Análise da correlação do comprimento telomérico nos espermatozoides com as variáveis espermáticas	58
Tabela 6: Análise da correlação do comprimento telomérico nos espermatozoides com as variáveis hormonais	59
Tabela 7: Correlação do comprimento telomérico no sangue com as variáveis em estudo.....	60
Tabela 8: Análise da correlação do comprimento telomérico no sangue com as variáveis hormonais.....	60

Lista de siglas e abreviaturas

ROS: Espécie reativa de oxigênio (“*reactive oxygen species*”)

TE: Telômero no espermatozoide

TC: Telômero no sangue

GV: Grupo varicocele

GC: Grupo controle

TERT: Transcriptase reversa

RNA: Ácido ribonucléico (“*ribonuclein acid*”)

TERC: Componente de RNA

DNA:Ácido desoxiribonucleico (“*deoxyribonucleic acid*”)

HERP: Hospital Estadual de Ribeirão Preto

LH: Hormônio Luteinizante (“*luteinizing hormone*”)

FSH: Hormônio Folículo Estimulante (“*follicle stimulating hormone*”)

TT: Hormônio Testosterona Total

FMRP/USP: Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

CE: Concentração espermática

CEP: Comitê de ética em pesquisa

CONEP: Comitê Nacional de Ética em Pesquisa

CAAE: Certificado de Apresentação Para Apreciação Ética

OMS: Organização Mundial em Saúde (“*World Health Organization*”)

pH: Potencial Hidrogeniônico (“*hydrogen potential*”)

PBS: Tampão Fosfato-salino

qPCR: Método quantitativo da reação em cadeia da polimerase (“*real- time polymerase chain reaction*”)

Razão T/S: Razão telômero- single gene.

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	25
1.1 Varicocele.....	25
1.2 Fisiopatologia da Varicocele.....	27
1.3 Varicocele e Infertilidade.....	29
1.4 Telômeros.....	30
1.4.1. Telômeros e Células Germinativas Masculina.....	32
1.5. Justificativa.....	36
2.OBJETIVOS.....	37
2.1.Objetivosgerais.....	38
2.2. Objetivos específicos.....	38
3.CASUÍSTICA,MATERIAL E MÉTODOS.....	39
3.1. Casuística.....	40
3.2. Metodologia.....	41
3.2.1.Coleta seminal e análise da amostra.....	42
3.2.2.Separação dos espermatozoides e armazenamento	43
3.2.3. Coleta das amostras de sangue e avaliação hormonal.....	44
3.2.4. Isolamento do DNA de espermatozoides e células sanguíneas.....	44
3.2.5. Análise do comprimento dos telômeros e células sanguíneas.....	46
3.3. Análise estatística.....	47
4. RESULTADOS.....	50
4.1.Fluxograma do estudo e caracterização dos grupos.....	51
5. DISCUSSÕES.....	62
6. CONCLUSÕES.....	67
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	69
7. ANEXOS.....	77

Introdução

1. INTRODUÇÃO

1.1. VARICOCELE

A varicocele é definida como uma dilatação anormal das veias do plexo pampiniforme (BAIGORRI&DIXON,2006; ZAAZAA, *et al* 2017;), com presença de refluxo venoso (ZAMPIERI N, *et al* 2008). A frequência desta na população masculina é de 15 à 20% dos indivíduos em idade reprodutiva, e em 40% dos homens inférteis (PASTUSZAK&WANG,2015;ROQUE M, ESTEVES SC,2012 WEIDNER W, PILATZ A, ALTINKILIC B,2010). Dentre os homens com varicocele e que apresentam infertilidade, 30% a 35% apresentam infertilidade primária e 69% a 81% apresentam infertilidade secundária (SANTANA *et al*;2017; GORELICK,JI , GOLDSTEIN M, 1993). Apesar de a varicocele ser observada em cerca de 19 a 41% dos homens que buscam tratamentos reprodutivos (JAROW,2001), nem todos os pacientes com varicocele possuem dificuldades reprodutivas ou apresentam alterações nos parâmetros seminais (KOHN JR *et al*, 2020).

A varicocele pode se apresentar de forma unilateral ou bilateral, sendo a forma mais frequente apenas do lado esquerdo em cerca de 90% dos acometidos pela doença (BAAZEEM *et al.*, 2011). A teoria da origem da varicocele está relacionada à anatomia das veias espermáticas, (JENSEN *et al.*,2017) . A veia espermática direita é drenada diretamente para a veia cava inferior, inserindo de forma oblíqua no local, enquanto que a veia espermática esquerda desemboca na veia renal esquerda em um ângulo reto, sendo de 8 a 10 centímetro maior que a veia espermática direita, o que resulta em uma maior pressão hidrostática do lado esquerdo, transferindo para o plexo pampiniforme, resultado em dilatação(MOHAMMADI *et al.*, 2010; JENSEN *et al.*,2017;MASSON,BRANNINGAN, 2014).

O exame físico, juntamente com o exame ultrassonográfico, é atualmente o método mais indicado para o diagnóstico da varicocele (BAGHERI *et al*;2018). O exame físico é realizado através da palpação da bolsa escrotal, com o paciente em posição ortostática. (METHORST *Cet al*; 2021)

Segundo Dublin&Amelar (1970), a varicocele é classificada em três graus, de acordo com a manifestação e o grau de acometimento, sendo os estágios progressivos de acordo com o acometimento da doença: o grau III apresenta maior grau de acometimento, onde a varicocele é observada à olho nu ao exame físico com o paciente em pé; o grau II, é tido como um grau de acometimento moderado, onde a varicocele é observada através da palpação do escroto; e o grau I, é o grau com menos acometimento, onde são observadas somente em repouso ou através da manobra de Valsalva.

A varicocele na maioria das vezes é assintomática, podendo em alguns casos ocasionar dor e desconforto na região testicular (PUCHE-SANZ *et al.*, 2014.)

O aumento da pressão hidrostática nas veias gonadais, sobrecarregando as válvulas já comprometidas, juntamente com fluxo retrógrado dos metabólitos tóxicos vindo dos rins e adrenais, podem levar à constrição e deficiência crônica nas veias e arteríolas testiculares (SANTANA;2015 ;SHIRAISHI; MATSUYAMA; TAKIHARA, 2012).

A varicocelectomia é tida como o principal meio para tratamento da varicocele, através da correção cirúrgica das veias acometidas (MARMAR J. *et al*, 2007) , sendo que em grande parte dos casos é observada melhora significativa da função espermática nestes pacientes, com a retomada da fertilidade(DHABUWALA CB, HAMID S, MOGHISSI KS, 1992).

1.2.FISIOPATOLOGIA DA VARICOCELE

Os Radicais livres conhecidos também como espécies reativas de oxigênio (ROS) são formados durante etapas do metabolismo celular. Níveis fisiológicos de ROS são de extrema importância para que etapas como a capacitação espermática ocorra durante o processo da fertilização (AGARWAL A, GUPTA S, SHARMA RK; 2005), e estes níveis são balanceados através da presença de substâncias antioxidantes enzimáticas e não enzimáticas, compondo um cenário de homeostase testicular (AGARWAL A, HAMADA A, ROQUE M, ESTEVES SC,2018,ABDELBAKI *et al*,2017; BLUMER *et al*,2011;WRIGHT *et al*,2014).

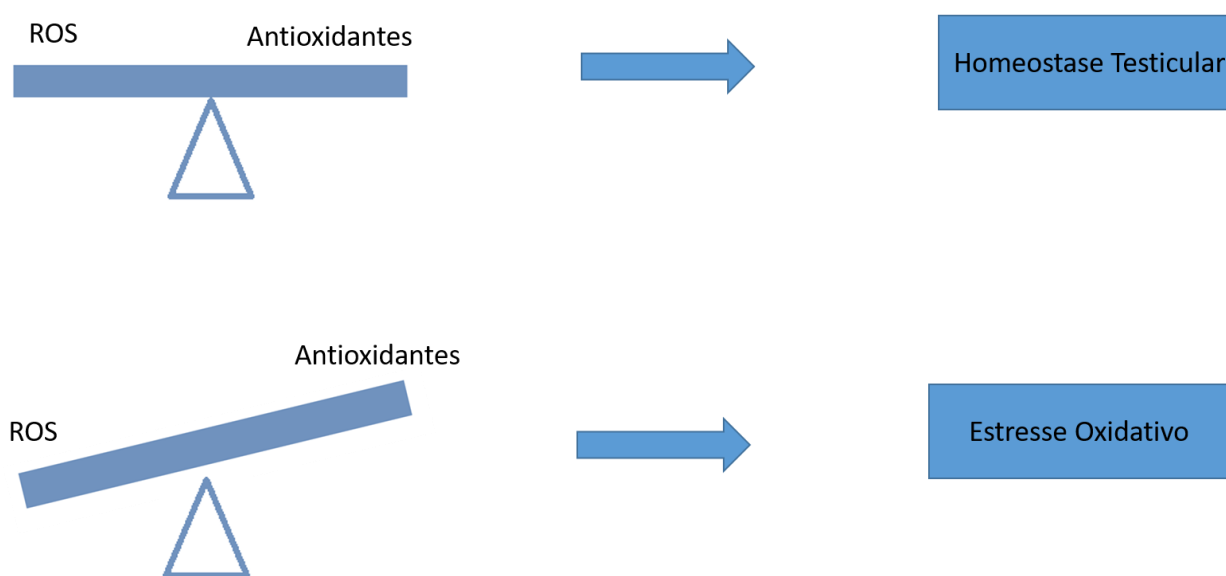


Figura 1: Balanço entre produção de ROS e substâncias antioxidantes no ambiente testicular

A deficiência do funcionamento das válvulas e da microcirculação das veias do plexo pampiniforme observado na varicocele, leva à um desequilíbrio na regulação da temperatura testicular (estresse térmico), ocasionando aumento da produção de espécies

reativas de oxigênio (ROS) e ao desequilíbrio na homeostase testicular, levando à um estresse oxidativo (ROQUE M, ESTEVES SC,2018). O estresse oxidativo é prejudicial para as organelas dos espermatozoides, levando a aumento na peroxidação lipídica e induzindo à fragmentação do DNA espermático (ROQUE M, ESTEVES SC,2018, ABDELBAKI AS *et al* 2017; ZHAO *et al*, 2017). Além disso, esta deficiência na circulação pode levar à isquemia testicular, podendo ocorrer degeneração de células germinativas, atrofia das células de Leydig e fibrose das membranas basais dos túbulos seminíferos (JENSEN *et al.*,2017).

O fluxo retrógrado na varicocele através das veias testiculares, podem trazer metabólitos vindos dos rins e adrenais, levando ao acúmulo de espécies reativas de oxigênio, ocasionando também maior estresse oxidativo (MASSON P, BRANNIGAN RE;2014).

A fisiopatologia da varicocele ainda não está bem esclarecida, sendo que até o momento, não há respostas que explicam todos os efeitos deletérios da doença, e nem todas as suas manifestações clínicas, como os diferentes graus de acometimento que levam à infertilidade.

1.3.VARICOCELE E INFERTILIDADE

A varicocele pode levar ao declínio progressivo na fertilidade masculina, através de fatores que impactam diretamente na espermatogênese, levando à alteração nos parâmetros seminais como a diminuição da concentração dos espermatozoides, alteração da motilidade e morfologia espermática. (ROQUE, ESTEVES,2018;CELTIK,2014;XUEJ *et al*;2012; KADIOGLU TC *et al*;2014). Tais parâmetros são fundamentais e indicativos críticos do potencial de fertilidade no homem, pois são fatores cruciais para o transporte do espermatozoide no muco cervical e para que a fecundação do óvulo ocorra.

Outro fator importante é a alteração nas funções espermáticas, como a fragmentação do DNA, causado pelo estresse oxidativo, impactando negativamente no desenvolvimento embrionário, tanto nos ciclos naturais quanto em tratamentos de fertilização *in vitro*, levando a alterações genéticas nos embriões, diminuindo as taxas de gestações (WOJSIAT J. *et al*2017).

Uma vez que a varicocele pode levar à atrofia testicular, por conta da hipóxia local gerada pela má circulação na região escrotal, os níveis hormonais podem apresentar-se de forma alterada, sendo que as principais funções do testículo é a produção a produção de espermatozoides nos túbulos seminíferos estimuladas pelo hormônio folículo estimulantes (FSH) e a produção de andrógeno (testosterona) produzida pelas células de leydig em resposta ao hormônio luteinizante (LH). (JENSEN *et al*,2017). Desta forma, além da varicocele ter o efeito nos espermatozoides, ela pode também afetar a produção hormonal nos homens com a doença.

Apesar dos estudos mostrarem que a varicocele pode levar à infertilidade, um grande número de homens com a doença são capazes de gerar filhos, sendo assim,a correlação exata entre varicocele e infertilidade é ainda controversa.

1.4.TELÔMEROS

Telômeros são estruturas compostas por cadeias de nucleotídeos repetitivos não codificantes (5'-TTAGGG-3'), associado a proteínas que estão localizados nas extremidades dos cromossomos em eucariotos (ZALENSKAYA *et al*,2000). Os telômeros são estruturas de proteção contra a degradação dos cromossomos, pois impedem o reconhecimento do término da cadeia como quebra da fita dupla, desempenhando um papel importante na regulação da estabilidade genômica (BELL *et al*, 2018; FARR *et al*,1991; O'SULLIVAN *et al*,2010).

Os telômeros de mamíferos são também transcritos em moléculas de RNA constituídos por repetições teloméricas (TERRA, Telomeric repeat-containing RNA).A TERRA é produzida pela ação da RNA polimerase II (RNAPII) a partir de vários loci sub-teloméricos que estão localizados próximos as extremidades dos cromossomas, sendo constituídos por repetições de seqüências UUAGGG, em números variáveis.

A associação TERRA com os telômeros ocorre através da formação de um segmento híbrido RNA-DNA ou da interação de ribonucleoproteínas (WANG *et al*., 2015)

A manutenção dos telômeros é realizada por uma enzima da transcriptase reversa, chamada de telomerase, que é sintetizada nas extremidades dos cromossomos (GRILL *et all*,2019). A manutenção da sua atividade é de extrema importância para que as células continuem a desempenhem suas funções. Quando há falhas nos mecanismos de manutenção, uma parte das extremidades dos cromossomos (região telomérica),é encurtada a cada divisão celular. Durante a mitose, uma parte dos telômeros é perdida e, segundo a hipótese telomérica de senescência, essa perda progressiva atua como relógio biológico para as divisões celulares, desencadeando dessa forma, o fim da divisão

celular levando à morte programada célula (TURNER J, VASU V, GRIFFIN V;2019).

A telomerase em sua forma ativa é composta por duas subunidades; uma localizada na parte central da enzima com atividade de transcriptase reversa – TERT, e a outra subunidade formada pelo RNA –TERC, que representa a seqüência molde para a extensão do DNA telomérico (HUKEZALIE & WONG, 2013; ZVAREZA *et al.*,2010).

Na maioria das células somáticas, o comprimento telomérico apresenta redução progressiva de acordo com a idade, principalmente devido à ineficiência da ação da enzima telomerase e da ação de fatores ambientais como o estresse oxidativo (REIG-VIADER *et al.*,2014). No entanto, em células de rápida proliferação e crescimento celular, tais como as células embrionárias, células tronco, tumores, e células da medula óssea, apresentam alta atividade da telomerase (BLASTO MA, 2007; COLLINS &MITCHELL, 2002).

Em espermatozoides humanos, os telômeros possuem cerca de 10-20 kb, enquanto que nas células somáticas o comprimento é de 5-10 kb (KOZIK *et al.*, 1998). Os telômero presentes nos leucócitos mostram redução progressiva com a idade, ao contrário do comprimento telomérico nos espermatozoides, que parece ter alongamento progressiva com a idade (ASTON *et al.*, 2012). Acredita-se que isso ocorra devido à atividade da telomerase ser reprimida em células somáticas (GOMES *et al.*, 2011), enquanto que, nos testículos e células germinativas, a atividade é bastante robusta (RIOU *et al.*, 2005).

1.4.1 TELÔMEROS E CÉLULAS GERMINATIVAS MASCULINAS

O comprimento telomérico em células germinativas masculina apresenta-se aumentado, e seu aumento é diretamente proporcional ao estágio de diferenciação celular, ou seja, de acordo com que as células germinativas vão se diferenciando do estágio de espermatogônias para espermatozoides, o comprimento telomérico vai aumentando, e a atividade da telomerase vai diminuindo de acordo com esta diferenciação (ACHI *et al*, 2000).

O encurtamento dos telômeros tem sido associado com o aumento da presença da fragmentação de DNA espermático, levando assim à prejuízos na manutenção da integridade genômica, e à aumentos na frequência de aneuploidias cromossômicas nos gametas (OZTURK,2015; LIU *et al*, 2004). O dano no DNA espermático, pode resultar em alterações na configuração dos telômeros, podendo levar à alterações na ativação do espermatozoide no momento da fertilização e no desenvolvimento embrionário, gerando aumento de fragmentação embrionária, diminuição da qualidade dos blastocistos e apoptoses das células (KEEFE *et al*, 2005; MOSCOVTSEV *et al*;2010, LIU *et al*, 2004). Os telômeros dos espermatozoides são o primeiro local no genoma nuclear que respondem aos sinais dos oócitos para a formação de pró-núcleo. Além da fertilização, o comprimento dos telômeros também tem um papel crítico durante a clivagem, pois juntamente com o gameta feminino, determinam a capacidade de replicação na clivagem para o estágio de blastocisto (THILAGAVATHI *et al*, 2013a

RODRIGUEZ-BRENES& PESKIN, 2010, em seu estudo relatou que a perda completa de um dos telômeros resulta em senescência e apoptose na linhagem germinativa masculina. Alterações na homeostase dos telômeros nesta linhagem podem afetar a sinapse dos cromossomos homólogos e a recombinação dos espermatócitos na meiose I, de forma

que o comprometimento dos telômeros pode ser indicativo de um fenótipo estéril (REIG-VIADER *et al*, 2014).

THILAGAVATHI *et al*. 2013b, observaram que o comprimento telomérico de homens inférteis é menor quando comparados à homens férteis, e os telômeros mais curtos parecem ser um dos fatores responsáveis pela infertilidade masculina.

Segundo BALMORI & VARELA (2018), o comprimento telomérico nos espermatozoides aumentam de acordo com a idade, levando à conclusão que a ação da enzima telomerase é maior em células testiculares de homens mais velhos comparados aos jovens. Porém as conseqüências deste aumento no desfecho reprodutivo e nas gerações futuras ainda não foram totalmente elucidadas.

Apesar de não haver muitos estudos que relacionam comprimento telomérico de espermatozoides e qualidade seminal, é de conhecimento que o encurtamento dos telômeros em espermatozoides são maiores em pacientes olizoospermicos, comparados com pacientes normais (FERLIN *et al*, 2013).

ROCCA *et al*, 2016, em seu estudo concluíram que a análise do encurtamento telomérico de espermatozoides, pode ser usado como um marcador de avaliação da espermatogênese, uma vez que o telômero apresenta um papel importante na manutenção da integridade genômica, podendo supor que telômeros encurtados podem prejudicar a espermatogênese, levando à erros de segregação cromossômica e apoptose de células germinativas.

Como o encurtamento telomérico pode gerar envelhecimento espermático acelerado e levar à infertilidade, associado com a fragmentação do DNA, principalmente na presença de dano oxidativo, tal investigação pode representar uma importante ferramenta para a compreensão dos mecanismos envolvidos na varicocele,

além da possibilidade ser um potencial biomarcador de qualidade espermática nesses pacientes.

Justificativa

1.5.JUSTIFICATIVA

A varicocele parece levar a um declínio progressivo da fertilidade, ocasionado por alterações dos parâmetros seminais, principalmente associados ao aumento do estresse oxidativo. A associação de varicocele e infertilidade, mesmo na atualidade, apresenta fisiopatologia ainda não completamente esclarecida. Com isso, tem sido aventada a influência de fatores genéticos associados à varicocele ocasionada pelo ambiente testicular alterado. Como o aumento do estresse oxidativo pode resultar em alteração do comprimento telomérico e ser responsável pela perda da estabilidade genômica, a análise do comprimento telomérico, associado com possíveis alterações seminais e hormonais, não só é necessário para entender a relação desses processos entre si, mas também para investigar as causas do comprometimento seminal em homens com varicocele.

Objetivos

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Investigar o comprimento telomérico espermático e leucocitário em homens com varicocele e no grupo controle.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Analisar a associação entre o comprimento telomérico espermático e leucocitário;

Avaliar a relação do comprimento telomérico, espermático e leucocitário, com os níveis da testosterona total, LH e FSH.

Avaliar a associação do comprimento telomérico, espermático e leucocitário, com a qualidade seminal.

Casuística, Materiais e Métodos

3. CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

3.1. CASUÍSTICA

Trata-se de um estudo prospectivo observacional do tipo caso-controle, sendo o grupo de estudo formado por homens com varicocele, e o grupo controle por homens férteis sem a doença.

O recrutamento foi realizado na Sesma Clínica de Reprodução Humana em Ribeirão Preto e no Ambulatório de Urologia do Hospital Estadual de Ribeirão Preto (HERP), no período de maio de 2018 à dezembro de 2020. As coletas de sêmen e sangue foram realizadas na Clínica Sesma e no laboratório de Andrologia do Centro de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da FMRP-USP. O material coletado foi processado no Laboratório Multiusuário de Biologia Molecular da FMRP-USP, e armazenados em freezer -80°C. Um total de 72 voluntários foram abordados, sendo: 42 pertencentes ao grupo varicocele, sendo eles 04 participantes classificados como varicocele fértil, 11 classificados como varicocele infértil, 27 classificados como fertilidade não comprovada; e 30 pertencentes ao grupo controle. O estudo foi aprovado pelo CEP (Comitê de Ética em Pesquisa) local e também pela CONEP (Comissão Nacional de Ética em Pesquisa), CAAE 44673515.8.0000.5440.

Foram convidados para participar da pesquisa como voluntários homens sem distinção de raça ou classe social, com idade entre 18 e 40 anos. Para o grupo de estudo, foram convidados homens que apresentaram o quadro de varicocele, diagnosticado no exame físico, que apresentavam os diferentes graus da doença e que não tiveram realizado a cirurgia de correção (varicocelectomia). O diagnóstico da varicocele foi feito através do exame físico em repouso e em posição ortostática, e o grau da doença foi classificada de acordo com os critérios de Dubin e Amelar (1970), onde o grau III

foi caracterizada pela presença das varizes à olho nu, o grau II caracterizada por varizes palpáveis mas não visíveis; e o grau I caracterizada por varizes palpáveis apenas com a manobra de Valsalva. No grupo controle foram convidados à participar, homens com fertilidade comprovada, sem varicocele, com presença de pelo menos um filho, sendo o mais novo com idade máxima de dois anos de idade.

Em ambos os grupos, os critérios de exclusão foram: indivíduos com histórico de tabagismo, uso excessivo de álcool, consumo de drogas ilícitas, anomalias genéticas, traumas testiculares, suspeita de infecções urogenitais, câncer, endocrinopatias, ou qualquer tratamento ou condição que possa influenciar na função testicular.

3.2. METODOLOGIA

3.2.1. COLETA SEMINAL E ANÁLISE DA AMOSTRA

3.2.1.1. COLETA SEMINAL

Os pacientes foram orientados a ficar de abstinência ejaculatória por dois dias. A coleta seminal foi feita em um frasco coletor plástico, estéril, apirogênico e de boca larga, mediante masturbação, realizada em uma sala privativa e apropriada.

Após a coleta, a amostra foi processada no laboratório de andrologia, onde foi realizado o espermograma de acordo com o protocolo adotado, seguindo os critérios de análise e valores de referência da Organização Mundial de Saúde, OMS (WHO, 2010).

Pelo fato das análises seminais terem sido realizadas nos anos de 2018, 2019 e 2020, a resolução vigente adotada foi a WHO 2010.

3.2.1.2. ANÁLISE SEMINAL

Após a coleta, o frasco seminal foi colocado sobre placa aquecida à 37°C por trinta minutos, para que ocorresse a liquefação completa da amostra. Toda análise seminal foi realizada em cabine de segurança biológica de classificação AII.

Para a análise macroscópica do sêmen, foi observado o tempo de liquefação, sendo considerado normal um tempo de até sessenta minutos para liquefação. Para a análise da cor, foi inspecionado a cor da amostra durante a pipetagem utilizando pipetas sorológicas translúcidas, sendo considerado como normal a coloração branca opalescente. Para a análise do volume e da viscosidade, foi utilizada pipeta sorológica graduada de 10ml, sendo considerada normal amostras com volume iguais ou superiores a 1,5mL, e viscosidade normal em gotejamento ou formação de filamento menor que 2cm. Para a análise do pH, foi utilizado uma tira de papel indicador de pH, mergulhando uma parte da tira na amostra seminal, e aguardando trinta segundos para a leitura, sendo considerado normal amostra com medições entre 7,2 à 7,8.

A análise microscópica do sêmen foi realizada sob microscópio óptico com contraste de fase. Para a análise da concentração espermática foi utilizada a câmara de Makler, sendo contabilizada a quantidade total de espermatozoides em três fileiras não-consecutivas da câmara, realizando o cálculo da média encontrada da soma das três fileiras, sendo considerada normal amostras com concentrações 15 milhões de espermatozoides por mL. Para a análise da motilidade, foi realizada a contagem de duzentos espermatozoides em campos distintos na câmara de Makler, subdividindo-os de acordo com o deslocamento: progressivo, não progressivos e imóveis, sendo considerada como normal amostras com contagem de pelo menos 32% de motilidade progressiva ou 40 % de motilidade total (motilidade progressiva e não progressiva). A vitalidade foi realizada através da análise da alíquota do sêmen com corante

eosina/nigrosina, em amostras com Motilidade Total (progressiva+não-progressiva) inferior a 42%; amostras foram consideradas normais quando vitalidade $\geq 54\%$.

A morfologia dos espermatozoides foi determinada por meio de um esfregaço de sêmen em lâmina, posteriormente tratada com coloração panótica, e classificada de acordo com os critérios estritos de Kruger, utilizando o retículo para confirmação e auxílio nas medições das estruturas dos espermatozoides. Amostras consideradas normais $\geq 4\%$ formas ovais normais. (KRUGER; MENKVELD; STANDER; LOMBARD *et al*;1986).

3.2.2. SEPARAÇÃO DOS ESPERMATOZIDES E ARMAZENAMENTO

Após a realização do espermograma, foi realizada a separação dos espermatozoides do sêmen a partir da técnica de gradiente de concentração coloidal (ISolate®, Irvine Scientific, USA). Em um tubo de centrífuga foi pipetado de forma cuidadosa, de modo que se formem camadas separadas de 1,0 mL de Isolate 40% , 1,0 mL de Isolate 80%, ambos diluídos à PBS1x. O sêmen liquefeito foi então adicionado por cima da coluna, e o tubo foi submetido à uma centrifugação à 3000G por 30 minutos. As camadas superiores foram removidas e descartadas, restando apenas o sedimento que contém a fração de espermatozoides no fundo do tubo. O sedimento foi ressuspenso em 1,0 mL PBS1x. A amostra final foi colocada em criotubos e armazenada em nitrogênio líquido até que foram realizadas as extrações do DNA.

3.2.3. COLETA DAS AMOSTRAS DE SANGUE E AVALIAÇÃO HORMONAL

Para as avaliações bioquímica e comprimento do telômero, foram coletados uma amostra de sangue periférico utilizando sistema à vácuo (BD-Becton Dickinson, Reino Unido). O soro foi então separado e armazenado em freezer -80° C. As dosagens dos

hormônios LH, FSH foram realizadas pelo método de quimiluminescência através do aparelho Siemens Immulite® 2000 XPi (DiagnosticProducts Corporation Los Angeles, EUA), e a testosterona total foi analisada pelo método de radioimunoensaio através do cintilador Tri-Crab 2100TR (Parkard®InstrumentCompany, IL, USA).

Foi realizada a lise de hemácias no sangue periférico, para separação dos leucócitos, utilizando PBS1x, e armazenados em freezer -80° C até que foram realizadas as extração de DNA.

3.2.4. ISOLAMENTO DO DNA DE ESPERMATOZOIDES E CÉLULAS SANGUÍNEAS.

As moléculas de DNA foram isoladas diretamente de cada amostra de células por meio do *Master Pure™ Complete DNA and RNA Purification Kit* (Epicentre, Illuminacompany, USA), seguindo os protocolos indicados pelo fabricante. Posteriormente, a concentração de cada amostra de DNA obtida através da quantificação por espectrofotômetro *NanoDrop 2000c™* (ThermosScientific), e a integridade foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1,2% corado com *GelRed* (Biotium, EUA). (Figura 2).

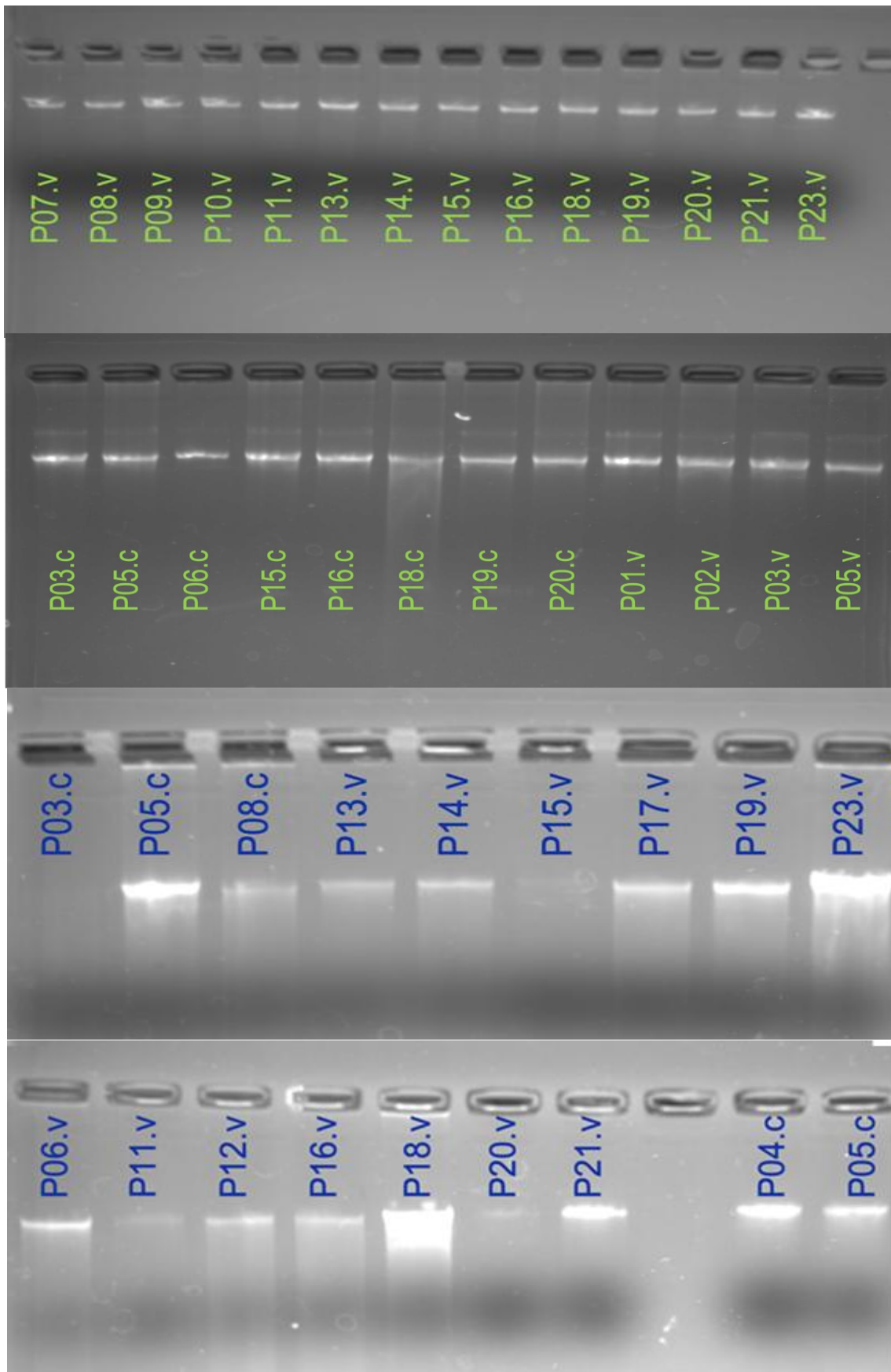


Figura 2: Fragmentos de DNA extraídos de sangue e espermatozoides em pacientes do grupo Varicocele e Controle . Gel de agarose 1,5% com 20ng DNA por poço em 20ng/μL.

3.2.5. ANÁLISE DO COMPRIMENTO DOS TELÔMEROS E CÉLULAS SANGUÍNEAS

O comprimento dos telômeros foi determinado pelo método quantitativo da reação em cadeia da polimerase (qPCR). Este método determinará o comprimento do telômero a partir da abundância de sequências teloméricas (TTAGGG) em comparação à abundância das sequências de um gene único (*single gene*; razão T/S), como descrito anteriormente (CALADO *et al*,2011), utilizando as seguintes sequências de *primers* para o telômero: T-Fw, 5'CGGTTTGTGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTTTGGGTT3' e T-Rv, 5'GGCTTGCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCTTACCCT3'; e para o *geneS*-FW, 5'CAGCAAGTGGGAAGGTGTAATCC3' e S-Rv, 5'CCCATTCTATCATCAACGGGTACAA3'. As amostras foram analisadas em triplicata e cada reação contém 1,6 ng de DNA genômico, 7,2 pg de cada *primer* (exceto para o *primer* reverso do *single gene*, que contém 12 pg) e 16 uL de *Rotor-Gene SYBR Green PCR Master Mix*(Qiagen). O comprimento do telômero de cada amostra foi baseado na razão entre a reação de telômero e do *single gene* (razão T/S) e baseado no cálculo do ΔCt [$Ct(\text{telômero})/Ct(\text{single gene})$]. O comprimento do telômero foi expresso em razão relativa T/S, normalizada para a média da razão T/S da amostra de referência [$2^{-(\Delta Ct_x - \Delta Ct_r)} = 2^{-\Delta \Delta Ct}$], amostra esta também usada como curva padrão, amostra de referência e amostra de validação. A reação dos telômeros foi realizada utilizando 25 ciclos, por 47 minutos, no Rotor-Gene Q em tempo real, com o *Rotor-Gene SYBR Green Kit*, em um volume de reação de 20 μ L. As condições de PCR utilizadas para o ensaio foram: 95° C 5min, 98°C 7s, 60°C 10s (25 ciclos). Os discos de 100 poços foram manipulados utilizando o instrumento de manipulação de líquidos

QI Agility. A reação do *single gene* foi realizada em 35 ciclos, por 61 minutos e as condições de PCR foram: 95°C 5 minutos; 98°C 7 segundos, 58°C 10 segundos, em um total de 35 ciclos.

3.3. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o cálculo amostral, como no início do projeto não existia trabalho publicado sobre o comprimento de telômeros em pacientes com varicocele, foi utilizado então um estudo que comparou o comprimento telomérico em pacientes oligozoospermicos e normozoospermicos (CARIATI *et al*, 2016). O cálculo amostral foi realizado no programa SAS versão 9.3. Considerando uma diferença de 0,5 no comprimento dos telômeros no grupo controle e no grupo oligozoospermicos, com desvios padrão de 0,73 e de 0,43, com um poder de 80% e um nível de significância de 5%.

Foi realizada uma análise exploratória dos dados através da medida de posição central (média e mediana) e dispersão (desvio padrão, intervalo interquartil, valores mínimo e máximo). As variáveis qualitativas foram descritas através de frequência absolutas e relativas.

O teste t de Student foi aplicado para verificar se existe uma diferença estatística das variáveis quantitativas em relação aos grupos. As análises foram implementadas no programa SAS versão 9.4 (SAS InstituteUnc., University of North Carolina, NC, USA), em que foi considerado um nível de significância de 5%.

Para verificar se existe correlação entre as variáveis pesquisadas, foi utilizado o coeficiente de Pearson. Este coeficiente tem uma variação de -1 à 1, sendo que valores próximos à 0,2 apresenta uma correlação fraca, valores próximos à 0,5 apresenta uma correlação moderada, e valores próximos à 0,8 apresenta uma correlação forte.

Devida a subdivisão dos participantes do grupo varicocele em fértil, infértil e fertilidade não comprovada, não ter uma distribuição uniforme. Não foram realizados estudos considerando tais subgrupos.

Resultados

4. RESULTADOS

4.1. Fluxograma do estudo e caracterização dos grupos.

Um total de 72 pacientes foram convidados e abordados para participar da pesquisa. Destes, 27 não preencheram os critérios de inclusão estabelecidos no estudo, ou não aceitaram a participar do estudo. Em um total de 45 pacientes participantes, 12 foram excluídos por apresentarem fator masculino grave (amostra insuficiente). Foram consideradas elegíveis um total de 34 pacientes no total, sendo estes 15 pertencentes ao grupo varicocele e 19 pacientes pertencentes ao grupo controle. No grupo com varicocele, sete apresentaram varicocele grau 3 (47%), cinco apresentaram grau 2 (33%), três apresentaram grau 1 (20%). Em um total de 15 pacientes do grupo varicocele e 19 do grupo controle, 06 foram excluídos no grupo varicocele e 01 excluído no grupo controle por apresentarem DNA fragmentado no gel de agarose, sendo estes inelegíveis para análise do telômero. Dos 09 participantes do grupo varicocele, 1 foi classificado como varicocele fértil, 2 classificados como varicocele infértil, 06 classificados como fertilidade não comprovada. (Figura 3).

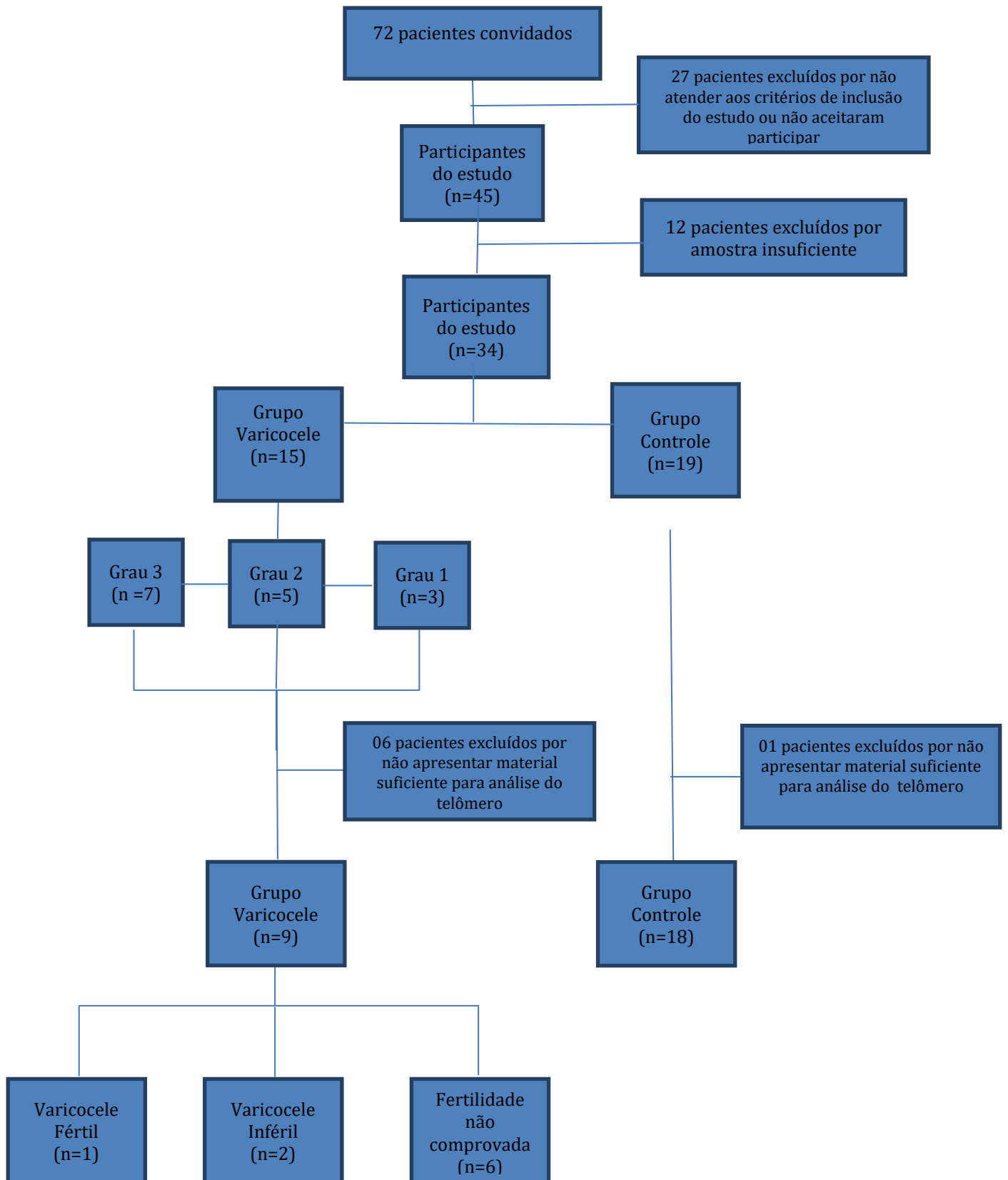


Figura 3: Fluxograma dos participantes do estudo

A concentração de espermatozoides, a motilidade (progressiva, não progressiva e imóveis) e a morfologia estrita de Kruger mostraram uma tendência à um valor menor em homens com varicocele comparados aos valores encontrados no grupo controle, ($p=0,0028$, $p=0,0071$, $p=0,0081$, $p=0,0021$, $p=0,002$, respectivamente), mesmo os resultados estando dentro dos valores de referência de normalidade. Tabela 1.

Os resultados encontrados com a subdivisão do grupo de homens com varicocele de acordo com o grau da doença estão descritos na Tabela 2. A concentração de espermatozoides nos três subgrupos com varicocele se mostrou diferente do grupo controle (GC x GV1: $p=0,0106$, GC x GV2: $p=0,0255$, GC x GV3: $p=0,0002$). Em relação à motilidade progressiva, não progressiva e imóveis, não houve diferença estatística entre os grupos comparados com o grupo controle; já na morfologia estrita de Kruger, foi observado diferença estatística entre os grupos 2 e 3 da varicocele, ($p=0,0122$, e $p=0,0040$ respectivamente).

Tabela 1:Análise seminal dos grupos varicocele e controle.

Variáveis	Grupo	N amostral	Média	Desvio Padrão	P-valor
Concentração (x10 ⁶ /mL)	controle	18	68,2	33,98	0,0028
	varicocele	09	34,47	37,91	
Motilidade Progressiva (%)	controle	18	69,3	17,1	0,0071
	varicocele	09	53,04	21,48	
Motilidade Não Progressiva (%)	controle	18	24,63	9,58	0,0081
	varicocele	09	18,4	10,1	
Imóveis (%)	controle	18	12,7	10,03	0,0021
	varicocele	09	28,56	21,13	
Morfologia. de Kruger (%)	controle	18	5,4	1,60	0,0002
	varicocele	09	2,92	2,45	

P-valor referente ao teste t de Student ($p < 0,05$).

Tabela 2: Análise seminal de homens do grupo varicocele, de acordo com o grau da doença, comparado ao grupo controle.

Variáveis	Grupo	N amostral	Média	Desvio Padrão	p- valor (GC x GV)
Concentração (x10 ⁶ /mL)	GC	09	68,2	33,48	X
	GV1	03	38,9	33,3	0,0106
	GV2	02	49,59	43,85	0,0255
	GV3	04	5,63	8,67	0,0002
Motilidade Progressiva (%)	GC	09	69,3	17,1	X
	GV1	03	48,88	17,91	0,2221
	GV2	02	58,2	12,75	0,5211
	GV3	04	49,29	33,95	0,6123
Motilidade Não Progressiva (%)	GC	09	17,7	9,58	X
	GV1	03	21,75	5,87	0,4188
	GV2	02	19,5	4,84	0,0722
	GV3	04	22,2	11,99	0,7456
Imóveis (%)	GC	09	12,7	10,03	X
	GV1	03	28,38	18,28	0,5236
	GV2	02	22,2	11,99	0,1522
	GV3	04	37,86	31,82	0,0418
Morfologia. de Kruger (%)	GC	09	5,4	1,6	X
	GV1	03	2,86	2,79	0,8022
	GV2	02	4,1	2,51	0,0122
	GV3	04	1,29	0,49	0,0040

DP: Desvio Padrão; G1: grupo varicocele grau 1, G2: grupo varicocele grau 2, G3: grupo varicocele grau 3, PR: motilidade progressiva, NP: motilidade não progressiva, IM: imóveis. Grupos comparados utilizando o teste ANOVA, e pós-teste de Tukey (p<0,05).

Os valores hormonais dos participantes, como dosagens dos hormônios Luteinizante (LH), Folículo Estimulante (FSH) e Testosterona total (TT), estão apresentados na Tabela 3. Ao comparar os resultados entre os grupos controle e varicocele observamos respectivamente: LH ($3,15 \pm 2,38$ vs $5,73 \pm 3,80$; $p=0,0160$), FSH ($5,44 \pm 2,99$ vs $10,71 \pm 3,96$, $p=0,1140$), TT ($420,0 \pm 211,0$ vs $513,0 \pm 308,0$; $p=0,2641$).

O LH e FSH apresentaram valores mais elevados no grupo varicocele mesmo estando dentro dos valores de normalidade em ambos os grupos, apresentando diferença estatística apenas na dosagem de LH; já os valores da testosterona total foram menores no grupo varicocele, estando também dentro dos parâmetros de normalidade.

Tabela 3: Níveis hormonais dos homens do grupo varicocele e controle.

Variável	Grupo	N	Média	DP	p-valor
LH	Controle	18	3.15	2,38	0,0160
	Varicocele	09	5.73	3,80	
FSH	Controle	18	5.44	2.99	0,1140
	Varicocele	09	10,71	3,96	
Testosterona	Controle	18	420,0	211,0	0,2641
Total (TT)	Varicocele	09	513,0	308,0	

LH: hormônio luteinizante, FSH: hormônio folículo estimulante, TT: Testosterona Total, DP: desvio padrão
P-valor referente ao teste t de Student. ($p < 0,05$)

Para a análise do comprimento do telômero o número de casos nos dois grupos foi reduzido devido ao material insuficiente para esta análise metodológica, seja por quantidade reduzida de espermatozoide ou leucócitos nas amostras, ou devido a perda de material durante a realização da extração de DNA. O comprimento do telômero dos leucócitos e nos espermatozoides foram analisados em 9 homens com varicocele e em 18 homens controle. O comprimento telomérico tanto nos leucócitos como nos espermatozoides não tiveram diferença significativa entre o grupo varicocele e controle (TL: $1.52 \pm 0,58$ vs $1.20 \pm 0,38$, $p=0.1001$, TE: $2.52 \pm 0,98$ vs 3.43 ± 1.57 , $p=0,1408$). Os dados do tamanho telomérico estão expressos na Tabela 4 e Figura 4.

Tabela 4: Comprimento do telômero nos leucócitos e nos espermatozoides dos homens com varicocele e controle.

Variável	Grupo	N	Média	DP	p-valor
Telômero leucócitos (TL)	Controle	18	1.52	0,95	0.1001
	Varicocele	9	1.20	0,38	
Telômero espermatozoide (TE)	Controle	18	2.49	0,95	0,1276
	Varicocele	9	3.42	1.56	

.P-valor referente ao teste t de Student.($p < 0,05$)

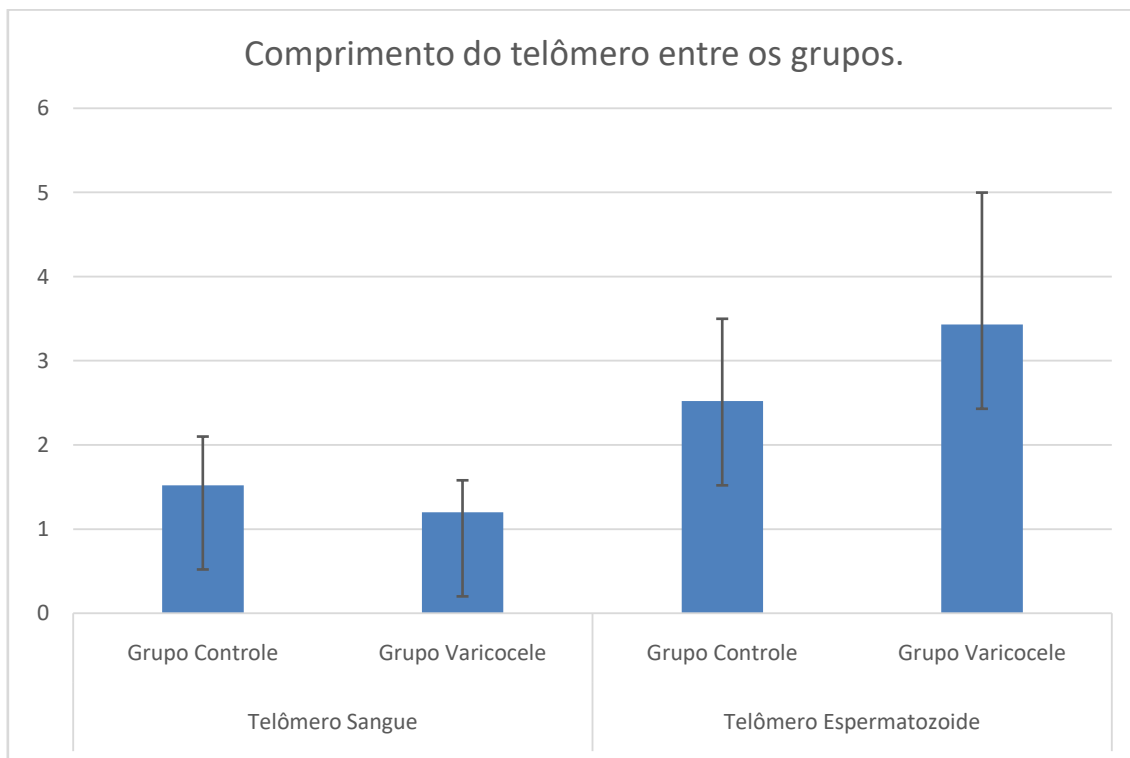


Figura 4: Comprimento do telômero entre os grupos.

Após aplicar o teste de Pearson, para observar se há correlação entre o comprimento telomérico nos espermatozoides e as variáveis entre os grupos em estudo, vimos que há uma correlação correção positiva fraca com a concentração espermática, motilidade progressiva e morfologia estrita de Kruger no grupo controle (CE: $r=0.15551$, $p=0.5378$; Mot Prog: $r =0.02582$, $p=0.9190$, Morf de Kruger: $r=0.06797$, $p=0.7887$) e uma correlação negativa moderada destes parâmetros com o grupo varicocele (CE: $r= -0.53539$, $p= 0.1374$; Mot Prog: $r = -0.49377$, $p=0.1767$; Morfde. Kruger: $r= -0.23739$, $p= 0.5385$), mesmo não apresentando diferença estatística. Tabela 5.

Ao observar se há correlação entre o comprimento telomérico nos espermatozoides e perfil hormonal nos grupos, vimos que há uma correção negativa

fraca, com a dosagem do hormônio luteinizante (LH) e folículo estimulante (FSH) no grupo controle (LH: $r = -0.10955$, $p = 0.6652$; FSH: $r = -0.07393$, $p = 0.7706$,) e uma correlação positiva fraca destes hormônios no grupo varicocele (LH: $r = 0.25999$, $p = 0.4993$, FSH: $r = 0.04329$, $p = 0.9119$). Em relação à testosterona Total, vimos uma correlação negativa fraca tanto no grupo controle quanto no grupo varicocele ($r = -0.15315$, $p = 0.5440$, $r = -0.30377$, $p = 0.4268$, respectivamente), mesmo não apresentando diferença estatística. Tabela 6.

Tabela 5: Análise da correlação do comprimento telomérico nos espermatozoides com as variáveis espermáticas:

Variável	Grupo	<i>r</i>	p-valor
Concentração espermática	Controle	0.15551	0.5378
	Varicocele	-0.53539	0.1374
Motilidade Progressiva	Controle	0.02582	0.9190
	Varicocele	-0.49377	0.1767
Morfologia de Kruger	Controle	0.06797	0.7887
	Varicocele	-0.23739	0.5385

Grupos comparados utilizando o teste de Pearson. ($p < 0,05$)

Tabela 6: Análise da correlação do comprimento telomérico nos espermatozoides com as variáveis hormonais:

Variável	Grupo	<i>r</i>	p-valor
LH	Controle	-0.10955	0.6652
	Varicocele	0.25999	0.4993
FSH	Controle	-0.07393	0.7706
	Varicocele	0.04329	0.9119
Testosterona Total	Controle	-0.17322	0.6141
	Varicocele	-0.47161	0.5379

Grupos comparados utilizando o teste de Pearson. ($p < 0,05$)

Após aplicar o teste de Pearson, para observar se há uma correlação entre o comprimento telomérico no sangue e as variáveis em estudo, vimos que há uma correlação positiva fraca com a concentração espermática tanto no grupo controle quanto no grupo varicocele (GC: $r = 0.23063$, $p = 0.3572$ e GV: $r = 0.11516$, $p = 0.7680$, respectivamente). Em relação à motilidade progressiva, vimos que há uma correlação positiva fraca com o grupo controle ($r = 0.22341$, $p = 0.3729$) e uma correlação negativa fraca com o grupo varicocele ($r = -0.17125$, $p = 0.6595$). Ao analisar se há correlação com a morfologia de Kruger, vimos que há uma correlação negativa fraca com o grupo controle ($r = -0.28457$, $p = 0.2524$) e uma correlação positiva fraca com o grupo varicocele ($r = 0.45150$, $p = 0.2225$). Tabela 7

Ao observar se há correlação entre o comprimento telomérico no sangue e perfil hormonal nos grupos, vimos que há uma correlação negativa fraca com a dosagem do hormônio luteinizante (LH) tanto no grupo controle quanto no grupo varicocele (GC: $r = -0.29282$, $p = 0.2383$ e GV: $r = -0.35345$, $p = 0.3508$, respectivamente). Em relação

ao hormônio folículo estimulante (FSH), vimos que há também uma correlação negativa fraca em ambos os grupos (GC: $r=-0.20618$, $p=0.4117$ e GV: $r=-0.19264$, $p=0.6195$,respectivamente). Em relação à testosterona livre, vimos também uma correlação negativa fraca em ambos os grupos (GC: $r=-0.33173$, $p=0.1787$ e GV: $r=-0.07410$, $p=0.8497$, respectivamente). Tabela 8

Tabela 7:Correlação do comprimento telomérico no sangue com as variáveis em estudo.

Variável	grupo	r	p-valor
Concentração espermática	Controle	0.23063	0.3572
	Varicocele	0.11516	0.7680
Motilidade Progressiva	Controle	0.22341	0.3729
	Varicocele	-0.17125	0.6595
Morfologia de Kruger	Controle	-0.28457	0.2524
	Varicocele	0.45150	0.2225

Grupos comparados utilizando o teste de Pearson. ($p<0,05$)

Tabela 8: Análise da correlação do comprimento telomérico no sangue com as variáveis hormonais:

Variável	grupo	R	p-valor
LH	Controle	-0.29282	0.2383
	Varicocele	-0.35345	0.3508
FSH	Controle	-0.20618	0.4117
	Varicocele	-0.19264	0.6195
Testosterona Livre	Controle	-0.33173	0.1787
	Varicocele	-0.07410	0.8497

Grupos comparados utilizando o teste de Pearson. ($p<0,05$)

Discussões

5. DISCUSSÕES

No presente estudo, foi observado que o perfil seminal dos homens com varicocele mostrou ter um valor inferior comparado com os valores encontrados nos indivíduos férteis (grupo controle), apesar dos valores em ambos os grupos apresentarem dentro dos parâmetros de normalidade. Segundo a literatura, pacientes com varicocele apresentam na maioria das vezes, perfis seminais inferiores ao de pacientes sem a doença. Portanto, estes achados vão de encontro com a literatura (KAVOUSSI et al 2021; PALLOTTI et al 2017; CHEN&CHEN;2011). A baixa qualidade seminal em pacientes com varicocele, está relacionado ao ambiente desfavorável ocasionado pela doença, principalmente por conta do aumento de estresse oxidativo, sendo deletério para o processo da espermatogênese (PARK *et al.*, 2018).

Os parâmetros seminais são extremamente importantes para o processo de fecundação do óvulo, uma vez que precisam apresentar concentração, motilidade e morfologia suficientes para sua locomoção através das trompas, onde ocorre a fecundação do óvulo (HASSANIN *et al.*, 2018).

Foi observado que os pacientes comprometidos com o grau III da varicocele apresentaram perfil seminal inferior, comparados com os outros grupos da doença, justificando a hipótese que quanto maior o grau de comprometimento da doença, maior o estresse oxidativo, e pior qualidade seminal. (SCHAUER & Al-ALI, 2017; OLIVA A & MULTIGNER L, 2018).

A varicocele é uma doença que afeta o sistema reprodutor masculino tanto na função espermática quanto e nos parâmetros seminais. O estresse térmico ocasionado pela doença está associado a níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio prejudicando a espermatogênese e gerando danos ao DNA e na cromatina espermática.

(ROQUE M, ESTEVES SC,2018 ABDELBAKI AS *et al* 2017; ZHAO *et al*, 2017). No entanto, o efeito exato da varicocele sobre a fertilidade e a má qualidade seminal associada à doença ainda são controversos, e acredita-se que fatores genéticos e/ou epigenéticos podem ter um papel importante na etiologia da doença (SANTANA *etal*, 2017).

Em relação aos hormônios dosados, foi observado um aumento do LH no grupo varicocele comparado ao grupo controle, (5.73 ± 3.80 x 3.15 ± 2.38 , $p=0,0160$). Apesar dos hormônios FSH e a Testosterona livre não apresentarem diferença nos resultados, estes achados já nos mostra que há indícios de comprometimento testicular pela doença. No processo da espermatogênese, os hormônios gonadotróficos (LH e FSH) são imprescindíveis, e qualquer alteração nos níveis destes hormônios, podem impactar na produção dos espermatozoides.

Tem sido sugerido que a varicocele apresenta efeito deletério nas células de Leyding dos testículos, podendo ocasionar conseqüentemente uma diminuição da produção de testosterona (LUO *et al*;2011). Porém, há estudos controversos na literatura, dizendo que nem sempre os hormônios gonadotrófico apresentam-se alterados na presença da varicocele, umas vez que existem diferentes graus de acometimento da doença, nem sempre havendo comprometimento celular suficiente para alterar estes hormônios (MAJZOUB A,*et al*; 2019).

O comprimento telomérico nos espermatozoides e no sangue não se diferenciaram entre os grupos controle e varicocele, não havendo diferença estatística, o que vai em contradição com outros estudos na literatura (LARA- CERRILLO *el al*, 2020;TAHAMTAN S *et al*,2019), uma vez que o estresse térmico causado pela doença, está associado ao aumento dos níveis de espécies reativas de oxigênio, e com isso gera o estresse oxidativo, podendo induzir à uma redução do tamanho do telômero.

Estes resultados vão em contradição com o estudo de TAHAMTAN *et al* (2019), onde foi comparado o comprimento telomérico em espermatozoides e leucócitos de homens com e sem varicocele, observando que homens que tem a doença, apresentam encurtamento dos telômeros, tanto no sêmen quanto nos leucócitos, comparado com homens sem a doença, justificado pelo aumento do estresse oxidativo, por conta do aumento da temperatura testicular e desequilíbrio da homeostase testicular.

Acreditamos que o reduzido número de casos analisados, possa ser uma limitação do estudo. Nem todas as amostras coletadas foram suficientes para a análise telomérica, uma vez que foram excluídas da pesquisa as amostras comprometidas pela baixa concentração seminal, e mesmo assim, as amostras com perfil “borderline” ao serem processadas para a separação dos espermatozoides, tiveram as suas concentrações prejudicadas, sendo excluídas do N amostral.

Através dos testes de correlação de Pearson, vimos que há uma correlação positiva entre o comprimento telomérico nos espermatozoides com todos os parâmetros seminais (concentração espermática, motilidade progressiva, morfologia estrita de Kruger) no grupo controle, e uma correlação negativa destes parâmetros com o grupo varicocele. Estes resultados vão de encontro com o que esperamos na literatura, uma vez que o grupo controle, composto apenas por pacientes férteis, tendem a apresentar um perfil seminal normal, apresentando uma melhor concentração espermática, melhor motilidade progressiva e maior número de espermatozoides morfologicamente normais, e assim, apresentando também um maior comprimento telomérico nos espermatozoides. Segundo TAHAMTAN *et al* (2019), o aumento do comprimento telomérico nos espermatozoides tem um papel importante na manutenção da integridade genômica, evitando assim degradações no DNA celular e apoptose.

Os níveis hormonais de LH, FSH e testosterona livre em pacientes com varicocele podem variar, por conta dos diferentes graus de acometimento da doença, o que pode justificar os achados neste estudo. O aumento do LH nestes pacientes com varicocele, mesmo em pequenas proporções, já nos mostram princípios de hipogonadismo.

Através do teste de correlação de Pearson, observamos uma correlação negativa entre comprimento telomérico nos espermatozoides e dosagens de LH e FSH. Níveis elevados destes hormônios podem ser indicativo de alteração na espermatogênese, levando à um aumento do estresse oxidativo local, e inferindo uma possível redução do comprimento telomérico.

Em relação ao comprimento telomérico no sangue e a dosagem dos hormônios LH, FSH e testosterona livre, vimos que há uma correlação negativa entre o comprimento telomérico no sangue e a dosagem destes três hormônios, tanto no grupo controle quanto no grupo varicocele. Não foi encontrado na literatura uma associação entre comprimento telomérico no sangue e estes hormônios gonadotróficos em homens com e sem a doença.

Conclusões

6- Conclusões:

Homens com varicocele apresentam uma diminuição da qualidade seminal, evidenciadas pela diminuição dos parâmetros seminais, como: diminuição da concentração espermática, diminuição da motilidade progressivos e diminuição da quantidade de espermatozoides morfologicamente normais.

Não foi encontrado diferença hormonal significativa nos grupos varicocele e controle, mas a pouca diferença encontrada já nos mostra que há indício de comprometimento testicular. Devido aos diferentes graus de acometimento da doença, as dosagens hormonais podem apresentar resultados distintos.

O comprimento telomérico tanto no sangue quanto nos espermatozoides não se diferenciaram entre os grupos controle e varicocele. Um N maior é necessário para que possamos validar o estudo.

Referências Bibliográficas

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELBAKI SA, SABRI JH, AK-ADL AM, SABRE HH..The impact of coexisting sperm DNA fragmentation and oxidative stress on the outcome of varicocelectomy in infertile patients: A prospective controlled study. **Arab J Uro.**2017;15(2):131-139.

ACHI MV, RAVINDRANATH N, DYN M. Telomere length in male germ cells is inversely correlated with telomerase activity. **Biol Reprod.**2000;63:591-598.

ASTON KI, HUNT SC, SUSSER E, KIMURA M, FACTOR-LITVAK P, CARRELL D, et al. Divergence of sperm and leukocyte age-dependent telomere dynamics: implications for male-driven evolution of telomere length in humans. **Mol Hum Reprod.** 2012;18(11):517-22.

AGARWAL, A.; HAMADA, A.; ESTEVES, S. C. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 1. **Nat Rev Urol**, 9, n. 12, p. 678-690, Dec 2012.

AGARWAL A, GUPTA S, SHARMA RK. Role of oxidative stress in female reproduction. **Reprod Biol Endocrinol.** 2005 Jul 14;3:28.

BAGHERI SM, KHAJEHASANI F, IRAJI H, FATEMI I. A Novel Method for Investigating the Role of Reflux Pattern in Color Doppler Ultrasound for Grading of Varicocele. **Sci Rep.** 2018 Apr 25;8(1):6517.

BAAZEEM A, BELZILE E, CIAMPI A, DOHLE G, JARVI K, SALONIA A, WEIDNER W, ZINI A. Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. **Eur Urol.** 2011 Oct;60(4):796-808

BAIGORRI BF & DIXON RG.. Varicocele: a review. **Semin Interent Radiol.**2006;33:170-176.

BALMORI C, VARELA E. Should we consider telomere length and telomerase activity in male factor infertility?. **Curr Opin Obstet Gynecol.**2018;Jun;30(3):197-202.

BELL WR, MEEKER AK, RIZZO A, RAIPARA S, ROSENTHAL IM, FLOVERBELBER M, APARICIO DOMINGO S, ZHONG X, BABER JR, JOSHU CE. A unique telomere DNA expansion phenotype in human retinol rod photoreceptors associated with aging and disease. **Brain Pathol.** 2019;29(1):45-52.

Blasco MA. Telomere length, stem cells and aging. **Nat Chem Biol.** 2007 Oct;3(10):640-9.

BLUMER CG, RESTELLO AE, GIUDUCE PT, SOLER TB, FRAIETTA R, NICHI M, BERTOLLA RP, CEDENHO AP. Effect of varicocele on sperm function and semen oxidative stress. **Bju Int.** 2011;109(2):259-65.

CALADO RT, BRUDNO J, MEHTA P, KOVACS JJ, WU C, ZAGO MA. Constitutional telomerase mutations are genetic risk factors for cirrhosis. **Hepatology** 2011;53:1600-7.

CARIATI F, JAROUDI S, ALFARAWATU S, RABERI A, ALVIGGI C, PIVONELLO R, WELLS D. Investigation of sperm telomere length as a potential marker of paternal genome integrity and semen quality. **Reprod Biomed Online.** 2016;33(3):404-11.

CHEN, S. S.; CHEN, L. K. Risk factors for progressive deterioration of semen quality in patients with varicocele. **Urology**, v. 79, n. 1, p. 128-32, Jan 2012.

COLLINS, K and MITCHELL, JR. Telomerase in the human organism. **Oncogene.** 2002;21(4):564-579.

DHABUWALA CB, HAMID S, MOGHISSI KS. Clinical versus subclinical varicocele: improvement in fertility after varicocelectomy. **Fertil Steril.** 1992 Apr;57(4):854-7.

DUBLIN L, AMELAR RD. Varicocele size and results of varicocelectomy in selected subfertile men with varicocele. **Fertil Steril.** 1970;21(8):606-9.

FARR C, FANTES J, GOODFELLOE P, COOKE H. Functional reintroduction of human telomeres into mammalian cells. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 1991;88(16):7006-10.

FERLIN A, RAMPAZZO E, ROCCA MS, KEPPEL S, FRIGO AC, DE ROCI A, FORSTA C. In Young men sperm telomere length is related to sperm number and paternal age. **Hum Reprd.**2013;28(12):3370-6.

GRILL S, BISHT K, TESMER V, SHAMI A, HAMMOUD S, NANDAKUMAE J. Two separation-of-function isoforms of human TTP1 dictate telomerase regulation in somatic and germ cells.**Cell Report.**2019;27,3511-3521.

GORELICK, J. I.; GOLDSTEIN, M. Lossofertility in menwith varicocele. **FertilSteril**, v. 59, n. 3, p. 613-6, Mar 1993.

HASSANIN, A. M.; AHMED, H. H.; KADDAH, A. N. A global viewofthepathophysiologyof varicocele. **Andrology**, Jul 2018.

HUKEZALIE KR, WONG JM. Structure-functionrelationshipandbiogenesisregulationofthehumantelomeraseholoenzyme. **FEBS J.** 2013 Jul;280(14):3194-204.

JAROW, J. P. Effects of varicocele on male fertility. **Hum Reprod Update**, 7, n. 1, p.59-64, 2001 Jan-Feb 2001.

KEEFE DL, GRANCO S, LIU L, TRIMARCHI J, CAO B WEITZEN S, AGARWAL S, BLASCO MA. (2005) Telomere length predicts embryo fragmentation after in vitro fertilization in women–toward a telomere theory of reproductive aging in women. **Am J ObstetGynecol**192:1256–1260; discussion 1260-1251.

KOHN JR, HANEY NM, NICHOLS PE, RODRIGUEZ KM, KOHN TP. Varicocele Repair Prior toAssistedReproductive Technology: PatientSelectionandSpecialConsiderations. **Res Rep Urol.** 2020 Apr28;12:149-156.

KADIOGLU, T. C.; ALIYEV, E.; CELTIK, M. Microscopicvaricocelectomysignificantlydecreasesthesperm DNA fragmentation index in patientswithinfertility. **Biomed Res Int**, v.2014, p. 695713, 2014.

KAVOUSSI PK, ABDULLAH N, GILKEY MS, HUNN C, MACHEN GL, CHEN SH, KAVOUSSI KM, ESQUEDA A, WININGER JD, KAVOUSSI SK. The impact of ipsilateral testicular atrophy on semen quality and sperm DNA fragmentation response to varicocele repair. **Asian J Androl.** 2021 Mar-Apr;23(2):146-149.

Kozik A, Bradbury EM, Zalensky A. Increased telomere size in sperm cells of mammals with long terminal (TTAGGG)_n arrays. **Mol Reprod Dev.** 1998 Sep;51(1):98-104.

KRUGER T, MENKVELD R, SANDER F, LOMBARD C, VAN DER MERWE. Sperm Morphologic feature as a prognostic factor in vitro fertilization. **Fertility and Sterility.** 1986;46:1118-1123.

LARA-CERRILLO S, GUAL-FRAU J, BENET J, ABAD C, PRATS J, AMENGUAL MJ, RIBAS-MAYNOU J, GARCÍA-PEIRÓ A. Microsurgical varicocelectomy effects on sperm telomere length, DNA fragmentation and seminal parameters. **Hum Fertil (Camb).** 2022 Feb;25(1):135-141.

LIU L, FRANCO S, SPYROPOULOS B, MOENS PB, BLASCO MA, KEEFE DL. Irregular telomeres impair meiotic synapsis and recombination in mice. **Proc Natl Acad Sci USA** 2004;101:6496-501.

LUO P, FENG X, DENG R, WANG F, ZHANG Y, LI X, ZHANG M, WAN Z, XIANG AP, XIA K, GAO Y, DENG C. An autofluorescence-based isolation of Leydig cells for testosterone deficiency treatment. **Mol Cell Endocrinol.** 2021 Sep 15;535:111389.

MAJZOUB A et al, 2019. Scrotal Hyperthermia, Hormonal Disturbances, Testicular Hypoperfusion, and Backflow of Toxic Metabolites in Varicocele. In: ESTEVES et al., *Varicocele and Male Infertility*, Springer **Nature Switzerland.** 2019

MOHAMMADI A, GHASEMI-RAD M, MLADKOVA N, MASUDI S. Varicocele and nutcracker syndrome: sonographic findings. **J Ultrasound Med.** 2010 Aug;29(8):1153-60

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. **FertilSteril**. 2007 Sep;88(3):639-48.

MASSON P, BRANNIGAN RE. The varicocele. **UrolClin North Am**. 2014 Feb;41(1):129-44.

METHORST C, AKAKPO W, GRAZIANA JP, FERRETTI L, YIOU R, MOREL-JOURNAL N, TERRIER JE, BELEY S, CARNICELLI D, HUPERTAN V, MADEC FX, FAIX A, MARCELLI F, HUYGHE E. Recommandations du Comité d'Andrologie et de Médecine Sexuelle de l'AFU concernant la prise en charge de la Varicocèle [Recommendations of the Committee of Andrology and Sexual Medicine of the AFU concerning the management of Varicocele]. **Prog Urol**. 2021 Mar;31(3):119-130.

MOSKOVITSEV SI, WILLIS J, WHITE J, MULLEN JB. Disruption of telomere-telomere interactions associated with DNA damage in human spermatozoa. **Syst Biol Reprod Med** 56:407–412, 2010

O'SULLIVAN RJ, KARLSEDER J. Telomeres: protecting chromosomes against genome instability. **Nat Rev Mol Cell Biol**. 2010;11(3):171-81

OZTURK S. Telomerase activity and telomere length in male germ cells. **Biol Reprod**. 2015;92(2):doi:10.1095/biolreprod.114.124008. Epub 2015 Jan 7

OLIVA A, MULTIGNER L. Chronic epididymitis and Grade III varicocele and their associations with semen characteristics in men consulting for couple infertility. **Asian J Androl**. 2018 Jul-Aug;20(4):360-365.

PARK YS, LEE SH, CHOI HW, LEE HS, LEE JS, SEO JT. Abnormal Human Sperm Parameters Contribute to Sperm DNA Fragmentation in Men with Varicocele. **World J Mens Health**. 2018 Sep;36(3):239-247

PALLOTTI F, PAOLI D, CARLINI T, VESTRI AR, MARTINO G, LENZI A, LOMBARDO F. Varicocele and semen quality: a retrospective case-control study of 4230 patients from a single centre. **J Endocrinol Invest**. 2018 Feb;41(2):185-192.

PASTUSZAK AW, WANG R. Varicocele and testicular function. **Asian J Androl.**2015;17:659-67.

PUCHE-SANZ I, FLORES-MARTÍN JF, VÁZQUEZ-ALONSO F, PARDO-MORENO PL, CÓZAR-OLMO JM. Primary treatment of painful varicocele through percutaneous retrograde embolization with fibred coils. **Andrology.** 2014 Sep;2(5):716-20.

REIG-VIADER R, CAIPLLA L, VILLA CAJUDO M, GARCIA M, GARCIA F, ANGUITA B, GARCIA-CALDÉS M, RUIZ- HERRERA A. Telomere homeostase is compromised in spermatocytes from patients with idiopathic infertility. **Fertil Steril.**2014;102(3):728-738.

RIOU L, BASTOS H, LASSALLE B, COUREUIL M, TESTART J, BOUSSIN FD, ALLEMAND I, FOUCHET P. The telomerase activity of adult mouse testis resides in the spermatogonial alpha6-integrin-positive side population enriched in germinal stem cells. **Endocrinology**2005;146:3926–3932.

ROCCA MS, SPELTRA E, MENEGAZZO M, GAROLLA A, FORESTA A, FERLIN A. Sperm telomere length as a parameter of sperm quality in normozoospermic men. **Hum Reprod.**2016;31(6):1158-63.

RODRIGUEZ-BRENES IA, PESKIN CS. Quantitative theory of telomere length regulation and cellular senescence. **Proc Natl Acad Sci U S A.** 2010 Mar 23;107(12):5387-92.

ROQUE M, ESTEVES S. Effect of varicocele repair on sperm DNA fragmentation: a review. **Int Urol Nephrol.**2018;50(4):583-603.

SANTANA, V. P.; MIRANDA-FURTADO, C. L.; DE OLIVEIRA-GENNARO, F. G.; DOS REIS, R. M. Genetics and epigenetics of varicocele pathophysiology: an overview. **J Assist Reprod Genet**, 34, n. 7, p. 839-847, Jul 2017.

SANTANA, V. P.; FURTADO, C. L. M.; MOLINA, C. A. F.; NOBRE, Y. T. D. A. *et al.* A randomized clinical trial study of the effect of varicocelelectomy on sperm clinical analysis and DNA fragmentation: a preliminary data. **Gynecology and obstetrics research**, 2, p. 29-34, 2015.

SHIRAIISHI K, MATSUYAMA H, TAKIHARA H. Pathophysiology of varicocele in male infertility in the era of assisted reproductive technology. **Int J Urol**. 2012 Jun;19(6):538-50

SHARMA R, AGARWAL A, ROHRA VK. Effects of increased paternal age on sperm quality, reproductive outcome and associated epigenetic risks to offspring. **Reprod Biol Endocrinol** 2015; 13:35.

TAHAMTAN S, TAVALAEE M, IZADI T, BARIKROW N, ZAKERI Z, LOCKSHIN R, ABBASI R & ESFAHANI M. Reduced Sperm Telomere length in individuals with varicocele associated with reduced genomic integrity. **Scientific Reports**. 2019;9:4336.

TURNER KJ, VASU V, GRIFFIN DK. Telomere Biology and Human Phenotype. **Cells**. 2019 Jan 19;8(1):73.

THILAGAVATHI J, VENKATESH S, DADA R. Telomere length in reproduction. **Andrologia**. 2013;45(5):289-304.-a

THILAGAATHI J, KUMAR M, MISHRA SS, VENKATESH R, KUMAR R, DADA R. Analysis of sperm telomere length in men with idiopathic infertility. **Arch Gynecol Obstet**. 2013;287(4):803-7.-b

WEIDNER W, PILATZ A, ALTINKILIC B. Andrologie: Varikozelle: Ein Update [Andrology: varicocele: an update]. **Urologe A**. 2010. Sep;49 Suppl 1:163-5.

World Health Organization. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. **Cambridge University Press**, 2010. 5th ed.

WHIGHT C, MILNE S, LEESON H. Sperm DNA damage caused by oxidative stress: modifiable clinical, lifestyle and nutritional factors in male infertility. **Reprod Biomed Online**. 2014;28(6):684-703.

WOJSIAT J, KORCZYŃSKI J, BOROWIECKA M, ŻBIKOWSKA HM. The role of oxidative stress in female infertility and in vitro fertilization. **Postepy Hig Med Dosw (Online)**. 2017 May 9;71(0):359-366. doi: 10.5604/01.3001.0010.3820. PMID: 28513

XUE J, YANG J, YAN J, JIANG X, HE LY, WU T, GUO J. Abnormalities of the testes and semen parameters in clinical varicocele. **NanFang Yi Ke Da Xue Xue Bao**. 2012 Apr;32(4):439-42.

ZAAZAA A, ADEL A, FAHMY I, ELKHIAT Y, AWAAD AA, MOSTAFA T. Effect of varicocelectomy and/or mast cell stabilizer on sperm DNA fragmentation in infertile patients with varicocele. **Andrology**. 2018;6(1):146-150.

ZINI A, LIBMAN J. Sperm DNA damage: clinical significance in the era of assisted reproduction. **CMAJ**. 2006;175(5):495-500.

ZHAO J, LI H, DENG H, ZHU L, ZHOU B, YANG M, LIU Q, LUO G, YANG Y, MA W. Lnc RNA gadd7, increased in varicocele patients, suppresses cell proliferation and promotes cell apoptosis. **Oncotarget**. 2017;9(4):5105-5110.

ZALENSKAYA IA, BRADBURY EM, ZALENSKY AO. Chromatin structure of telomere domain in human sperm. **Biochem Biophys Res Commun**. 2000;279(1):213-8.

ZAMPIERI N, ZUIN V, CORROPPOLO M, OTTOLENGHI A, CAMOGLIO FS. Relationship between varicocele grade, vein reflux and testicular growth arrest. **Pediatr Surg Int**. 2008 Jun;24(6):727-30. Epub 2008 Apr 18.

ZVEREVA MI, SHCHERBAKOVA DM, DONTSOVA OA. Telomerase: structure, functions, and activity regulation. **Biochemistry (Mosc)**. 2010 Dec;75(13):1563-83.

Anexos

7. ANEXOS

Termo de consentimento livre e esclarecido

Convidamos o senhor a participar do estudo intitulado “**Análise da integridade celular e nuclear de espermatozoides de pacientes com varicocele**”. Este estudo tem a finalidade de investigar a informação genética de homens com e sem varicocele, cuja doença se encontra em aproximadamente 20% dos adultos e adolescentes. A varicocele é a presença de varizes (veias dilatadas) nos testículos, e está relacionado com o aumento da infertilidade masculina. Ainda não sabemos explicar todas as manifestações clínicas (sintomas) da varicocele, inclusive a presença ou não de alterações nos parâmetros seminais. Por isso, acredita-se que a doença tenha relação com alterações no funcionamento de genes importantes para a formação de espermatozoides.

Nesse estudo serão analisados a quantidade e qualidade dos espermatozoides, e seu DNA através da análise do comprimento do telômero (região do cromossomo). O DNA é a central de informações de uma célula, onde todas as características que herdamos de nossos pais estão armazenadas. A análise do DNA através das ferramentas biotecnológicas, podem ajudar a entender as causas da varicocele e do comprometimento da qualidade seminal. Esse estudo também pode ajudar na busca de um exame para diagnóstico mais precoce e possíveis alvos de cura da doença.

Para o grupo de estudo, são convidados homens que apresentam varicocele nos graus I, II e III, diagnosticados por palpção e/ou diagnóstico ultrassonográfico (*ultrassom Doppler*), e que não tenha realizado cirurgia de correção da doença. Nos grupos controle são convidados à participar, homens com fertilidade comprovada por possuírem pelo menos dois filhos, sem a presença da varicocele (através do exame físico) e com espermograma considerado normal pela Organização Nacional da Saúde (OMS 2010).

Todos os voluntários realizarão a coleta de sêmen para a análise da qualidade dos espermatozoides (espermograma) e estudo do DNA (fragmentação do DNA espermático, e comprimento telomérico). Para realizarmos esta análise, será necessário a coleta de uma amostra de sêmen, após um período de abstinência sexual de dois dias. A coleta do material será em uma sala reservada do Laboratório de Andrologia do Setor de Reprodução Humana do HC-FMRP/USP ou da Sesma Clínica de Reprodução Humana, sem exposição do doador ou qualquer tipo de identificação que o constranja. Os possíveis danos são em relação ao desconforto da coleta do sêmen por masturbação, que será amenizado pelas condições de privacidade do local da coleta.

Todos os voluntários também irão coletar uma amostra de 10 ml de sangue para análise do DNA das células sanguíneas. Os possíveis desconfortos está relacionado a dor da picada da agulha ou hematoma após a coleta de sangue.

Suas amostras de sangue e sêmen serão processadas e armazenadas em Freezer à -80°C sob minha responsabilidade, sendo transportadas para o departamento de pesquisa do HC-FMRP/USP. Após analisado a amostra, o DNA isolado será usado na análise do comprimento telomérico, onde serão empregado a técnica de RT-qPCR.

Todo o material coletado (sangue e sêmen) após processado e analisado para fins proposto, será descartado.

Eu, como responsável pela pesquisa, me comprometo a identificar as amostras e os dados coletados de modo que garanta o sigilo e a sua confidencialidade, para isso as suas amostras (sêmen, sangue, DNA) serão identificadas por meio de números sequenciais correspondentes a cada paciente, armazenadas em uma pasta que ficará sob guarda dos pesquisadores responsáveis por essa pesquisa.

Solicitamos também os dados de contato do senhor, para que seja possível encontrá-lo posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber informações sobre eventuais benefícios provenientes deste estudo.

Sua participação nessa pesquisa é voluntária, podendo se recusar a participar da mesma ou interromper a participação a qualquer momento, sem penalidades ou perda dos benefícios na sua assistência institucional, bastando informar à equipe responsável sob sua desistência.

Não iremos avaliar condições gerais de saúde/doença dos pacientes através das amostras coletadas (condições não pertinentes à pesquisa). Os resultados de todos os exames aos quais você foi submetido serão fornecidos pessoalmente ao final deste estudo.

Lembramos que a amostra de sêmen coletada não será utilizada de forma alguma para qualquer outro tipo de procedimento que não fora proposto nesta pesquisa, inclusive procedimentos reprodutivos.

O senhor poderá receber informações à qualquer questionamento ou esclarecimento ou dúvida acerca dos procedimentos, riscos, benefícios e outros relacionados à pesquisa e aos exames a que será submetido, durante qualquer período do estudo.

Se você sofrer qualquer dano ou problema de saúde durante a realização do estudo, entre imediatamente em contato com os pesquisadores responsáveis pela pesquisa: **Dra Rosana Maria dos Reis (RG: 7627787-2), cel: (16) 99992-5722, Victor César de Paula S Nascimento (RG 13617695), cel: (16)981025602, ou no Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, no 1ª andar, no número (16) 3602-2815** em horário comercial.

O participante da pesquisa receberá uma via do TCLE devidamente assinada e rubricada em todas as páginas pelo participante e pelo pesquisador. Em caso de dúvidas éticas, o senhor poderá entrar em contato com os Comitês de Ética: CEP do HC-FMRP/USP, pelo telefone (16) 3602-2228, de segunda a sexta, das 8 às 17h.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de _____.

Nome do participante: _____

Assinatura: _____ Data: ___/___/_____

Nome do pesquisador: _____

Assinatura: _____ Data: ___/___/_____

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Transcriptoma, comprimento telomérico e fragmentação de DNA em espermatozoides de homens com varicocele

Pesquisador: Rosana Maria dos Reis

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa na área da genética da reprodução humana (reprogenética););

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

(Reprodução assalida);

(Manipulação de gametas, pré-embriões, embriões e feto);

Versão: 8

CAAE: 44673515.8.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.023.601

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO

O termo "varicocele" foi criado por Curling em 1843 e refere-se à dilatações das veias testiculares na porção escrotal do plexo pampiniforme que drena os testículos, devido à dificuldade do retorno venoso nessa região. A doença é encontrada em aproximadamente 20% dos adultos e adolescentes. Na maioria das vezes é assintomática e, quando há sintomas, o mais comum é a dor testicular, encontrada em 2 a 10% dos casos. A varicocele clínica é diagnosticada através de exame físico, enquanto a subclínica pode apenas ser observada via ultrassonografia com Doppler. A varicocele é uma das maiores patologias andrológicas relacionadas com o aumento da subfertilidade masculina, estando presente em 35% a 40% dos casos. Muitos estudos também demonstraram que a doença causa um declínio progressivo na fertilidade, visto que é observada em 69% a 81% dos homens com infertilidade secundária. A intervenção cirúrgica pode trazer

Endereço: SEPN 510 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-INAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte CEP: 70.750-921
UF: DF Município: BRASÍLIA
Telefone: (61)3315-5878 E-mail: conep@saude.gov.br