

CAROLINA FERNANDA SILVEIRA-BARBETTI

**AVALIAÇÃO SEMINAL, DOS RECEPTORES
DE D-MANOSE E REAÇÃO ACROSSÔMICA
EM HOMENS INFÉRTES COM VARICOCELE**

Tese de Doutorado

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. ADRIANA ORCESI PEDRO

**Unicamp
2008**

CAROLINA FERNANDA SILVEIRA-BARBETTI

**AVALIAÇÃO SEMINAL, DOS RECEPTORES
DE D-MANOSE E REAÇÃO ACROSSÔMICA
EM HOMENS INFÉRTEIS COM VARICOCELE**

Tese de Doutorado apresentada à Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas para obtenção do Título de Doutora em Tocoginecologia, área de Ciências Biomédicas

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. ADRIANA ORCESI PEDRO

**Unicamp
2008**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
UNICAMP**

Bibliotecário: Sandra Lúcia Pereira – CRB-8ª / 6044

Si39a

Silveira-Barbetti, Carolina Fernanda
Avaliação seminal, dos receptores de D-
manose e reação acrossômica em homens
inférteis com varicocele / Carolina Fernanda
Silveira Barbetti. Campinas, SP: [s.n.], 2008.

Orientador: Adriana Orcesi Pedro
Tese (Doutorado) Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.

1. Infertilidade. 2. Varicocele. I. Pedro,
Adriana Orcesi. II. Universidade Estadual de
Campinas. Faculdade de Ciências Médicas.
III. Título.

Título em inglês: Evaluation of D-mannose- binding sites and acrosomal reaction in semen of
infertile men with varicocele

Keywords: • Infertility
 • Varicocele

Titulação: Doutor em Tocoginecologia

Área de concentração: Ciências Biomédicas

Banca examinadora:

Profª. Drª. Adriana Orcesi Pedro
Profª. Drª. Lúcia Helena Simões da Costa Paiva
Prof. Dr. Sydney Glina
Prof. Dr. Edson Borges
Prof. Dr. José Roberto Erbolato Gabiatti

Data da defesa: 27 – 11 – 2008

Diagramação e arte final: Assessoria Técnica do CAISM (ASTEC)

BANCA EXAMINADORA DA TESE DE DOUTORADO

Aluna: CAROLINA FERNANDA SILVEIRA-BARBETTI

Orientadora: Profª. Drª. ADRIANA ORCESI PEDRO

Membros:

1.

2.

3.

4.

5.

Curso de Pós-Graduação em Tocoginecologia da Faculdade
de Ciências Médicas da Universidade Estadual de Campinas

Data: 27/11/2008

200902784

Dedico este trabalho...

*Aos meus pais Ademar e Louzânia Silveira,
por terem me ajudado a trilhar mais esse caminho profissional*

*Ao meu marido Gustavo Barbetti,
por acreditar em meus sonhos*

Agradecimentos

Gostaria de agradecer a todas as pessoas que, de alguma forma ou em algum momento, estiveram presentes durante a realização deste trabalho, mas em especial...

... a Deus, que é “poderoso pra fazer infinitamente mais do que tudo que pedimos ou pensamos conforme Seu poder que opera em nós”. Ele me manteve com saúde, disposição e fé para que eu pudesse concluir este trabalho, podendo de uma forma pequena, mas não menos importante, contribuir com a saúde de muitos homens inférteis.

Aos meus pais, Ademar e Louzânia Silveira, que acreditaram que eu pudesse chegar até aqui. Eles que me ensinaram a viver sempre acreditando em Deus e me incentivaram sempre para que eu pudesse concluir mais esta etapa. A eles meu eterno agradecimento, inclusive por existir.

Ao Gustavo Barbetti, meu marido, parceiro, amigo, que sempre acreditou em mim e nos meus sonhos e me deu força naqueles momentos mais difíceis para que eu pudesse chegar até aqui. Este título também é seu, pois sem você eu jamais estaria vivendo esta fase grandiosa e especial de nossas vidas.

As minhas irmãs e cunhados, Gláucia Regina Silveira e Hédio Patrício dos Santos, Lília Marise Silveira Moda e Paulo Henrique Moda, por me apoiarem sempre.

Aos meus sobrinhos “Paulinho” e “Gustavinho” por me alegrarem naqueles dias tão tristes.

À Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), por ter-me conferido a oportunidade de continuar trilhando o caminho do aprendizado, através da Pós-graduação Multiprofissional da Tocoginecologia da Faculdade de Ciências Médicas

Aos pacientes do Ambulatório de Urologia que aceitaram voluntariamente em participar desta pesquisa sem os quais esse trabalho jamais seria realizado.

Ao Dr. Luis Bahamondes, por ter me aceito na pós-graduação como aluna ouvinte e quem me ensinou, no primeiro dia de aula, que fazemos pós-graduação por paixão à pesquisa. Hoje, depois de sete anos, concordo plenamente com ele

À Dra. Adriana Orcesi Pedro por ter aceito a orientação deste trabalho, o qual com profissionalismo me ajudou a finalizar.

Ao Dr. Paulo Augusto Neves, pela revisão final do trabalho e indicação da revista para publicação.

Ao Dr. Marcelo Vieira que participou deste trabalho realizando anamnese e exame físico nos pacientes do Ambulatório de Urologia, confirmando cada caso de varicocele sempre com bom humor e disposição.

Aos membros da banca por despendarem parte de seus preciosos tempos analisando este trabalho e ajudando com conselhos importantes. Afinal, como disse Platão: “Nunca desencoraje ninguém que faça progresso continuamente não importa quão demorado seja.”

À equipe do Laboratório de Reprodução Humana CAISM-UNICAMP, Francisco A. T. Fazano, Mara Ap. de Lúcio, Nicéia Marrone, Celestina Gomes, Alexandre Martins, pela convivência durante o experimento prático.

Aos amigos do Laboratório de Anatomia Patológica do Hospital das Clínicas da Unicamp, Lucinha, Dona Geralda e Adilson, pela amigável e excelente convivência durante minhas leituras no KS.

A Dra. Maria José Munucci, pelo contato que mantemos até hoje trocando nossas experiências para que possamos sempre avançar nossas pesquisas.

As amigas as quais levarei sempre em meu coração, não somente pela competência profissional mas pelo bom humor e por me ajudarem naqueles momentos “impossíveis”, Margarete Donadon - secretária da Pós-Graduação –, Sirley Siani Moraes – estatística- e Cylene – revisora.

As amigas Alessandra Blois Beluzzo, Camila Maria Madeira, Luciana Rodrigues Camilo, Patrícia Mancini, Maria Flávia Correia Escudeiro Greve e ao amigo Luís Bruno Petrilli Filho, pela amizade e companheirismo em momentos tão especiais de nossas vidas.

Aos funcionários e amigos da ASTEC que ajudaram na organização final deste trabalho.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas, pelo apoio e ajuda fundamental na busca de artigos quando minhas fontes tornaram-se esgotadas.

Sumário

Símbolos, Siglas e Abreviaturas.....	viii
Resumo.....	x
Summary.....	xii
1. Introdução.....	14
1.1. A Infertilidade	14
1.2. Relatos históricos da varicocele, técnicas cirúrgicas e reprodução assistida	15
1.3. Avaliação da Varicocele.....	18
1.4. Qualidade seminal	19
1.5. O Espermatozóide	22
1.6. Atividade Espermática <i>in vivo</i>	24
1.7. Receptores de D-manose	27
2. Objetivos.....	36
3. Sujeitos e Método	37
3.1. Avaliação Seminal (OMS,1999).....	38
3.1.1.Exame Macroscópico	38
3.1.2.Exame Microscópico.....	39
3.1.3.Processamento espermático	44
3.1.4.Avaliação dos receptores de D-manose e Reação Acrossômica	45
4. Publicações	50
5. Conclusões	75
6. Referências Bibliográficas	77
7. Anexos.....	83
7.1. Anexo 1 – Tabela de Referência da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1999)	83
7.2. Anexo 2 – Estrutura molecular da D-manose proposta por Fisher (adaptado de Aranha,1998)	84
7.3. Anexo 3 – Consentimento Livre e Esclarecido	85
7.4. Anexo 4 – Carta de Aprovação do CEP	86
7.5. Anexo 5 – Algoritmo.....	89

Símbolos, Siglas e Abreviaturas

BSA	Albumina Sérica Bovina
CAISM	Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher
cAMP	Monofosfato de Adenosina Cíclica
CO₂	Gás Carbônico
°C	Graus Celsius
ESCA	Esterilidade Sem Causa Aparente
FCM	Faculdade de Ciências Médicas
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
G	Força centrífuga
h	Hora(s)
HC	Hospital das Clínicas
HSA	Albumina Sérica Humana
HTF	Fluido Tubário Humano
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide
Man-FITC-BSA	Manose conjugada com fluoresceína conjugada com soro albumina bovina

ml	Mililitro(s)
mOsm	Miliosmol
μl	Microlitro(s)
μg	Micrograma (s)
OMS	Organização Mundial da Saúde
%	Porcentagem
PBS	Tampão Fosfato Salino – Dulbecco's
PZD	Dissecção Parcial da Zona Pelúcida
RITC-PSA	Rhodamina conjugada com <i>Pisum sativum</i>
SSS	Substituto de Soro Sintético
SUZI	Injeção na Subzona (espaço perivitelíneo)
TRA	Técnicas de Reprodução Assistida
TRICT	Tetrametilrhodamina
UNICAMP	Universidade Estadual de Campinas
x	Quantidade de aumento microscópico

Resumo

Introdução: A infertilidade masculina pode acometer entre 30% e 40% dos casais inférteis. Dentre esses fatores está a varicocele, que afeta 15% da população em geral e que nesses homens inférteis chega a 30%-40%, podendo estar relacionada com alterações na amostra seminal e conseqüente fertilidade. **Objetivo:** Comparar amostras seminais de homens férteis sem varicocele com homens inférteis com varicocele quanto a(os) parâmetros macroscópicos e microscópicos; recuperação espermática após *swim-up*; tipos de marcação dos receptores de D-manose em espermatozóides com acrossoma íntegro e ocorrência da reação acrossomal independente da ligação de D-manose em dois tempos. **Sujeitos e Métodos:** foi realizado um estudo corte transversal comparando o grupo de pacientes com queixa de infertilidade e varicocele (N=30) com o de homens férteis e sem varicocele (N=30) através do espermograma, processamento espermático e testes funcionais nas amostras recém-ejaculadas (zero hora) e após processamento (uma hora). Os dados foram analisados pelos testes exato de Fisher, Mann-Whitney, qui-quadrado e análises repetidas de Friedman. **Resultados:** O grupo com varicocele apresentou alterações significativas em relação ao grupo-controle na análise seminal quanto à cor ($p<0,01$), viscosidade aumentada ($p<0,01$), menor concentração

espermática ($p<0,01$), menor motilidade (A+B) ($p<0,01$), menor vitalidade ($p<0,01$), menor inchaço hiposmótico ($p<0,01$) e maior alteração na morfologia estrita de Kruger ($p<0,01$). Após capacitação espermática pela técnica de *swim-up*, o grupo com varicocele apresentou menor concentração espermática ($p<0,01$) e menor porcentagem de espermatozóides com expressões dos receptores de D-manose e não reagidos acrossomicamente, independente do tempo ($p<0,01$). Não houve diferença significativa das amostras em cada grupo quando avaliadas separadamente, entre os dois momentos independentes do *status* acrossomal e da presença da expressão dos receptores para D-manose. Os quatro padrões de marcação com D-manose e acrossoma íntegro mais observados no grupo com varicocele foram cabeça manchada (21,1%), peça intermediária preenchida (13,1%), região equatorial preenchida (10,6%) e cabeça preenchida (9,8%).

Conclusão: espermatozóides de homens com varicocele apresentaram alterações qualitativas, quantitativas e funcionais, podendo comprometer a fertilização espontânea.

Palavras-chave: infertilidade masculina; varicocele; D-mannose; reação acrossômica.

Summary

Introduction: Male infertility may affect 30% to 40% of infertile couples. Among this factors, varicocele affects 15% of the general population and may reach 30%-40% of infertile men. The varicocele to be able to exhibit disturbance in the semen specimens and fertility result. **Objectives:** To compare, at two time points, semen samples from fertile men and infertile men with varicocele with respect to macroscopic and microscopic parameters, sperm recovery after swim-up, patterns of labeling of D-mannose-ligand receptor in spermatozooids with intact acrosome and the occurrence of acrosomal reaction irrespective of the expression of D-mannose-binding sites. **Subjects and methods:** A cross-sectional study was carried out to compare a group of patients with complaints of infertility and varicocele (n=30) and a control group of fertile men without varicocele (n=30) by performing semen analysis, sperm processing and functional tests carried out in recently ejaculated samples (time zero) and following processing (one hour). Statical analysis was performed through Fisher's exact test, chi-square test, Mann-Whitney test and Friedman repeated analysis of variance. **Results:** Significant alterations were found in the group of men with varicocele compared to the control group with respect to color ($p<0.01$), increased viscosity

($p < 0.01$), lower sperm concentration ($p < 0.01$), lower motility (A+B) ($p < 0.01$), lower vitality ($p < 0.01$), lower rates of hypoosmotic swelling ($p < 0.01$), greater alterations in morphology according to Kruger's strict criteria ($p < 0.01$). After performing swim-up lower sperm concentration ($p < 0.01$) and lower percentage of sperm cells expressing D-mannose binding sites, together with intact acrosomal status irrespective of time ($p < 0.01$) in infertile men with varicocele. There was no statistically significant difference between the samples of each group when evaluated separately at the two time points, irrespective of acrosomal status and of D-mannose-ligand receptor expression. The four patterns of labeling of D-mannose binding sites and intact acrosome most observed in the varicocele group were: spotty pattern on the head (21.1%), uniform pattern on the mid-piece (13.1%), uniform pattern on the equatorial region (10.6%) and uniform pattern on the head (9.8%). **Conclusions:** Sperm from men with varicocele have qualitative, quantitative and functional abnormalities that may affect spontaneous fertilization.

Key words: male infertility; varicocele; D-mannose; acrosomal reaction.

1. Introdução

1.1. A Infertilidade

O termo Infertilidade é utilizado para casais que não conseguem obter a gravidez após um ano de relações sexuais freqüentes sem o uso de qualquer tipo de método contraceptivo (WHO,1975), causando sofrimento e conflitos pessoais tanto em homens quanto em mulheres acometidas por essa patologia (Bahamondes e Makuch, 2002).

Estudos realizados mundialmente avaliaram que apenas 5% dos casais escolhem voluntariamente não ter filhos, mostrando a importância para um casal gerar um filho biológico, e isto pode justificar o aumento do número de casais inférteis que procuram por tratamento pelas técnicas de reprodução assistida (TRA) nos últimos anos. Estima-se que entre 10% e 15% da população em geral apresenta problemas de infertilidade e, destes, 30% são causados por fatores masculinos (Bahamondes e Makuch, 2002). Um desses fatores, que afeta aproximadamente 15% dos homens da população geral, é a varicocele (Gentile e Cockett, 1991; Kamal et al., 2001; Jarow et al., 2002; Kibar et al., 2002;

Redmon et al., 2002; Pompeo et al., 2003; Pasqualotto et al., 2005). Entretanto, observa-se em 30% a 40% dos casais com infertilidade a presença de varicocele, sugerindo este fator como causador de infertilidade masculina por apresentar uma dilatação das veias do plexo pampiniforme acompanhada de refluxo de sangue. Esta dilatação pode ser causada por flacidez da parede das veias ou insuficiência das válvulas, que altera a dinâmica da perfusão sanguínea do testículo (Fisher e Sandlow, 2001; Orejuela et al., 2002; Abdelmassih, 2003). Esta alteração, independentemente do grau e da atrofia testicular, foi correlacionada com os refluxos de epinefrina e norepinefrina de ação adrenérgica que atuam ao nível das arteríolas testiculares causando vasoconstrição, diminuição da quantidade de oxigênio e aumento do gás carbônico, gerando estresse oxidativo que envolve a disfunção mitocondrial e alteração no transporte metabólico, inviabilizando a atividade espermática (Abdelmassih, 2003). Assim, a varicocele pode estar acompanhada de atrofia ou hipotrofia testicular e diminuição da produção espermática.

1.2. Relatos históricos da varicocele, técnicas cirúrgicas e reprodução assistida

O primeiro relato referente à varicocele foi datado no primeiro século pelo grego Celsus (42aC.-37dC.), que descreveu que as veias dilatadas estavam associadas à atrofia testicular (Celsus, 1906)¹. Nesse período, existem relatos da reparação da varicocele através de possíveis cauterizações, incisões e semicastrações. Cooper foi o primeiro a realizar a incisão escrotal em 1831 (Cooper,

¹ Celsus AC. Über die Arneiwissenschaft Vieweg. Braunschweig; 1906. *apud* Fisher LM, Sandlow JI. The role of varicocele treatment in the era of assisted reproductive technology. International Braz J Urology, 2001.

1831)². O cirurgião britânico Curling, em 1843, foi quem usou primeiramente o termo “varicocele” quando descreveu a dilatação da veia espermática como uma patologia (Curling,1843)³. Em 1856, o mesmo demonstrou a relação entre a varicocele e a infertilidade devido à diminuição na capacidade secretora (Curling,1856)⁴. Em 1889, foi relatada pela primeira vez a varicocelectomia bilateral realizada em um paciente por Bermet, que observou melhora da qualidade seminal (Bermet,1889)⁵.

Em Paris, no ano de 1904, foi relatada a redução escrotal por Hartmann (Hartmann,1904)⁶. Em 1918, Ivanesevich e Gregorini recomendaram a ligadura venosa (Ivanesevich e Gregorini,1918)⁷. Em 1929, Mascomber e Sanders relataram um caso no qual um paciente infértil e oligospermico foi submetido à varicocelectomia e tornou-se normospermico (Mascomber e Sanders,1929)⁸. Trinta e um anos mais tarde, Palomo propôs a ligação em posição retroperitoneal alta e a ressecção não somente da veia espermática, mas da artéria (Palomo,1949). Em 1955, Tulloch descreveu o caso de um homem de 27 anos de idade que

² Cooper A. Observation of the structure and diseases of the testis. London: Churchill, 1831 *apud* Fisher LM, Sandlow JI. The role of varicocele treatment in the era of assisted reproductive technology. International Braz J Urology, 2001

³ Curling TB. Practical treatise on diseases of the testis. Paris: Labé,1843 *apud* Fisher LM, Sandlow JI, 2001. *ibid*.

⁴ Curling TB. A practical treatise on the disease of the testis and of the spermatic cord and scrotum. Philadelphia: Blanchard & Lea,1856 *apud* Fisher LM, Sandlow JI, 2001. *ibid*.

⁵ Bermet WH. Varicocele, particularly with reference to its radical cure. Lancet 1889; 1:261 *apud* Orejuela FJ, Moreira JR, Lipshultz LI. Varicocele. In: Rodrigues Netto Jr, Neves PA. Infertilidade masculina. São Paulo: Editora Atheneu; 2002.p.113-22.

⁶ Hartman H. Organes génito-urinaires de l'homme. Paris: Steinheil,1904 *apud* Fisher LM, Sandlow JI, 2001. *ibid*.

⁷ Ivanesevich O,Gregorini H. Una nueva operación para curar el varicocele. Semana Med 1918; 25:575 *apud* Fisher LM, Sandlow JI, 2001, *ibid*.

⁸ Mascomber D, Sanders MB,1929. The spermatozoa count: its value in the diagnosis, prognosis and treatment of sterility. New Engl J Med 1929; 200:981-9 *apud* Orejuela FJ, Moreira JR, Lipshultz LI. Varicocele. In: Rodrigues Netto Jr, Neves PA. Infertilidade masculina. São Paulo: Editora Atheneu; 2002.p.113-22.

após a varicocelectomia conseguiu restabelecer a fertilidade, associando, a partir de então, a varicocele como um fator de subinfertilidade que poderia ser curada (Tulloch,1955). Este relato representa um marco na história da medicina masculina, pois relacionou a varicocele à infertilidade masculina, popularizando a varicocelectomia cirúrgica como método de tratamento da mesma (Fisher e Sandlow, 2001).

As TRA apresentam relatos desde 1790, quando John Hunter descreveu pela primeira vez a técnica de inseminação artificial, colocando sêmen de um paciente infértil na região vaginal da respectiva esposa (Shilds,1950). Desde essa época, inúmeras técnicas foram desenvolvidas e aprimoradas. As de baixa complexidade, como a inseminação vaginal, foram substituídas pela intra-uterina com bons resultados (Glina e Antunes Jr, 2002). As técnicas de alta complexidade surgiram com a punção oocitária e colocação dos mesmos junto com os espermatozóides, culminando com o nascimento de Louise Brown em 1978, como descreveram Steptoe e Edwards (1978). Apesar dessa técnica ser utilizada até hoje, em alguns casos de fator masculino grave (concentração espermática menor ou igual a dois milhões de espermatozóides por mililitro), as taxas de fertilização podem ser insatisfatórias (Marinelli et al., 2003). Assim, os oócitos passaram a sofrer incisões, “facilitando” a entrada do espermatozóide, como a abertura da zona pelúcida com soluções ácidas (Zona Drilling) ou mecânica, como a dissecação parcial da zona pelúcida (PZD), desenvolvida por Malter e Cohen (Van Kooij, 1996). Além disso, passaram a inserir espermatozóides no espaço perivitelíneo – *subzonal injection* (SUZI) (Ng S-C et al., 1988). Essas técnicas

deixaram de ser utilizadas devido ao alto índice de polispermia sem melhoria das taxas de gravidez. Em 1976, Uehara e Yanagimachi utilizaram espermatozóides e óvulos de *hamster* e realizaram a técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) (Van Kooij, 1996). Em 1992, Palermo descreveu o uso desta técnica em seres humanos, apresentando melhoria das taxas de gravidez nos casos de infertilidade masculina. Essa técnica passou a ser utilizada para os casos não atendidos pelas técnicas de baixa complexidade e falhas na fertilização *in vitro* (FIV) (Neves, 2002).

1.3. Avaliação da Varicocele

A varicocele pode ser detectada pelo urologista durante exame clínico por visualização ou palpação. Estudos relatam que em homens adultos a varicocele aparece comumente isolada à esquerda (60% a 90%) e estes altos índices podem estar relacionados com a anatomia da veia espermática esquerda, sendo relatadas três hipóteses: (1) por ser mais longa que a direita e entrar em ângulo reto na veia renal deste lado, formando uma longa coluna hidrostática com alta pressão dilatando o plexo pampiniforme; (2) a insuficiência valvular nesta veia espermática pode resultar em um aumento da pressão transmitida pela veia renal para o plexo pampiniforme; (3) fenômeno de *nutcracker* (quebra-nozes) – a veia renal esquerda pode ser comprimida entre a aorta e a artéria mesentérica superior, transmitindo um aumento pressórico para a veia espermática, o que contribui para sua dilatação (Pompeu et al., 2003). A varicocele isolada à direita é considerada rara, podendo indicar a possibilidade de uma alteração retroperitoneal, como um

tumor renal com invasão venosa. Outros estudos apresentaram incidência bilateral, podendo chegar entre 30% a 50% dos pacientes em idade adulta (Orejuela et al., 2002). Em adolescentes, o valor é similar ao dos adultos, aparecendo com maior frequência entre os 14 e 15 anos de idade (Pompeu et al., 2003). Em outro estudo realizado em pacientes adolescentes e jovens foi observado que em 22% a varicocele pode estar presente isolada à esquerda, em 1,1% isolada à direita e em 19,8% bilateralmente (Canales et al., 2005). Os primeiros passos do urologista na investigação da infertilidade masculina devem ser a anamnese e exame físico para detectar a presença da varicocele nos seguintes graus (Dubin e Amelar, 1971):

- Grau I (pequenas): aquelas que são palpáveis apenas com a manobra de Valsalva.
- Grau II (moderadas): palpáveis facilmente sem esta manobra.
- Grau III (grandes): detectadas visualmente e palpadas com facilidade.

1.4. Qualidade seminal

A varicocele pode estar relacionada com alterações seminais. Estudos iniciais mostraram o efeito da elevação na temperatura escrotal sobre a concentração espermática durante a espermatogênese. Em pacientes com varicocele, as temperaturas intra-escrotais encontram-se 0,6°C a 0,8°C acima das temperaturas intra-escrotais dos pacientes férteis (MacLeod, 1965; Agger, 1971). Outros estudos com ratos, macacos e cachorros detectaram que as varicoceles unilateral à esquerda e bilateral causam aumento na temperatura testicular.

O resultado desse aumento na temperatura refletiu-se na análise seminal dos respectivos animais, os quais apresentaram diminuição na concentração espermática, além do aumento de espermatozóides com formas imaturas e afiladas (Kay et al., 1979; Cockett et al., 1980; Turner, 1983).

A varicocele pode afetar a espermatogênese, levando à alteração na qualidade seminal como diminuição da concentração, motilidade e alteração da morfologia (Gentile e Cockett, 1991; Orejuela et al., 2002; Pasqualotto et al., 2005). Estas podem ser observadas através do espermograma segundo os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS) (WHO,1999) (Anexo 1), que avaliam o sêmen macroscopicamente quanto ao aspecto, liquêfação, viscosidade, volume, pH e cor e microscopicamente quanto à motilidade, vitalidade, concentração espermática, morfologia, leucócitos (teste da peroxidase) e teste hiposmótico.

A relação entre varicocele e infertilidade masculina tem sido muito discutida na literatura, pois alguns pacientes com varicocele não apresentam alteração da análise seminal. Estudo retrospectivo realizado por Gentile e Cockett, em 1991, avaliou 5000 homens inférteis, dos quais 2000 (40%) apresentavam varicocele. Destes, 429 (20%) apresentaram amostra seminal anormal, com baixa concentração e motilidade além de morfologia alterada e um aumento de espermatozóides imaturos. Os outros 80% dos pacientes com varicocele apresentaram espermatogênese normal e conseqüentemente avaliação seminal normal. Contrariamente, a OMS avaliou 9038 homens inférteis em 34 centros da OMS distribuídos em 24 países. Considerando os homens que passaram por consultas devido a problemas de fertilidade, a varicocele foi encontrada

em 11% dos que têm sêmen normal e em 25% dos que apresentaram sêmen anormal. Através destes trabalhos pode-se observar que a avaliação da infertilidade masculina – realizada somente através da análise seminal (espermograma) – pode parecer duvidosa ou superficial quanto aos aspectos macroscópicos e microscópicos avaliados, pois pacientes com varicocele mostraram durante a análise seminal que suas amostras estavam dentro dos critérios de normalidade propostos pela OMS, embora esses mesmos pacientes se queixassem de infertilidade. Outros pacientes apresentaram amostras de sêmen alteradas desde a avaliação macroscópica. Embora todos tivessem queixas de infertilidade, os mesmos não expressaram um padrão de amostra característico. Essa variação pode dificultar para o urologista quanto ao tipo de tratamento que o paciente com varicocele deve ser encaminhado, seja para correção da mesma ou uso de TRA.

Para que os especialistas tenham maior confiabilidade no resultado da avaliação espermática, além das análises qualitativa e quantitativa do espermograma, faz-se necessário o uso de testes que avaliem a parte funcional do espermatozóide (Aitken, 2006), como o teste da D-manose e o teste da reação acrossomal (Hershlag et al., 1998) que podem estar diretamente relacionados com a alteração causada pela varicocele, uma vez que esta pode afetar bioquímica e estruturalmente o espermatozóide.

1.5. O Espermatozóide

O espermatozóide é uma célula gamética masculina formada após uma sequência inteira de eventos como divisões mitóticas, meióticas e espermiogênese que transformam a espermatogônia em espermatócito primário, espermatócito secundário, espermatíde e espermatozóide (Figura1), durando esse processo aproximadamente setenta e quatro dias. Esses eventos iniciam-se durante a fase de puberdade masculina e prosseguem ao longo de toda a vida.

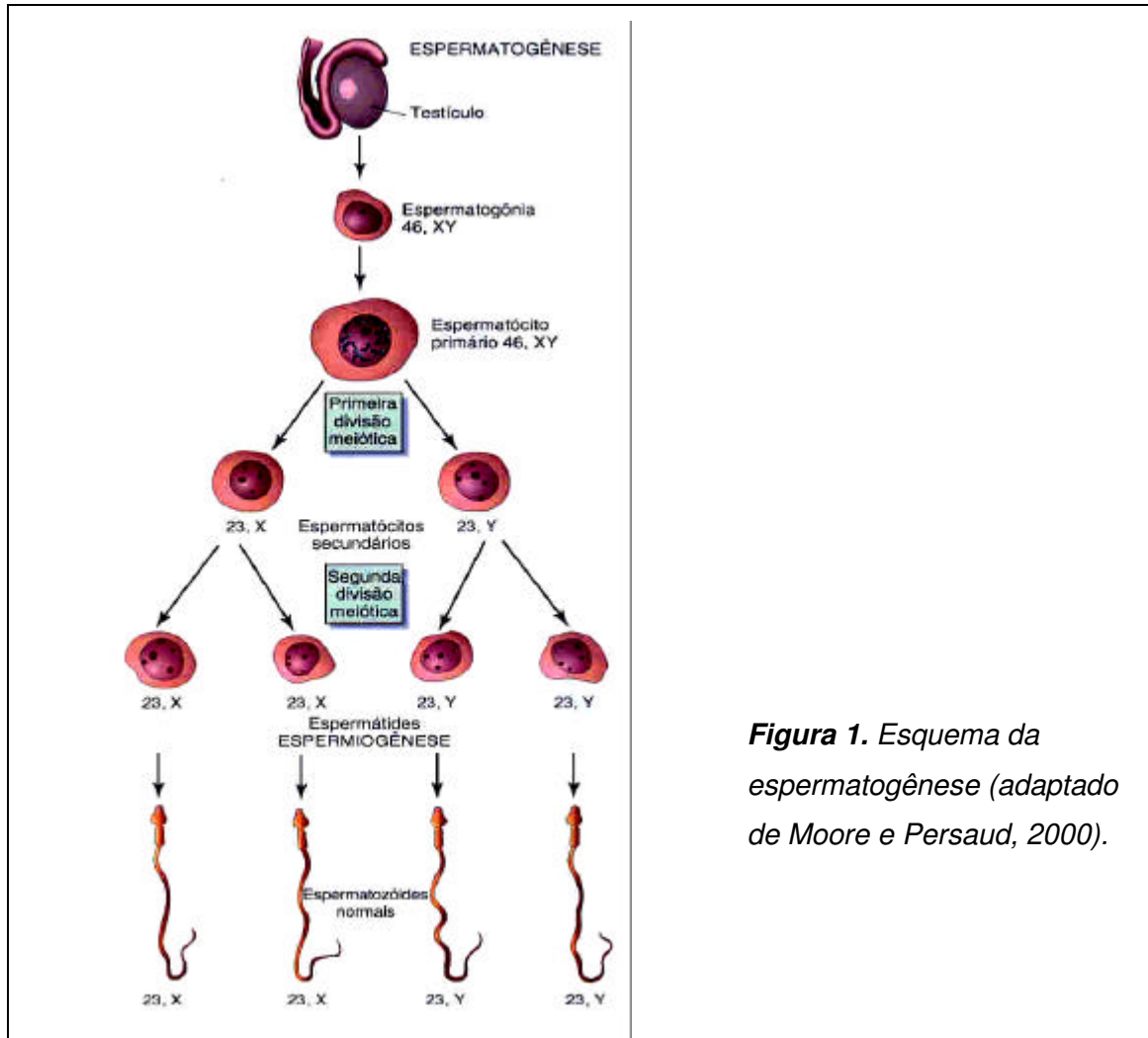
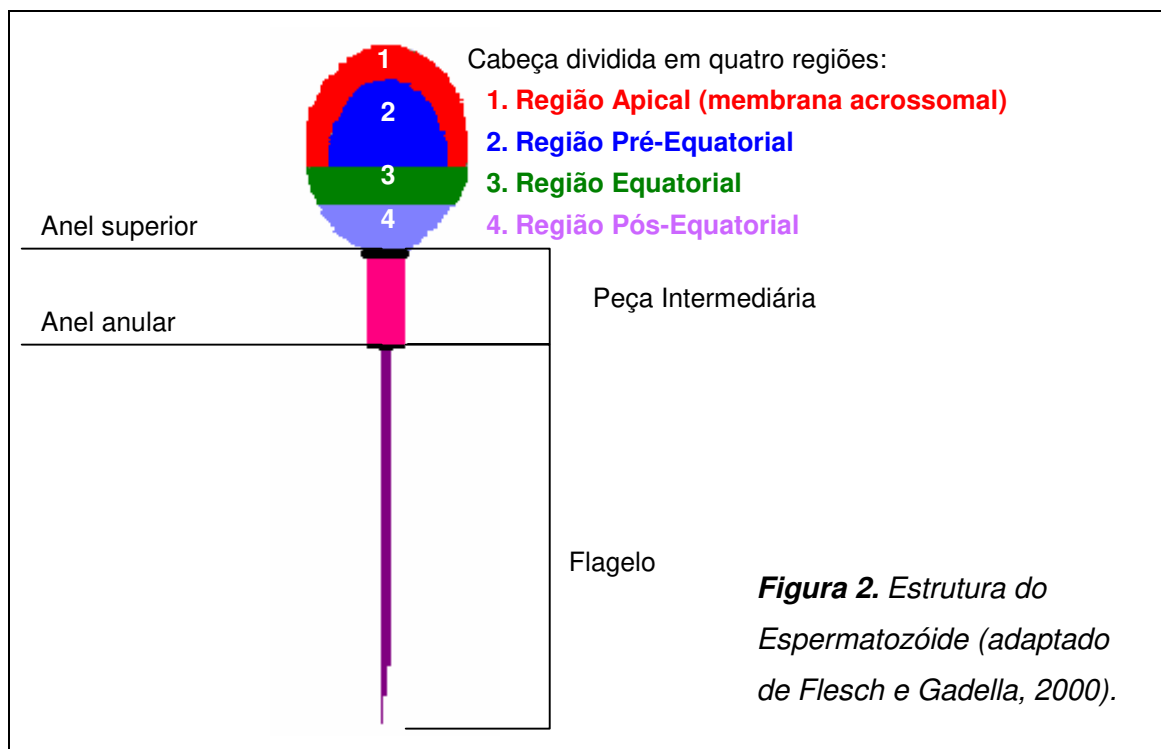


Figura 1. Esquema da espermatogênese (adaptado de Moore e Persaud, 2000).

Após esses eventos, o espermatozóide passa a ser uma célula móvel, com capacidade natatória livre, sendo constituído de três partes: cabeça, peça intermediária e flagelo ou cauda (Moore e Persaud, 2000). Essas três partes possuem adaptações fisiológicas características da morfologia espermática que contribuem com a função desta célula para penetração no óvulo, principalmente a região da cabeça. Em 1976, Flechon, através da observação em microscópio eletrônico, dividiu a cabeça do espermatozóide em quatro regiões (Figura 2): apical, pré-equatorial, equatorial e pós-equatorial (Flesch e Gadella, 2000).



Na região apical encontra-se o acrossoma, que contém enzimas hidrolíticas como a hialuronidase e a acrosina, importantes para a degradação da membrana plasmática oocitária. Logo abaixo do conteúdo acrossomal, na região pré-equatorial,

encontra-se o envelope nuclear que reveste todo o conteúdo nuclear (DNA altamente condensado). Entre a cabeça e a peça intermediária observa-se o anel superior. Logo abaixo do anel superior, observa-se a peça intermediária que abriga as mitocôndrias, importantes na produção de energia para que o espermatozóide consiga chegar até o óvulo. Logo após a peça intermediária, observa-se o anel anular e por fim o flagelo, sendo responsável pelo movimento espermático. O espermatozóide apresenta duas membranas: uma interna, na região da cabeça, denominada de membrana acrossomal, que reveste todo o acrossoma, sendo responsável pela liberação de enzimas (vesiculação). A outra reveste todo o corpo externamente, conhecida como membrana plasmática, responsável por sintetizar, entre outras, estruturas como proteínas, fosfolípidos e colesterol, iniciando esse evento quando o espermatozóide começar a percorrer os túbulos seminíferos no epidídimo (Flesch e Gadella, 2000). Além disso, a membrana plasmática também apresenta os sítios receptores para D-manose, um carboidrato presente na superfície do ovócito, que são fundamentais no processo de fertilização (Mori et al., 1989).

1.6. Atividade Espermática *in vivo*

Para que ocorra a interação entre os gametas é necessária a ocorrência de quatro processos: capacitação, interação, reação acrossômica e fertilização propriamente dita.

Naturalmente, durante o trajeto dentro do corpo feminino, o espermatozóide sofre várias modificações bioquímicas e estruturais importantes para o momento do encontro com o óvulo. O conjunto dessas modificações é conhecido como

capacitação espermática, descrito inicialmente em 1951 por dois biólogos que realizaram estudos separados. Eles observaram a “capacidade” de fertilizar óvulos que os espermatozóides apresentavam, após passarem um período dentro do trato genital feminino (Austin, 1952). Este período *in vivo* ocorre aproximadamente em sete horas (Austin 1972; Yanagimachi et al., 1981). É nesse momento da capacitação que são realizadas três alterações importantes para tornar o espermatozóide apto à fertilização:

1) *Hipermotilidade*

É o aumento da velocidade e amplitude do batimento do flagelo após atingir a ampola da tuba uterina. Esta mobilidade pode ser adquirida *in vitro* após centrifugações e incubação do sêmen com meio de cultura -processamento seminal (Rogers e Bentwood, 1982). Acredita-se que a função biológica desta hipermotilidade seja a de facilitar a liberação do espermatozóide do istmo e a penetração na matriz viscosa do *cumulus oophorus* (Santos e Neves, 2002).

2) *Aumento das taxas metabólicas*

O aumento da taxa de respiração ocorre devido ao aumento do consumo de oxigênio e da utilização de substratos energéticos pelos espermatozóides. Estes fenômenos podem ser correlacionados *in vitro*, com o enriquecimento dos meios de incubação, aumentando as taxas metabólicas e o número de espermatozóides capacitados (Monesi, 1972). A principal fonte de energia provém da glicólise ou respiração oxidativa, tendo como base a glicose, o lactato e piruvato, presentes no líquido seminal e fluido tubário (Rogers e Bentwood, 1982).

3) Rearranjo estrutural da membrana plasmática

Enquanto o espermatozóide percorre o trato genital feminino, sofre alterações da membrana plasmática. Substâncias que recobrem os espermatozóides, como proteínas, substâncias inibidoras ou estabilizadoras, são removidas da superfície e os componentes protéicos e lipídicos da membrana plasmática são reorganizados estruturalmente, permitindo a entrada de íons cálcio, expondo receptores que vão intermediar a reação acrossômica, tornando a membrana plasmática susceptível à fusão com o óvulo (Rogers e Bentwood, 1982).

Após o encontro do espermatozóide com o óvulo, inicia-se o processo de interação entre os mesmos. Essa interação é realizada através da ligação dos receptores para D-manose que são mantidos internamente no citoplasma dos espermatozóides ejaculados e foram exteriorizados na superfície da membrana plasmática através do efluxo de colesterol, durante o evento de capacitação. Essa interação entre o espermatozóide e o gameta feminino ocorre devido ao óvulo em sua superfície ser rico em D-manose, que bioquimicamente é um aldeído glicérico com seis carbonos epímera da glicose no carbono 2. A letra “D” indica que o OH presente no penúltimo carbono está do lado direito (Aranha, 1998) (Anexo 2). Este composto está presente na superfície ovular e pode ser ligada nos espermatozóides devido à exteriorização dos receptores, formando assim um sistema “chave-fechadura”, que pode ser responsável pelo início da fertilização (Tesarik et al., 1991; Benoff et al., 1993). Após essa interação, inicia-se o processo de reação acrossômica que exige uma alta concentração intracelular de cálcio mobilizado pela ação da calmodulina que determina toda a síntese e degradação de cAMP

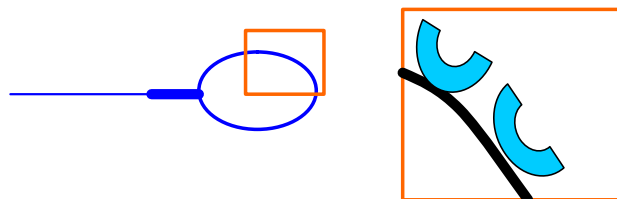
(Flesch e Gadella, 2000). O cálcio também interage com os lípidos da membrana alterando seu arranjo estrutural, tornando-o mais susceptível à fusão e vesiculação observada durante este processo (Santos e Neves, 2002).

Após o processo de reação acrossomal ocorre a reação da zona, um bloqueio decorrente da alteração na capa glicoprotéica extracelular do óvulo, alterando, portanto, a zona pelúcida, impedindo que ocorra a entrada de outros espermatozóides (polispermia) (Moss et al., 1995). Decorrido este processo, inicia-se a fusão propriamente dita entre os gametas, originando os pronúcleos e conseqüentemente a divisão dos blastômeros, rearranjo da cavidade da blastocela pré e pós-implantação uterina e desenvolvimento embrionário (Moore e Persaud, 2000).

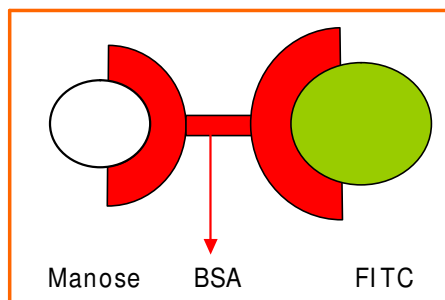
1.7. Receptores de D-manose

A presença de receptores de D-manose na superfície espermática foi estudada inicialmente por Mori et al.(1989), que observaram a ausência de ligação entre os gametas feminino e masculino quando somente os espermatozóides foram previamente tratados com D-manose, preenchendo os sítios receptores exteriorizados durante a capacitação, não permitindo que houvesse ligação com os óvulos, uma vez que a D-manose é presente na superfície destes. Porém, quando somente os óvulos foram pré-tratados com a D-manose, houve ligação espermática devido aos receptores presentes na superfície espermática estarem exteriorizados e “vazios”, estabelecendo assim um sistema “chave-fechadura”, em que os receptores para D-manose nos espermatozóides ligam-se ao açúcar presente na superfície dos óvulos, sendo este o primeiro passo para a fertilização.

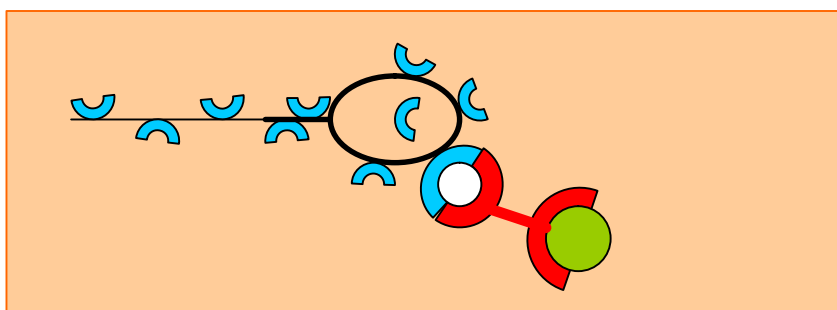
Os receptores podem ser marcados e avaliados em microscópio devidamente equipado, através de uma glicoproteína (manosilado de soro albumina bovina) conjugada a uma fluoresceína (fluorescein isothiocyanete) conhecida comercialmente como Man-FITC-BSA, conferindo durante a leitura uma coloração verde-maçã (Figura 3).



Ampliação de uma região do espermatozóide onde estão presentes os receptores.



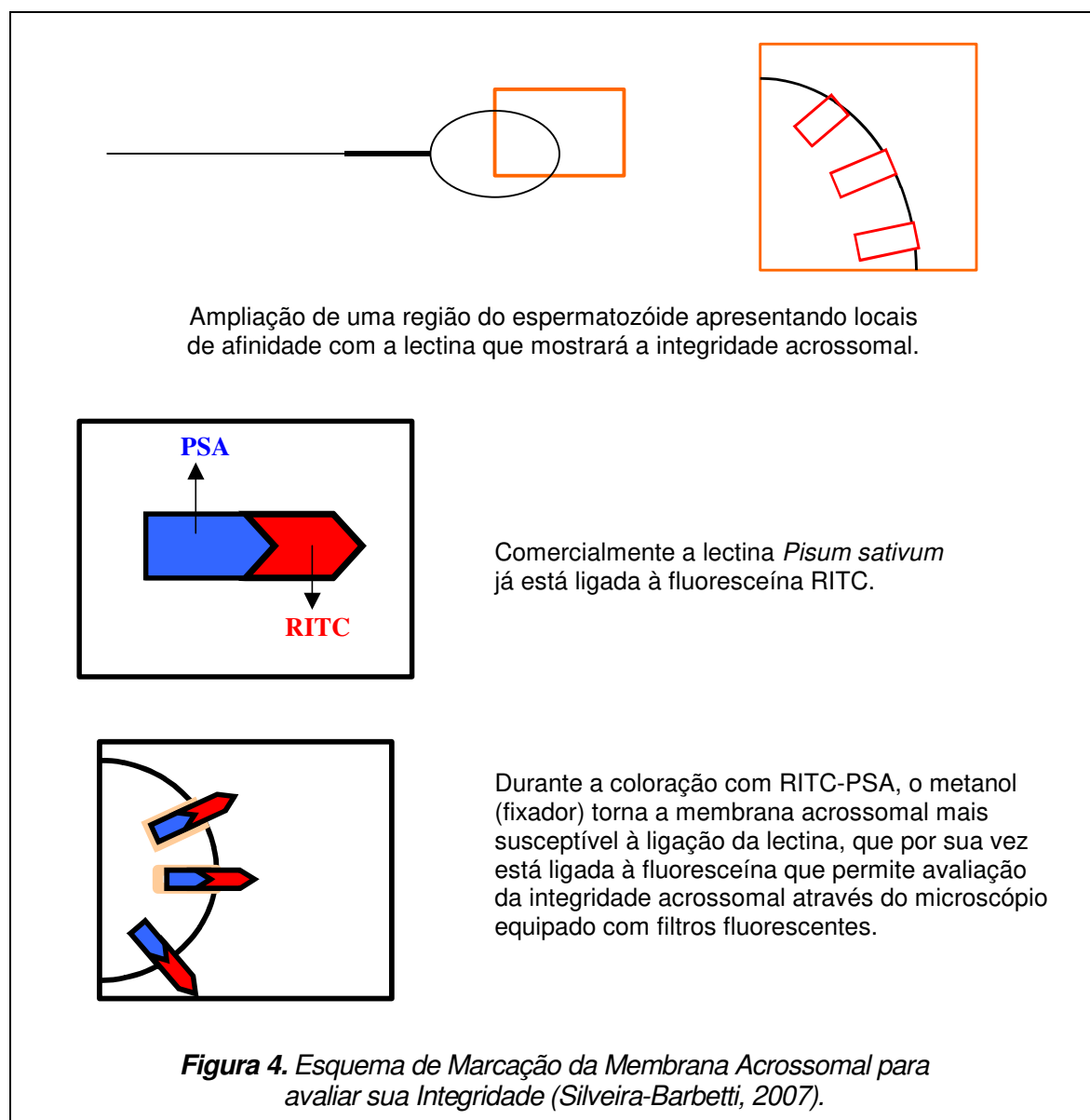
Comercialmente a glicoproteína “D-manose” já está ligada à fluoresceína FITC.



Durante o período de incubação da amostra de sêmen com o corante Man-FITC-BSA, os espermatozóides que apresentam sítios receptores para D-manose exteriorizados ligam-se às glicoproteínas que através das fluoresceínas serão visualizadas em microscópio equipado com filtros fluorescentes.

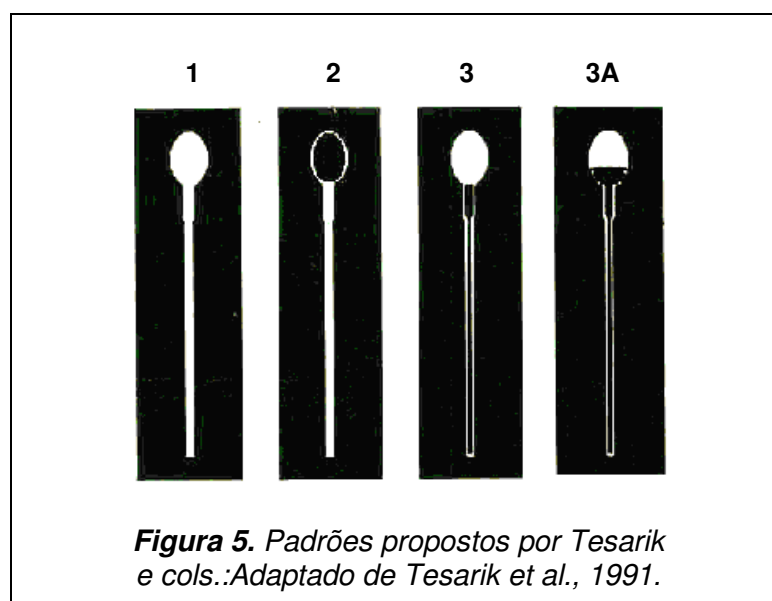
Figura 3. esquema da ocorrência da marcação dos sítios receptores para D-manose em espermatozóides (Silveira-Barbetti,2007).

Esse teste pode ser associado à avaliação do estado acrossomal por serem dois eventos que podem ocorrer simultaneamente. Na mesma lâmina contendo a amostra de sêmen com o corante para avaliação dos receptores de D-manose pode ser aplicado outro corante que apresenta uma lectina (*Pisum sativum*) conjugada com uma fluoresceína (Rhodamine), conhecido comercialmente como RITC-PSA (Figura 4) para avaliar o *status acrossomal* (Benoff et al., 1993).



Em 1991, Tesarik e colaboradores propuseram um protocolo comparando amostras de sêmen entre dois grupos de homens, férteis e inférteis. Apresentaram quatro tipos de padrões de expressão dos receptores de D-manose (Figura 5) juntamente com o *status acrossomal*, utilizando tetrametilrhodamina (TRICT) conjugado com imunoglobulina de coelho:

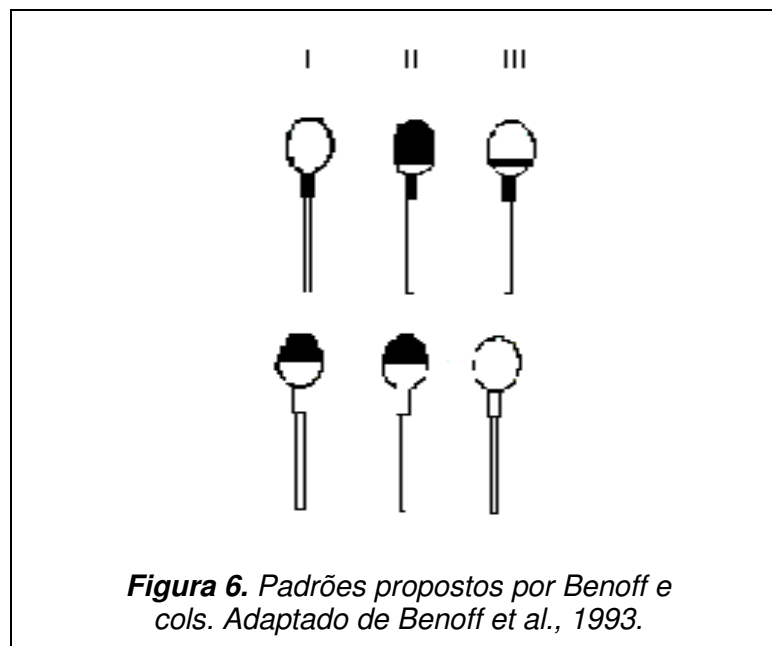
Padrão 1	espermatozóide com todo o corpo preenchido com receptores para D-manose
Padrão 2	espermatozóide com peça intermediária e cauda preenchidos com os receptores de D-manose
Padrão 3	espermatozóide somente com toda a cabeça (topo até o anel posterior) marcada pelos receptores para D-manose
Padrão 3A	espermatozóide com receptores demarcando o topo da cabeça até o fim da região equatorial



Avaliaram as amostras em três tempos: após lavagem da amostra recém-ejaculada observando entre 10% a 15% dos espermatozóides com expressão dos receptores de D-manose, sendo mais evidenciados os padrões 1 e 2 em ambos os grupos; após capacitação pela técnica de processamento *swim-up* e após 4 horas de incubação, observando-se em ambos os grupos menor frequência nos padrões 1 e 2. Entretanto, após incubação foram evidenciados os padrões 3 no grupo dos homens férteis e o padrão 3A em ambos os grupos. A maioria dos espermatozóides apresentou acrossoma íntegro.

Outro estudo, realizado por Benoff et al. (1993), comparou amostras recém-ejaculadas de homens férteis com amostras recém-ejaculadas e/ou congeladas de pacientes encaminhados para FIV. Propôs um protocolo diferente do proposto por Tesarik e colaboradores, utilizando para capacitar as amostras frescas a técnica *de swim-up* e para as amostras congeladas o gradiente descontínuo Percoll. Além disso, no teste da reação acrossômica, utilizou RITC-PSA e avaliou se houve aumento da marcação dos receptores para D-manose após período entre 16 e 20h de incubação em meio de cultura enriquecido com soro albumina humana (HSA) em estufa de CO₂. Os autores apresentaram três padrões de ligação de receptores de D-manose juntamente com a reação acrossômica (Figura 6):

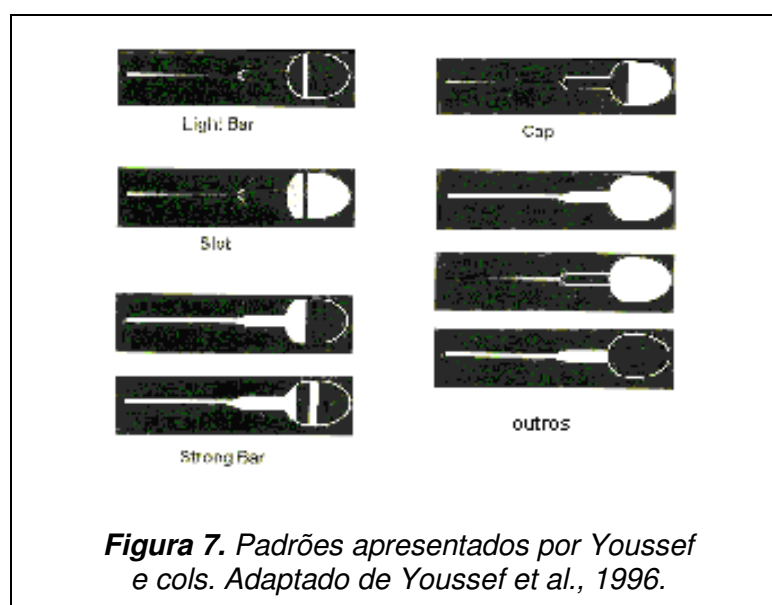
Padrão I	o espermatozóide apresenta somente a peça intermediária marcada com D-manose e está com o acrossoma intacto
Padrão II	o espermatozóide apresenta cabeça e peça intermediária marcadas com D-manose e está com o acrossoma intacto
Padrão III	o espermatozóide apresenta região equatorial e peça intermediária marcadas com D-manose e apresenta acrossoma reagido



Observaram padrões diferentes dos apresentados por Tesarik e colaboradores, sendo os padrões II e III mais visualizados nas amostras de homens férteis e homens com fertilização *in vitro* com resultado positivo, tanto nas amostras recém-ejaculadas como também após incubação em meio de cultura suplementado com HSA. Em homens com falha nos ciclos de fertilização *in vitro*, esses padrões foram pouco observados inclusive após período de incubação.

Em 1996, um trabalho realizado por Youssef et al., comparou amostras de sêmen de pacientes com suspeita de infertilidade com as de doadores férteis, correlacionando a expressão de ligação dos receptores de D-manose com a morfologia estrita de Kruger (Kruger et al., 1986) e propôs cinco padrões diferentes (Figura 7):

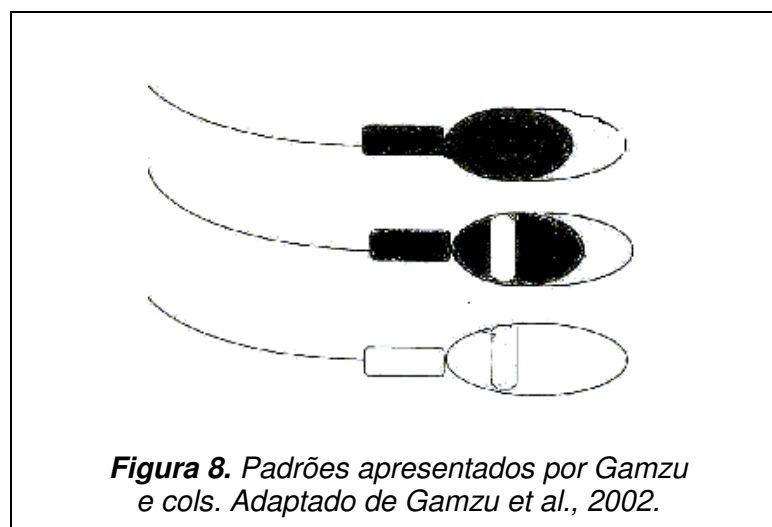
Light Bar	espermatozóides com os sítios receptores para D-manose expressos somente na região equatorial
Slot	espermatozóides com os sítios receptores para D-manose expressos nas regiões apical e pré-equatorial e pós-equatorial
Strong Bar	espermatozóides com os sítios receptores para D-manose expressos nas regiões equatorial e pós-acrossomal, incluindo peça intermediária e flagelo
Cap	espermatozóides com os sítios receptores para D-manose expressos nas regiões apical, pré-equatorial e equatorial
Outros	espermatozóides com os sítios receptores para D-manose expressos no corpo todo, só na cabeça ou na peça intermediária e flagelo



Embora os cinco padrões propostos por Youssef et al (1996) sejam diferentes dos apresentados pelos outros grupos anteriormente, o estudo concluiu que a expressão alterada da marcação no teste D-manose está relacionada com a morfologia alterada, interferindo no processo de fertilização. Porém, este resultado foi contestado por Gamzu et al., (2002), que realizaram o mesmo

trabalho e não estabeleceram a correlação entre os padrões propostos por Youssef et al. (1996) com a morfologia, além de apresentarem padrões de marcação diferentes (Figura 8):

Padrão I	espermatozóides com peça intermediária marcada e regiões da cabeça, não reagidos acrossomicamente - (espermatozóide não capacitado)
Padrão II	espermatozóides com regiões pré e pós-equatorial uniformemente marcadas além da peça intermediária, não reagidos acrossomicamente - (espermatozóide capacitado)
Padrão III	espermatozóides sem marcação dos sítios receptores para D-manose, reagidos acrossomicamente – (espermatozóide com acrossoma reagido)



Embora todos os trabalhos sejam concordantes quanto ao fato de a fertilização somente se iniciar com a ligação dos receptores de D-manose presentes na membrana plasmática dos espermatozóides com o carboidrato presente no óvulo, todos discordam quanto ao tipo de expressão apresentado

pelos espermatozóides de amostras de homens férteis ou inférteis, portanto não há um consenso na literatura quanto a um padrão específico de expressão dos receptores de D-manose apresentado pelos homens férteis ou inférteis. Além disso, os trabalhos mostraram diferenças significativas entre os padrões de expressão em relação às amostras de homens férteis e inférteis quando comparadas, dentro do seu próprio padrão estabelecido, sugerindo que os testes funcionais como a expressão dos sítios para D-manose e *status* acrossomal podem mostrar algum efeito de uma determinada patologia sobre a funcionabilidade espermática.

Assim, a proposta deste estudo foi avaliar o sêmen de homens inférteis com varicocele através dos testes funcionais de D-manose e reação acrossomal, e compará-los com os resultados de um grupo-controle composto por homens normais e férteis, analisando se houve ou não diferença no tipo de marcação dos receptores para D-manose presentes nos espermatozóides. Esta comparação poderá auxiliar o diagnóstico quanto ao tipo de indicação terapêutica em homens com varicocele e queixa de infertilidade.

2. Objetivos

Comparar as amostras de sêmen entre os homens inférteis com varicocele em relação aos homens férteis sem varicocele quanto a(os):

- Parâmetros seminais macroscópicos e microscópicos;
- Recuperação espermática após técnica de *swim-up*;
- Tipos de marcação dos receptores de D-manose apresentados em espermatozóides com acrossoma íntegro nas amostras recém-ejaculadas e após processamento;
- Ocorrência da reação acrossomal independente da ligação de D-manose comparando espermatozóides da amostra recém-ejaculada e após processamento.

3. Sujeitos e Método

O trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas (FCM) da UNICAMP, afirmando que o projeto apresentado atendia a todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como foi aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido (Anexos 3 e 4).

Durante o período de maio de 2001 a outubro de 2003 foram selecionados pacientes do ambulatório de urologia do HC da UNICAMP que foram submetidos à anamnese e exame físico, sendo divididos em 2 grupos: controle e infértil com varicocele sem filhos. O grupo-controle foi formado por 30 pacientes candidatos à vasectomia que não apresentavam varicocele ao exame físico e cujos espermogramas foram normais de acordo com os critérios propostos pela OMS (1999). Os pacientes do grupo-controle apresentaram em média $37,1 \pm 6,2$ anos, presença de no mínimo dois filhos, sendo o mais novo com mais de um ano de idade, e amostra de sêmen dentro dos critérios propostos pela OMS. Dentre o grupo com varicocele com queixa de infertilidade, foram incluídos 30 pacientes que apresentaram em média $28,9 \pm 5,5$ anos, varicocele unilateral esquerda

(33%, GI = 6,5%, GII = 6,5% e GIII = 20%) ou bilateral (67%), com tempo de infertilidade de $4,0 \pm 2,6$ anos e ausência de filhos. Nenhum dos pacientes apresentou varicocele do lado direito.

Todos os pacientes foram voluntários e participaram da reunião de esclarecimento do estudo e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido. Todos os pacientes forneceram uma amostra de sêmen através de masturbação, após um período de dois a cinco dias de abstinência sexual. O material foi colhido em um recipiente estéril em sala anexa ao Laboratório de Reprodução Humana do Centro de Atenção Integral à Saúde da Mulher – UNICAMP. Essas amostras foram levadas para estufa a 37°C durante 30 minutos para liquefação. Em seguida foram avaliadas macroscopicamente e microscopicamente, de acordo com os critérios da OMS (1999) e seguindo o algoritmo do estudo (Anexo 5).

3.1. Avaliação Seminal (OMS,1999)

3.1.1. Exame Macroscópico

- *Liquefação:* A liquefação do sêmen foi classificada em completa (homogênea) quando não foi encontrada a presença de grumos após 30 minutos de incubação a 37°C.
- *Viscosidade:* A amostra foi aspirada em uma pipeta Pasteur estéril. Caso a saída do sêmen ocorresse em gotas individuais, o mesmo seria classificado como normal, e se foi observada a presença de filamento espermático maior que 2cm de extensão, considerou-se como viscosidade aumentada.

- *Volume*: O ejaculado foi aspirado e colocado em tubo estéril graduado, sendo considerado um volume normal entre 2ml e 5ml.
- *pH*: uma alíquota da amostra foi aplicada a uma fita sensível de pH onde a leitura foi realizada após 30 segundos, anotando-se o resultado através do padrão estabelecido pela fita de calibração colorimétrica de pH. O valor normal variou de 7,2 a 7,8.
- *Cor*: As amostras de sêmen normal apresentaram-se brancas, opalescentes e homogêneas. As amostras diferentes deste padrão (brancas ou amarelas e translúcidas) foram consideradas alteradas.

3.1.2. Exame Microscópico

- *Motilidade*: foi realizada através da análise de uma alíquota de 50µl de sêmen colocada sobre uma lâmina de vidro para microscopia, aquecida a 37°C e coberta por uma lamínula de vidro. Em seguida, a lâmina foi observada ao microscópio óptico sob aumento de 400x, onde foram classificados os tipos de deslocamentos realizados pelos espermatozóides em termos percentuais e em graus (A, B, C e D): grau A – movimento progressivo linear rápido; grau B – movimento linear lento; grau C – movimento não progressivo; grau D – ausência de movimento. Foram consideradas normais as porcentagens de graus de motilidade A+B iguais ou maiores que 50% dos espermatozóides.

- *Vitalidade*: Para avaliar a vitalidade dos espermatozóides colocou-se uma alíquota de 300 µl de sêmen em um tubo de ensaio e em seguida adicionou-se eosina, um corante que tem a capacidade de penetrar células mortas que possuem suas membranas lesadas (Eliasson, 1977). Esta mistura foi homogeneizada e, decorridos três minutos, adicionou-se nigrosina, um corante que propicia fundo preto. Em seguida, realizou-se um esfregão desta mistura em lâmina de vidro para microscopia. Após apresentar-se seca em temperatura ambiente, a mesma foi avaliada sob microscópio óptico com aumento de 400x (Figura 9). Considerou-se como normal a presença de pelo menos 50% de espermatozóides vivos (não corados).

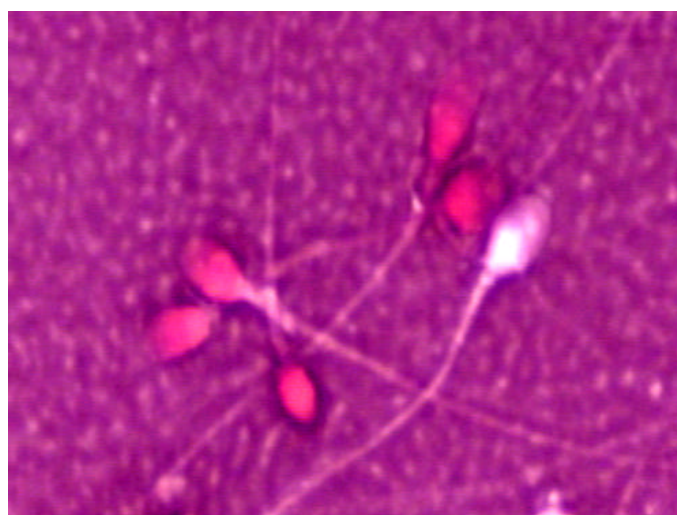
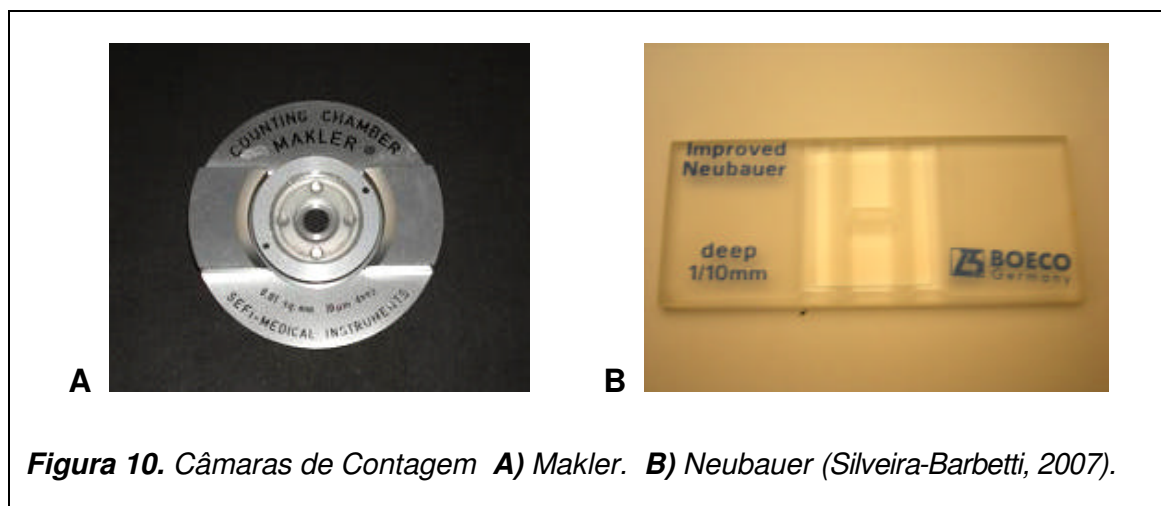


Figura 9: Teste da Vitalidade utilizando a técnica da Eosina-Nigrosina. (Silveira-Barbetti, 2007).

- *Concentração Espermática*: realizada através da contagem em câmara de Neubauer (Figura 10 B) preenchida com amostra fresca, de acordo com a concentração pré-estabelecida ($1:20 = 1,9\text{ml}$ de formalina somado a 10?l de sêmen, segundo Mortimer et al., 1986) e observada ao microscópio óptico com aumento de 400x, e também através da câmara de Makler (Figura 10 A), com uma gota de sêmen fresco sob aumento de 20x. Consideram-se normais as amostras que inicialmente apresentavam valor igual ou maior que 20 milhões de espermatozóides por mililitro.



- *Morfologia*: foram realizados esfregaços com uma gota de sêmen fresco em lâminas para microscopia. Após a secagem em temperatura ambiente, foram coradas com a coloração de Papanicolau modificada para espermatozóide, e examinadas sob imersão. A avaliação foi feita através dos critérios estritos de Krueger et al. (1986), cujo valor de referência normal foi a presença de 14% ou mais de espermatozóides estritamente

normais (Figura 11). Os critérios estritos de normalidade incluem: cabeça oval medindo entre 3mm e 5mm de extensão e entre 2mm e 3mm de largura, pescoço intacto, peça intermediária delgada, cauda única e não enrolada, e ausência de gotas citoplasmáticas.

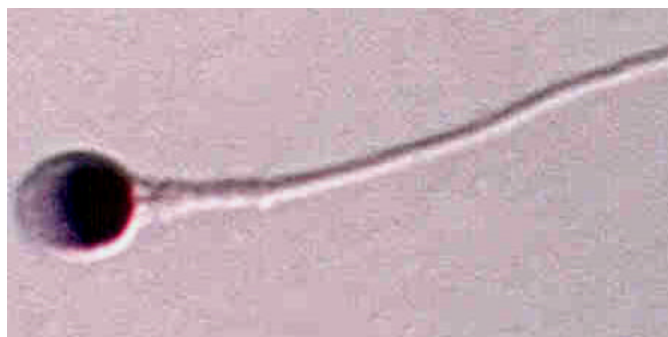


Figura 11. Foto de um espermatozóide morfolologicamente normal (Adaptado de Veeck, 1998).

- *Leucócitos – teste da Peroxidase:* Segundo Nahoum e Cardozo, (1980), este teste é baseado na presença dos radicais peróxido no citoplasma dos leucócitos, que reagem com a água oxigenada resultando em uma coloração marrom dos mesmos. Para tanto, em um tubo de ensaio foram colocados 100?l de sêmen e adicionados mais 100?l de solução peroxidase. Esta mistura foi homogeneizada lentamente e interagiu por 12 minutos. Decorrido este tempo, uma alíquota de 50?l foi retirada e colocada sobre lâmina de vidro e coberta por lamínula de vidro. A leitura foi realizada em microscópio óptico, sob aumento de 400x.

Considerou-se como normal a presença de menos de $1,0 \times 10^6$ leucócitos por mililitro ejaculado (Figura 12).

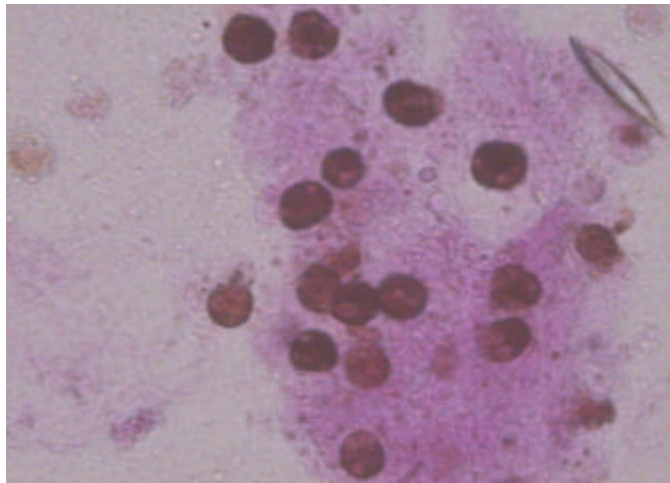
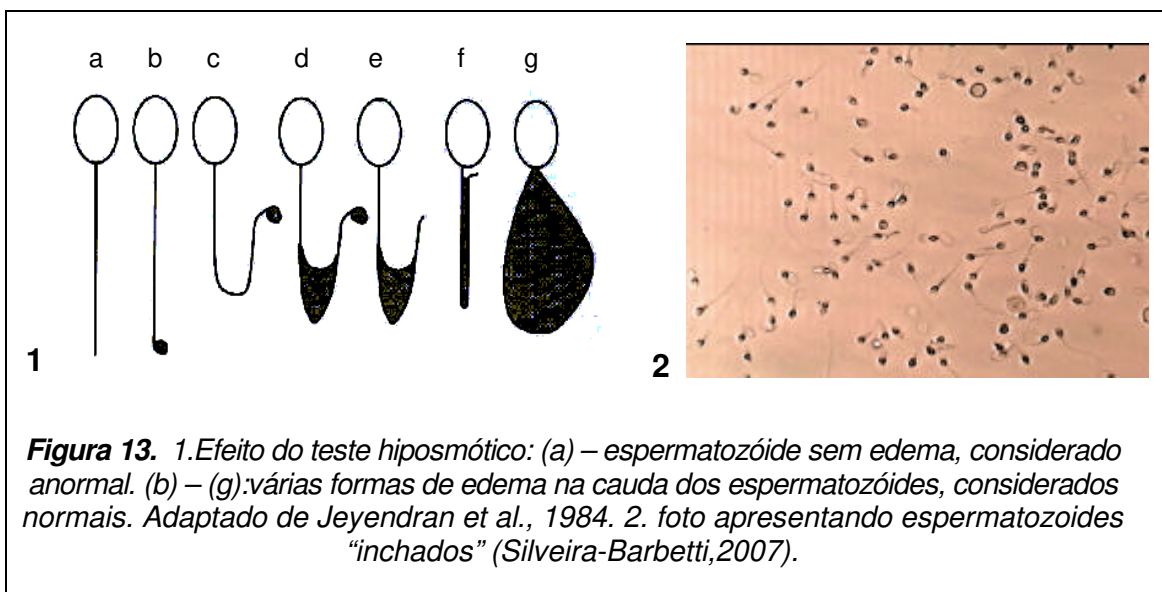


Figura 12. Foto apresentando radicais peróxidos nos leucócitos (em marrom), indicação de contaminação seminal (Silveira –Barbetti, 2007).

- Teste hiposmótico: Uma alíquota de 100?l foi colocada em 1ml de solução hiposmótica (150mOsm de citrato de sódio e frutose), previamente aliquotado, durante 60 minutos a 37°C. Após esta incubação em estufa de cultura a 37° C, uma alíquota de 50?l foi colocada em uma lâmina de vidro e coberta por lamínula de vidro. A leitura foi realizada sob microscópio óptico, com contraste de fase e aumento de 400x. Os espermatozóides que apresentaram inchaço devido ao influxo dessa solução para restabelecer o equilíbrio osmótico indicaram a funcionalidade da membrana. Considerou-se normal a presença de 60% ou mais de formas inchadas (Figura 13).



3.1.3. Processamento espermático

Para o processamento espermático, utilizou-se a Técnica de *Swim-up*: Após a amostra estar liquefeita, a mesma foi colocada em um tubo de ensaio estéril de 15ml (Falcon # 352099) e homogeneizada com meio de cultura PBS (*Dulbecco's phosphate-buffered saline*, Gibco BRL, #14190-136), cujo pH é 7,4 e osmolaridade 280mOsm, na proporção de 3:1. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 300 – 400G por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o sedimento formado pelos espermatozóides no fundo do tubo de ensaio foi ressuspensionado em 2,0ml a 5,0ml de PBS para nova centrifugação. Terminada a remoção do plasma seminal, o sobrenadante foi descartado, o sedimento novamente ressuspensionado em 1,0ml de PBS, homogeneizado, de onde se retirou a alíquota inicial para o teste D-manose. A amostra contendo 1,0ml de sêmen com PBS foi centrifugada por mais cinco minutos. Descartado o sobrenadante, foi adicionado cuidadosamente sobre o

sedimento formado 1,0ml de meio de cultura HTF (*Human Tubal Fluid* – Irvine Scientific ® # 90125), suplementado com 10% de SSS (*Synthetic Serum Substitute* – Irvine Scientific ® , # 99193). O tubo foi colocado em estufa de CO₂ a 5,0%, a 37°C e inclinado a 45° para que ocorresse a migração dos espermatozóides móveis do sedimento para o meio durante o período de 60 minutos (Neves et al., 1990; Neves, 1995). Decorrido este período a amostra foi avaliada em câmara de Makler quanto à concentração e motilidade. Apresentando recuperação após *swim-up*, foi retirada uma alíquota de 192µl de sêmen para realizar o teste D-manose.

3.1.4. Avaliação dos receptores de D-manose e Reação Acrossômica

3.1.4.1 Teste da D-manose

As amostras foram divididas em dois momentos: recém ejaculadas (zero hora) e após processamento espermático (1 hora). Esse tempo foi considerado suficiente para avaliar a reação acrossomal uma vez que foi observado em amostras incubadas até 20 horas o aumento da reação acrossômica porém sem interferência na ligação e marcação dos receptores para D-manose por serem eventos independentes (Silveira et al.,2003).

Em ambiente escuro, cada amostra de 192µl de sêmen com PBS foi adicionada a um microtubo previamente preparado contendo 8µl de solução-mãe de Man – FITC – BSA (Sigma - A7790), resultando em uma concentração final de corante de 100µg/ml. Este tubo foi incubado por 30 minutos a 37°C em estufa

com 5% de CO₂, para que ocorresse a marcação dos sítios receptores de D-manose. Em seguida foi adicionado 1,0 ml de PBS e centrifugado entre 300 – 400G durante 10 minutos. Este procedimento foi realizado duas vezes, desprezando-se o sobrenadante. Em seguida, o sedimento restante foi ressuspensionado em 50µl de PBS, homogeneizado e foram efetuados dois esfregaços (lâmina para leitura + duplicata) que secaram em temperatura ambiente.

3.1.4.2 Teste da Reação Acrossômica

Em ambiente escuro, depois que as lâminas anteriormente preparadas com o teste D-manose estavam secas, estas foram tratadas com metanol por 30 segundos para permeabilizar a membrana plasmática dos espermatozoides, permitindo a penetração do corante RITC-PSA para a visualização do *status* acrossomal. Em seguida, foram secas em temperatura ambiente. Decorrido este processo, foram coradas em câmara úmida por 30 minutos com 208µl de PBS que foi colocado em um microtubo previamente preparado, contendo 8µl de solução-mãe de RITC-PSA (Vector Laboratories Inc ? , Burlingame, CA. RL-1052) resultando em uma concentração final do corante de 100µg/ml. Decorrido este período, as lâminas foram lavadas duas vezes com PBS, secas em temperatura ambiente e armazenadas em caixa laminário a 5°C.

3.1.4.3 Visualização, análise e leitura

– Receptores de D-manose

A visualização foi realizada em um microscópio KS, marca Nikon, equipado com epifluorescência sob filtro BP 490 faixa de excitação, lâmpada 500 (dichroic)

e filtro de barreira LP 515. Foram contados 20 campos diferentes, sendo cinco espermatozóides por campo, totalizando a leitura de 100 espermatozóides em cada lâmina para cada momento (zero hora e 1 hora).

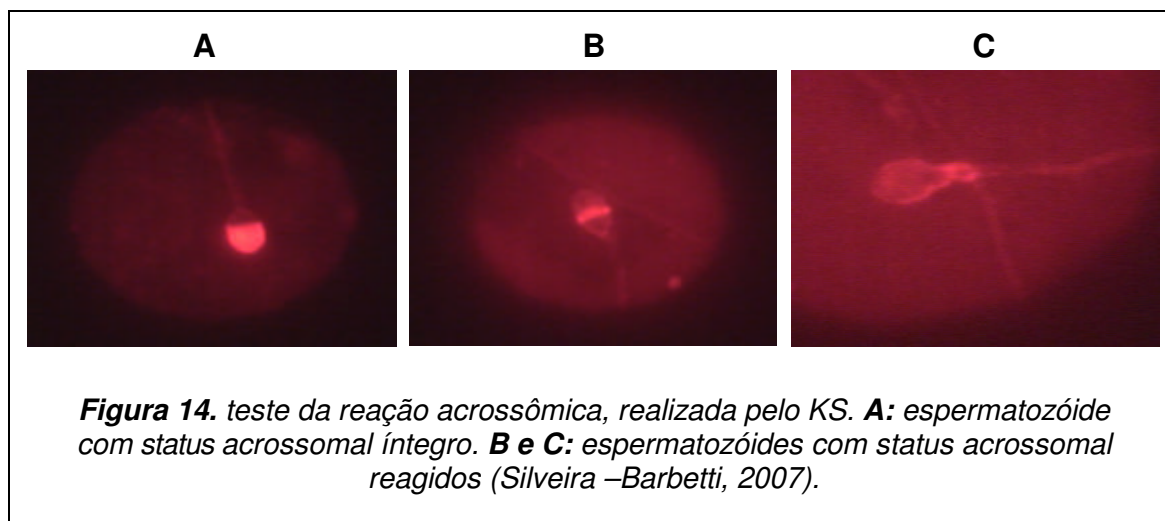
– Reação Acrossômica

A reação acrossômica foi observada sob filtro BP 545 faixa de excitação, lâmpada 580 (dichroic) e filtro de barreira de LP 590 em microscópio equipado com epifluorescência, KS, marca Zeiss. Foram avaliados os mesmos 20 campos do teste da D-manose, e os mesmos 5 espermatozóides por campo, totalizando 100 espermatozóides por lâmina para cada momento, observando-se a integridade do acrossoma.

– Leitura

Inicialmente, para aumentar o índice de refração emitido pela fonte de luz do microscópio equipado com epifluorescência, utilizou-se em cada lâmina duas gotas de solução de glicerol entre lâmina e lamínula. Em seguida a lamínula foi presa na lâmina (selanizada) com esmalte incolor. No microscópio, inicialmente focava-se um campo com cinco espermatozóides e avaliava-se a integridade do acrossoma (Figura 14), que poderia apresentar-se intacto ou reagido. Em seguida, foi mantido o foco no mesmo campo da leitura da reação acrossômica, porém foi mudado o rotor de filtro e avaliado os mesmos cinco espermatozóides quanto à ocorrência ou não da expressão dos sítios receptores de D-manose. Quando os sítios receptores de D-manose foram presentes, foi avaliado em qual região espermática ocorria essa

expressão e os padrões eram anotados em uma tabela (Figura15). Esse procedimento foi realizado para cada um dos 20 campos diferentes avaliados.



Nos dois momentos foram avaliados espermatozóides que se apresentaram:

- Reagidos acrossomicamente e com expressão dos sítios receptores para D-manose;
- Não reagidos acrossomicamente e com expressão dos sítios receptores para D-manose;
- Reagidos acrossomicamente e sem expressão dos sítios receptores de D-manose;
- Não reagidos acrossomicamente e sem expressão dos sítios receptores de D-manose.

A análise estatística comparou as amostras dos grupos: homens inférteis com varicocele com o controle. Utilizou para os dados obtidos durante as análises qualitativas, quantitativas e funcionais os testes exato de Fisher, qui-quadrado, Mann-Whitney e análises repetidas de Friedman. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando o valor de $p < 0,05$ (SAS versão 9.1.3)

4. Publicações

----- Original Message -----

From: UROLOGY

To: carolina@laproferti.com.br ; carolsilveira@yahoo.com

Sent: Thursday, October 16, 2008 8:36 AM

Subject: UROLOGY Submission Confirmation

Carolina Fernanda Silveira Barbetti, MD

University of Campinas (UNICAMP)
Human Reproduction Laboratory
Avenida Maria Emília Alves dos Santos
de Angelis, 121, ap.52/2, Parque Prado.
Campinas, São Paulo 13044-901
BRAZIL

Ph: 55 21 19 9136-3442

Email: carolina@laproferti.com.br; carolsilveira@yahoo.com

Title: "Evaluation of D-mannose-binding sites and acrosomal reaction in semen of fertile men with varicocele."

Article Type: Infertility

Submitted to: UROLOGY

Dear Barbetti:

Your manuscript mentioned above has been received by the UROLOGY Editorial Office.

You can check on the progress of your paper by logging on to the Elsevier Editorial System (EES) as an author.

Website: <http://ees.elsevier.com/url/>

Your manuscript will be given a reference number once an Editor has been assigned; we will notify you of this status update by email.

Thank you for submitting your manuscript to UROLOGY.

Sincerely,
Elsevier Editorial System

Evaluation of D-mannose-binding sites and acrosomal reaction in semen of infertile men with varicocele.

Silveira-Barbetti CF, Pedro AO, Vieira M, Fazano FAT, Lucio M and Neves PA.

School of Medical Sciences, University of Campinas (UNICAMP), São Paulo, SP, Brazil.

Key words: male infertility; varicocele; D-mannose; acrosomal reaction.

Abstract

Objectives: To analyze semen samples from fertile men and infertile men with varicocele at two time-points and compare macroscopic and microscopic parameters, sperm recovery after swim-up, labeling patterns of D-mannose-ligand receptor in spermatozooids with intact acrosome, and acrosomal reaction irrespective of D-mannose binding site expression.

Methods: A cross-sectional study was conducted to compare patients with infertility and varicocele (n=30) and a control group of fertile men without varicocele (n=30) by performing semen analysis, sperm processing and functional tests in recently ejaculated samples (time zero) and following processing (one hour). Statical analysis was performed through Fisher's exact test, chi-square test, Mann-Whitney test and Friedman repeated analysis of variance.

Results: Significant alterations were found in the varicocele group compared to the control group regarding color ($p<0.01$), increased viscosity ($p<0.01$), lower sperm concentration ($p<0.01$), lower motility (A+B) ($p<0.01$), lower vitality ($p<0.01$), lower rates of hypoosmotic swelling ($p<0.01$), greater alterations in morphology according to Kruger's strict criteria ($p<0.01$). After swin-up processing the varicocele group showed a lower sperm concentration ($p<0.01$) and lower percentage of sperm cells with D-mannose binding site expression occurring together with intact acrosomal status, irrespective of time ($p<0.01$). There was no statistically significant difference within each group when evaluated separately at the two time-points, irrespective of acrosomal status and D-mannose-ligand receptor expression. The four patterns of labeling of D-mannose binding sites and intact acrosome most observed in the varicocele group were: spotty pattern on the head (21.1%), uniform

pattern on the mid-piece (13.1%), uniform pattern on the equatorial region (10.6%) and uniform pattern on the head (9.8%).

Conclusions: Sperm from infertile men with varicocele have qualitative, quantitative and functional alterations that may affect spontaneous fertilization.

Introduction

Male infertility may affect 30% to 40% of infertile couples. Among other factors, varicocele affects 15% of the general population and may reach 30-40% of infertile men.¹⁻³ Following anamnesis and physical examination to detect the type and degree of varicocele, semen evaluation may be an important tool for confirming initial observations and to define treatment such as surgical correction and/or assisted reproductive technology (ART). Functional tests may be important for evaluating semen samples from men with varicocele, permitting an analysis to be made concerning whether there is any relationship between varicocele and sperm activity with respect to sperm metabolism and its ability to interact with the oocyte. The presence of D-mannose receptors on the sperm surface following capacitation has been described by Mori et al.,⁴ who reported that no spermatozoa were found to bind to or penetrate the oocyte following prior treatment with D-mannose. However, when D-mannose was added only to the oocytes, sperm binding occurred, thereby confirming the existence of a “key and keyhole” system in which the D-mannose receptors in the spermatozooids are bound to the sugar present on the oocyte surface, this constituting the first step towards fertilization.⁴ Based on this observation, various studies were then carried out in different patients, involving different protocols to label D-mannose receptor and assess acrosomal reaction.⁵⁻⁹

Although results in the literature are concordant with respect to the occurrence of binding between the oocyte and spermatozoid prior to the acrosomal reaction, there are conflicting results regarding the pattern of expression displayed by the spermatozoids in samples from fertile or infertile men, since no international standardization has been established for these functional tests.

The objective of the present study was to evaluate semen parameters, D-mannose tests and acrosomal reaction in infertile patients with varicocele compared to fertile men without varicocele.

Material and Methods

The protocol of this study was approved by the Internal Review Board of the University of Campinas (UNICAMP) and the study was carried out at the outpatient urological clinic of UNICAMP's teaching hospital and in the university's human reproduction laboratory at the Center for Women's Integrated Healthcare (CAISM) between May 2001 and October 2003. The varicocele group was composed of 30 childless patients with a mean age of 28.9 ± 5.5 years, who had been infertile for a mean of 4.0 ± 2.6 years. Patients underwent physical examination and the Valsalva maneuver was applied whenever necessary. Varicocele was bilateral in 67% of cases. Patients had left unilateral varicocele grade I (small) in 6.5% of cases, grade II (moderate) in 6.5% of cases and grade III (large) in 20% of cases. There were no cases of varicocele exclusively on the right side. The control group was composed of 30 candidates for vasectomy aged 37.1 ± 6.2 years

(mean $\pm$ SD), whose semen analysis was found to be within the parameters proposed by the World Health Organization (WHO, 1999) ¹⁰ and who had at least two children, the youngest of whom had to be at least one year old. All the volunteers received explanations on the purpose and procedures of the study, and all signed an informed consent form. Participants collected a semen sample in a sterile container by masturbation following 2-5 days of sexual abstinence. These samples were placed in an oven at 37°C for 30 minutes to allow liquefaction to occur. Next, samples were evaluated according to the WHO manual ¹⁰ and were submitted to sperm processing using the swim-up technique ⁶. Dulbecco's phosphate-buffered saline (PBS) (Gibco BRL, #14190-136) was used to remove the seminal plasma by centrifuging samples twice at 300G for 10 minutes. One ml of human tubal fluid (HTF) media (Irvine, #90125) supplemented with 10% synthetic serum substitute (SSS) (Irvine, #99193), was carefully added, and samples were placed in an incubator with 5% CO₂ at 37°C for one hour. Next, the supernatants were carefully removed and transferred into another 15 ml tube (Falcon, #352099) and an aliquot was placed in a Makler® chamber to evaluate concentration and motility. The samples were submitted to functional tests at two time-points: recently ejaculated (zero time) and following sperm processing (1 hour).

D-mannose technique

Aliquots were removed from semen samples at zero time and one hour later, and placed in microtubes previously prepared with Man-FITC-BSA (Sigma, #A7790) with a final staining concentration of 100 µg/ml. Next, they were placed in an oven with 5% CO₂ at 37°C ⁶ for 30 minutes to label the D-mannose binding sites. ⁹ PBS was added to each microtube to complete the final volume of 1 ml and centrifugation was performed twice

at 300G for 10 minutes. Following removal of the last supernatant, the sediment was resuspended in 50 µl of PBS and a smear was prepared on a glass slide for each time-point and left to dry at room temperature.

Acrosomal reaction test

In a darkened environment, the dry slides with the D-mannose smears were submitted to methanol for 30 seconds and again allowed to dry at room temperature.⁵ The slides were then placed in a humidified chamber in which rhodamine-labelled pisum sativum agglutinin (RITC-PSA) (Vector Laboratories, CA, USA, #RL 1052), previously divided into aliquots in microtubes and diluted in PBS, was applied for 30 minutes. The final staining concentration was 100 µg/ml.⁶ After the required staining time, the slides were washed twice with PBS and allowed to dry at room temperature.⁹

Reading and evaluation

The D-mannose and acrosomal reaction tests were performed on the same slide to allow both tests to be performed on the same spermatozoid.⁶ A KS-Nikon microscope was used, equipped with epifluorescent filters (BP490 and 545 excitation filter, LP515 and 590 barrier filter and 500 and 580 beam splitter, respectively). Twenty fields were evaluated under immersion oil and five spermatozooids were counted per field for each time-point.

Statistical analysis

Statistical analysis compared the samples of the varicocele group with those of the fertile group using Fisher's exact test, the chi-square test, the Mann-Whitney test and the Friedman repeated analysis of variance. Results were considered statistically significant when p-

value was less than 0.05. SAS version 9.1.3 (SAS Institute Inc., Caney, NC USA) was used to perform the analysis.

Results

Significant alterations were found in the varicocele group compared to the control group with respect to increased viscosity ($p < 0.01$) color ($p < 0.01$), and lower sperm concentration ($p < 0.01$). In addition, other significant microscopic alterations were found such as lower motility, both when the two grades (A+B) were compared and when only grade A was analyzed ($p < 0.01$ in both cases). Moreover, there were more alterations in morphology according to Kruger's strict criteria ($p < 0.01$), a lower percentage of live spermatozoa ($p < 0.01$) and lower rates of hypoosmotic swelling test ($p < 0.01$) in the varicocele group compared to the control group (Table 1).

Following swim-up, there was poorer sperm recovery in the group of infertile men with varicocele ($11.7 \pm 27.0 \times 10^6$ spermatozooids/ml) compared to fertile men ($23.5 \pm 16.8 \times 10^6$ spermatozooids/ml) ($p < 0.01$). Grade A motility, evaluated in each group individually, was slightly lower in the samples of the men with varicocele ($p < 0.01$); however, when the two grades (A+B) were compared, no statistically significant differences were found between the varicocele group (73.8 ± 42.8) and the control group (99.2 ± 2.0) (Table 1).

In the group of infertile men, the most frequent D-mannose expression patterns in the spermatozooids in which acrosome was intact, irrespective of the time-point, were: spotty pattern on the head (21.1%), uniform pattern on the mid-piece (13.1%), uniform pattern on the equatorial region (10.6%) and uniform pattern on the head (9.8%), in addition to

other labeling patterns (45.4%). Most of these patterns were also found in the fertile group with the exception of the principal pattern found in the varicocele group (spotty pattern on the head), which was not common in the control group, and the second most common pattern in the control group (head contour), which was not common in the varicocele group. In addition, the variability in the other patterns was greater in the varicocele group compared to the control group (Table 2, Figure 1).

No statistically significant differences were found when the samples of each group were evaluated individually at the two time-points, irrespective of whether they were acrosome-intact or acrosome-reacted and regardless of the occurrence of D-mannose receptor expression (Table 3). Nevertheless, when the two groups were compared, statistically significant differences were found both in the recently ejaculated sample and following sperm processing, spermatozooids with D-mannose and acrosome-intact status being more frequent in fertile men (4.4% and 6.5%) compared to infertile men (0.8% and 0.6%, respectively) ($p < 0.01$). Statistically significant differences were also found between the two groups and at both time-points with respect to acrosome-reacted spermatozooids with expression of D-mannose binding sites, these also being more frequent in fertile men (13.6% and 14.6%) than in men with varicocele (7.2% and 4.6%, respectively) ($p < 0.0001$) (Table 4).

Comment

The presence of varicocele is related to a reduction in sperm production and, consequently, to oxidative stress.¹¹ Testicular alterations may be directly correlated with microscopic

alterations such as, for example, a reduction in sperm concentration and motility (A+B) in recently ejaculated samples.^{8,12,13} In the present study, when samples from men with varicocele were compared to samples from fertile men without varicocele a statistically significant difference was found in concentration, grade A, and grade A+B motility. These results are in agreement with findings reported by Andrade-Rocha in 2007.¹⁴

A study carried out by Kibar et al.¹⁵ found that the percentage of normal spermatozooids according to Kruger's strict criteria was lower in patients with varicocele. These findings are in agreement with the results of the present study, although values are higher than those presented by Kibar but similar to those reported by Gamzu et al.^{8,15} On the other hand, in a recent study carried out by Chen et al., no statistically significant difference was found between men with varicocele and fertile men with respect to concentration and strict morphology.¹⁶ This latter abnormality may also be correlated with alterations in sperm function with respect to D-mannose receptor expression⁷ although there is some controversy on this subject.⁸

Mean sperm concentration in the varicocele group remained within the criteria of normalcy defined by the WHO, a fact also reported by Benoff et al..¹⁷ This observation may be extended to the vitality and hypoosmotic tests, data in the present study being once again similar to those described by Andrade-Rocha in a study also carried out in Brazilian patients.¹⁴ Since results remained within reference values, microscopic evaluation seems to be superficial in view of the fact that the complaint of infertility persists in these patients, who have often already resorted unsuccessfully to ART. This may be related to the sperm's poor ability during fertilization¹³, suggesting a need to

carry out a more thorough investigation on the functionality of the spermatozoid during the successive events following ejaculation, since it appears that varicocele may affect sperm quality but not its production.¹⁴

After swim-up technique, poorer sperm concentration recovery was found in the varicocele group compared to the control group. This was to be expected, since the initial concentration in this group was significantly lower than in the control group. In addition, one hypothesis that may be related to the poor recovery associated with varicocele and that also affects capacitation is the adrenergic stimulation that acts on the testicular arterioles causing vasoconstriction, reducing the amount of oxygen and increasing the amount of carbonic gas, thus generating oxidative stress involving mitochondrial dysfunction and abnormal metabolism and rendering sperm activity inviable¹¹, i.e. already at ejaculation the spermatozoid carries a mitochondrial abnormality that consequently affects the maintenance of its energy. Therefore, this abnormality may reduce the spermatozoid's chances of reaching the oocyte and subsequently fertilizing it. Although few spermatozooids succeeded in achieving ascendant migration, no statistically significant differences were found in motility (A+B) between the groups and this may be related to the in vitro processing technique used rather than representing a factor affecting both groups.

During in vivo capacitation, alterations occur in the cytoplasmic membrane of the spermatozooids; proteins and either inhibiting or stabilizing substances are removed, while protein and lipid components are structurally reorganized, permitting the entry of calcium ions and cholesterol efflux, at which time the exteriorization of the D-mannose receptors, responsible for the first interaction with the oocyte, occurs.¹⁸ This interaction

is based on a key-keyhole system in which the spermatozoid is responsible for binding to the mannose present on the oocyte surface.⁴

Therefore, the D-mannose functional test may be an important tool for evaluating fertilization potential, there being no correlation between this test and the results obtained with a conventional sperm analysis¹⁹, and this is important for patients with varicocele since semen samples fail to show the characteristic features of this condition.

Following exteriorization of the receptors, the D-mannose test was carried out to assess the most frequent pattern of receptor expression in the sperm, using a technique similar to that proposed by Benoff et al.,⁶ differing only with respect to the greater time of staining exposure (15 versus 30 minutes) and the serum used in the incubation medium (HAS versus SSS). One hypothesis for the variability in the D-mannose expression patterns reported in the literature may be the base supplementation of bovine serum albumin (BSA) or human serum albumin (HSA), which are cholesterol receptor molecules, creating a favorable thermodynamic state for the exteriorization of receptors in the plasma membrane^{20,21}; however, no study has yet been carried out to show the types of expression patterns present when synthetic serum substitute (SSS) is used, as currently performed in our laboratory for the capacitation tests in high and low complexity ART.

In the present study, the most frequent pattern of D-mannose expression in the varicocele group was spotty pattern on the head, which is in agreement with data reported by Benoff et al.¹⁷ for their varicocele group, although these investigators failed to specify whether the expression on the sperm head was spotty or uniform. The second

most common pattern in the varicocele group was uniform pattern on the mid-piece, this also being the most frequent pattern in the control group in the present study and in the control group of the study reported by Benoff et al.⁶. The third most frequent pattern was uniform pattern on the equatorial region, which is in agreement with data reported by Youssef⁷ who referred to a light bar. This was the fourth most frequently found pattern in the fertile group in the present study. The fourth most commonly found pattern in the infertile group was uniform pattern on the head, previously reported as the third most common pattern by Tesarik et al.⁵ and as one of the other patterns described by Youssef⁷. In the fertile men in the present study, it was the third most common pattern. One observation regarding the pattern of D-mannose expression is with respect to the head contour, this being the second most common pattern found in the fertile group; however, it was not among the four most commonly found patterns in the infertile group. Following analysis of these patterns, it is reasonable to conclude that the changes incorporated in the D-mannose technique used in this study in relation to those proposed by Benoff et al.⁶ were not the cause of the difference in the patterns found in the two studies, since other studies that used the same or a similar protocol to that proposed by Benoff et al.⁶ also presented different results, some of which are in agreement with those found in the present study.^{5,7,8}

Following cholesterol efflux from the spermatozoid plasma membrane, the process of acrosomal reaction begins, an irreversible event during which fragmentation of the acrosomal membrane occurs followed by vesiculation and the release of proteolytic enzymes (acrosin, hyaluronidase, corona penetrating enzyme, ATPases, esterases, phospholipases

and arylsulfatases, among others). After this event, when the spermatozoid has bound to the oocyte, it is then capable of penetrating and fertilizing it.¹⁸

All the patterns found were evaluated under conditions that we believe to be ideal for fertilization, i.e. in the presence of expression of D-mannose binding sites and intact acrosomal status.²² In addition, the present study differs from that proposed by Benoff et al.⁶ with respect to the time of evaluation of the semen samples. These investigators conducted analyses at three time-points: zero time, 18 hours and 3 days⁶, unlike the present study in which analyses were performed at two time-points: zero time and one hour (swim-up) in view of the findings of a previous study in which time was found to have no effect on intact acrosomal status when there was expression of D-mannose binding sites over three time-points (zero time, 1 hour and 20 hours).⁹ In the present study, the same occurred in the samples from the varicocele group when these were analyzed separately from the samples of the fertile group, the same also occurring when the samples from the fertile group were analyzed separately from the infertile group.

It is important to consider that, although there was no effect on the above-mentioned pattern throughout the three time-points in the previous study⁹, there was a slight variation with respect to the frequency in the region expressed by the D-mannose receptor sites in accordance with the time of incubation. This was observed when only the spermatozoids in the samples from the men in the control group were analyzed immediately following ejaculation and 1 hour following incubation compared to these samples evaluated after 20 hours, possibly suggesting a correlation between the time of exposure of the samples to Man-FITC-BSA and the topography of the expression displayed.

Another important observation in this study was when the samples were compared between the groups at both time-points, there being no statistically significant difference with respect to intact acrosomal status when the spermatozoids failed to express D-mannose receptor sites. However, when reacted acrosomal status was considered, there was a slight difference at both time-points, the greatest difference occurring in the group with varicocele compared to the fertile group, suggesting that these were more capable of maintaining their intact acrosome status in the absence of D-mannose.

The percentage of sperm with D-mannose receptor sites, irrespective of whether acrosomal status was intact or reacted, was lower in the samples from the varicocele group compared to the control group at the baseline time-point, and this percentage decreased over the space of one hour, the opposite occurring in the fertile group in which this percentage increased. Although this increase was not significant, with respect to the interactive process it appears to suggest that D-mannose conjugated to BSA may be an acrosomal reaction-inducing factor ²³, although this event did not affect the inability of the sperm to capacitate and express D-mannose receptors, irrespective of time. This makes sense, since oxidative stress affects mitochondrial activity ¹¹, i.e. the direct source of energy, debilitating the spermatozoid for the capacitation process and consequently limiting the interaction process, which are events that precede acrosomal reaction. This reduction in the ability of capacitation appears to exert an effect on the exteriorization of D-mannose receptors, since this event is dependent on capacitation. ¹⁸ It is also reasonable to hypothesize that the sperm's failure to produce D-mannose receptor sites

constitutes a malformation, i.e. capacitation may occur normally; however, if the spermatozoid does not produce the sites, receptor expression will fail to occur.

These limitations resulting from varicocele may be corrected by varicocelectomy. This surgery has been amply debated in the literature in view of controversies with respect to clinical screening, the most adequate surgical technique (retroperitoneal, inguinal and laparoscopic techniques), recovery time of normal sperm functional abilities, the incidence of recurrence following surgical treatment and the costs involved between surgical options and ART. Both indications should be based on the age of the couple, the time of their infertility as a couple, whether there is also a female component to the infertility, the grade of varicocele and semen analysis.^{1,12,24-27}

Although the literature recommends surgery for the correction of varicocele to improve spermatogenesis^{28,29}, further studies need to be performed with respect to the recovery of fertility. Thus, more appropriate studies must be carried out²⁵ and we suggest performing semen analyses 3, 6 and 9 months following surgical correction of varicocele associated with evaluation of the improvement in D-mannose receptor expression and correlation with spontaneous pregnancy rates or pregnancy rates following low complexity techniques, as well as molecular and genetic trials.^{29,30} Such studies would result in an increase in current knowledge on sperm viability in patients affected by varicocele, who may benefit from new resources to diagnose their potential fertility with greater precision, thereby representing an important tool for the urologists with respect to varicocele and complaints of infertility.

Conclusions

As a result of physiological alterations caused by varicocele in the testicular vein, the spermatozooids of men with varicocele undergo qualitative and quantitative alterations, and functional alterations being more evident. Therefore, men with complaints of infertility should be carefully evaluated, since varicocele may affect spontaneous fertilization.

REFERENCES

1. Fisher LM, Sandlow JI: The role of varicocele treatment in the era of assisted reproductive technology. *Brazilian J Urol* 2001; 27: 19-25.
2. El-Segini Y, Schill WB, Köhn FM, et al: Assessment of sperm functions in infertile patients with varicoceles. *Andrologia* 2002; 34: 291-295.
3. Jarow JP, Sharlip ID, Belker AM, et al: Best practice policies for male infertility. *J Urol* 2002; 167: 2138-2144.
4. Mori K, Daitoh T, Irahara M, et al: Significance of D-mannose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161: 207-211.
5. Tesarik J, Mendoza C, Carreras A: Expression of D-mannose binding sites on human spermatozoa: comparison of fertile donors and infertile patients. *Fertil Steril* 1991; 56: 113-118.
6. Benoff S, Cooper GW, Hurley I, et al: Human sperm fertilizing potential in vitro is correlated with differential expression of a head-specific mannose – ligand receptor. *Fertil Steril* 1993; 59: 854-862.
7. Youssef HM, Doncel GF, Bassiouni BA, et al: Mannose-binding sites on human spermatozoa and sperm morphology. *Fertil Steril* 1996; 66: 640-645.
8. Gamzu R, Yogev L, Amnon B, et al: The expression of mannose-ligand receptor is correlated with sperm morphology. *Arch Androl* 2002; 48: 475-480.
9. Silveira CF, Neves PA, Fazano FAT, et al: Patterns of expression of d-mannose receptors in spermatozoa of fertile men. *J Brasileiro Reprod Assist* 2004; 8: 9-13.
10. WHO Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction, 4th ed. World Health Organisation. Cambridge, United Kingdom: Cambridge University Press, 1999.

11. Abdelmassih R: Estudo do fator masculino, in Scheffer BB, Remohi J, Garcia-Velasco J, et al (Eds): Reprodução Humana Assistida. São Paulo, Atheneu, 2003 pp 41- 58.
12. Orejuela FJ, Moreira SG, Lipshultz LI. Varicocele, in Neves PA, Netto NR Jr (Eds): Infertilidade Masculina. São Paulo, Atheneu, 2002, pp 113-122.
13. Pasqualotto FF, Lucon AM, de Góes PM, et al: Testicular growth, sperm concentration, percent motility, and pregnancy outcome after varicocelectomy based on testicular histology. *Fertil Steril* 2005; 83: 362-366.
14. Andrade-Rocha FT: Significance of sperm characteristics in the evaluation of adolescents, adults and older men with varicocele. *J Postgrad Med* 2007; 53: 8-13.
15. Kibar Y, Seckin B, Erduran D: The effects of subinguinal varicocelectomy on Kruger morphology and semen parameters. *J Urol* 2002; 168: 1071-1074.
16. Chen CH, Lee SS, Chen DC, et al: Apoptosis and kinematics of ejaculated spermatozoa in patients with varicocele. *J Androl* 2004; 25: 348-353.
17. Benoff S, Barcia M, Hurley IR, et al: Classification of male factor infertility relevant to in-vitro fertilization insemination strategies using mannose ligands, acrosome status and anti-cytoskeletal antibodies. *Hum Reprod* 1996; 11: 1905-1918.
18. Santos JRF, Neves PA: Capacitação e reação acrossômica, in Rodrigues Netto Jr N, Neves PA (Eds): Infertilidade Masculina. São Paulo, Atheneu, 2002, pp 45-48.
19. Hershlag A, Scholl GM, Jacob A, et al: Mannose ligand receptor assay as a test to predict fertilization in vitro: a prospective study. *Fertil Steril* 1998; 70: 482-491.
20. Benoff S, Hurley IR, Mandel FS, et al: Induction of the human sperm acrosome reaction with mannose-containing neoglycoprotein ligands. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 827-837.

21. Cardona-Maya WD, Cadavid AP: [Evaluation of the role of the monosaccharides, mannose and N-acetylglucosamine in the induction of the acrosome reaction in human spermatozoa]. *Actas Urol Esp* 2005; 29: 676-684.
22. Liu DY, Garrett C, Baker HW: Acrosome-reacted human sperm in insemination medium do not bind to the zona pellucida of human oocytes. *Int J Androl* 2006; 29: 475-481.
23. Rosano G, Caille AM, Gallardo-Ríos M, et al: D-Mannose-binding sites are putative sperm determinants of human oocyte recognition and fertilization. *Reprod Biomed Online* 2007; 15: 182-190.
24. Meng MV, Greene KL, Turek PJ: Surgery or assisted reproduction? A decision analysis of treatment costs in male infertility. *J Urol* 2005; 174: 1926-1931.
25. Ficarra V, Cerruto MA, Liguori G, et al: Treatment of varicocele in subfertile men: The Cochrane Review – a contrary opinion. *Eur Urol* 2006; 49: 258-263.
26. Evers JL, Collins JA. Assessment of efficacy of varicocele repair for male subfertility: a systematic review. *Lancet* 2003; 361: 1849-1852.
27. Male Infertility Best Practice Policy Committee of the American Urological Association; Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine: Report on varicocele and infertility. *Fertil Steril* 2004; 82 Suppl 1: S142-145.
28. Ishikawa T, Kondo Y, Yamaguchi K, et al: Effect of varicoelectomy on patients with unobstructive azoospermia and severe oligospermia. *BJU Int* 2008; 101: 216-218.
29. Pasqualotto FF, Pasqualoto EB. Novidades na fisiopatologia e tratamento do homem infértil com varicocele e sua relação com reprodução assistida. *Femina* 2006; 34: 183-188.
30. Marmar JL, Benoff S: Varicoceles. *J Urol* 2006; 175: 818-819.

Table 1: Macroscopic and microscopic semen analyses and evaluation post swim-up, according to the studied groups.

Criteria	Groups				p-value
	Varicocele (N=30)		Fertile (N=30)		
1 Liquefaction (%)					0.4257
Normal	56.7		66.7		
incomplete	43.3		33.3		
2 Viscosity (%)					0.0098
normal	66.7		93.3		
increased	33.3		6.7		
3 Color (%)					0.0011
opalescent white	50.0		73.3		
yellowish white	0.0		13.3		
translucent white	36.7		3.3		
translucent yellow	13.3		10.0		
	Mean	SD	Mean	SD	
4 Volume (ml)	3.0	1.4	2.8	1.5	0.5222
5 pH	7.8	0.0	7.8	0.0	
6 Motility Grades (%)					
A	6.3	6.1	17.6	7.7	<0.0001
B	26.3	13.2	30.4	6.4	0.2427
(A+B)	32.6	15.7	48.0	8.8	<0.0001
7 Vitality (%)	61.0	19.4	74.7	8.3	0.0035
8 Sperm concentration x 10 ⁶ /ml	29.0	37.0	61.7	43.3	0.006
9 Kruger's strict morphology (%)	7.5	2.8	13.5	1.1	<0.0001
10 Leukocytes x 10 ⁶	0.0	0.2	0.3	0.4	0.0142
11 Swelling test (%)	56.7	15.9	68.8	5.5	0.0005
Following Swim-up					
12 Sperm concentration x 10 ⁶ /ml	11.7	27	23.5	16.8	<0.0001
13 Motility Grades (%)					
A	38.6	37.9	63.9	18.8	0.0123
B	35.2	35.5	35.3	18.5	0.5019
(A+B)	73.8	42.8	99.2	2.0	0.0623
1,3-5 Fisher's exact test	2 Chi-square test	6-13 Mann-Whitney test			

Table 2: Patters of mannose–binding site expression with intact acrosome evaluated at both time-points (0 and 1hour).

Groups	Patters of Expression	%
Pattern 1		
Varicocele	Spotty pattern on the head	21.1
Fertile	Uniform pattern on the mid-piece	25.5
Pattern 2		
Varicocele	Uniform pattern on the mid-piece	13.1
Fertile	Contourn of the head	19.5
Pattern 3		
Varicocele	Uniform pattern on the equatorial region	10.6
Fertile	Uniform pattern on the head	10.0
Pattern 4		
Varicocele	Uniform patter on the head	9.8
Fertile	Union pattern on the equatorial region	5.8
Others		
Varicocele		45.4
Fertile		39.2

Table 3: Analysis of acrosomal status irrespective of the occurrence of D-mannose receptors, separately in each group of men studied, at the two time-points (0 and 1 hour)

Evaluation	ACROSOMAL STATUS	
	Reacted p-value	Intact p-value
Effect per group studied	0.9261	0.9261
Effect at each time-point	0.5226	0.5226

Friedman's repeated analyses of variance.

Table 4: Comparison between the studied groups with respect to sperm behavior according D-mannose receptors and acrosomal status and time points.

Time-point	Receptors	<i>Acrossomal status</i>	Varicocele (N = 30)		Groups Fertile (N = 30)		p-value
			MEAN	SD	MEAN	SD	
0h	Without mannose	reacted	47.0	17.5	35.4	12.9	0.0161
		intact	44.8	21.1	46.5	15.9	0.7967
	With mannose	reacted	7.2	8.5	13.6	7.1	0.0013
		intact	0.8	1.3	4.4	2.9	<0.0001
1h	Without mannose	reacted	47.3	23.7	34.2	13.6	0.0179
		intact	47.3	23.1	44.5	19.8	0.445
	With mannose	reacted	4.6	7.1	14.6	10.1	<0.0001
		intact	0.6	1.7	6.5	6.1	<0.0001

Mann-Whitney test

Groups		
Patterns	Varicocele	Fertile
1		
2		
3		
4		

Figure 1: D-mannose expression patterns observed in the studied groups.

5. Conclusões

Comparando as amostras dos homens inférteis com varicocele com amostras de homens férteis sem varicocele (controle), concluímos que:

- Houve diferença estatisticamente significativa nos parâmetros macroscópicos (cor e viscosidade) e microscópicos (concentração espermática, motilidades graus A+B, morfologia estrita de Kruger, teste de vitalidade e teste hiposmótico).
- Após processamento espermático através de seleção por técnica de capacitação *swim-up*, houve recuperação de espermatozóides na amostra seminal dos homens com varicocele, porém com menor concentração espermática e menor porcentagem de grau A na motilidade.
- Os tipos de marcação dos receptores de D-manose mais freqüentes nos espermatozóides com acrossoma íntegro de homens inférteis com varicocele foram:
 - Padrão 1: Cabeça manchada (21,1%),
 - Padrão 2: peça intermediária preenchida (13,1%),

- Padrão 3: região equatorial preenchida (10,6%) ,
- Padrão 4: cabeça preenchida (9,8%),
- outras marcações (45,4%)

Os tipos de marcação observados nos espermatozóides dos homens férteis foram:

- Padrão 1: peça intermediária preenchida (25,5%)
- Padrão 2: contorno da cabeça (19,5%)
- Padrão 3: cabeça preenchida (10,0%)
- Padrão 4: região equatorial preenchida (5,8%). Outras marcações (39,2%)

Portanto, as amostras de pacientes inférteis com varicocele apresentaram padrões de expressão para D-manose diferentes dos pacientes férteis em relação à frequência dos sítios receptores marcados.

- Houve diferença estatística no status acrossomal íntegro e reagido independente da ligação de D-manose e do tempo de observação, mostrando uma perda da capacidade funcional dos espermatozóides em homens inférteis.

6. Referências Bibliográficas

Abdelmassih R. Estudo do fator masculino. In: Scheffer BB, RemohiJ, García-Velasco J, Pellicer A, Simón C. Reprodução humana assistida. 10 ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2003. p.41-58.

Agger P. Scrotal and testicular temperature: its relation to sper count before and after operation for varicocele. Fertil Steril 1971; 22:286-8.

Aitken RJ. Sperm function tests and fertility. Int J Androl 2006; 29:69-75.

Aranha FL. Bioquímica dos carboidratos (Glucides). In: Aranha FL. Bioquímica didática. 10 ed., Campinas: Editora Copola Livros Ltda; 1998. p.81

Austin CR. The “capacitation” of the mamalian sperm. Nature 1952; 170:236-331.

Austin CR. Fertilization. In: Austin CR, Short RV. Reproduction in mamals. Book1. – Germ cells and fertilization. London.: Cambridge University Press; 1972. p.103-13.

Bahamondes L, Makuch YM. Aspectos epidemiológicos da infertilidade conjugal. In: Rodrigues Netto Jr N, Neves PA. Infertilidade masculina, 1º ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2002. p.29-32.

Benoff S, Cooper GW, Hurley I, Napolitano B, Rosenfeld DL, Scholl GM et al. Human sperm fertilizing potencial in vitro is correlated with differential expression of a head-specific mannose – ligand receptor. Fertil Steril 1993; 59:854-62.

Canales BK, Zapzalka DM, Ercole CJ, Carey P, Haus E, Aeppli D , et al. Prevalence and effect of varicoceles in an elderly population. Urol 2005; 66:627-31.

Cockett ATK, Al-juburi A, Alterbarmakian V, Vergamini RF, Caldamone AA. The varicocele: new experimental and clinical data. Urol 1980; 5: 492.

Dubin L, Amelar RD. Etiologic factors in 1294 consecutive cases of male infertility. Fertil Steril, 22:469, 1971.

Eliasson R. Supravital staining of human spermatozoa. Fertil Steril 1977; 28:1257.

Fisher LM, Sandlow JI. The role of varicocele treatment in the era of assisted reproductive technology. International Braz J Urol, 2001;27:19-25.

Flesch FM, Gadella MB. Dynamics of the mammalian sperm plasma membrane in the process of fertilization. Bioch Biophys Acta 2000;1469:197-235.

Gamzu R, Yougev L, Amnon B, Kleiman S, Hauser R. The expression of mannose-ligand receptor is correlated with sperm morphology. Arch Androl 2002; 48:475-80.

Gentile DP, Cockett ATK. Varicocelectomy: effect on fertility. Temperature and environmental effects on the testis. New York: AW Zorngiotti, Plenum Press; 1991.

Glina S, Antunes Jr N. Inseminação intra-uterina no fator masculino. In: Rodrigues Netto Jr N, Neves PA. Infertilidade masculina, 1º ed. São Paulo: Ed.Atheneu; 2002. p.183-5.

Hershlag A, Scholl GM, Jacob A, Mandel FS, Guhring P, Terry-Paine BS, et al. Mannose ligand receptor assay as a test to predict fertilization in vitro: a prospective study. Fertil Steril 1998; 70: 482-91.

Jarow JP, Sharlip ID; Belker AM, Lipshultz LI, Sigman M, Thomas AJ et al., Best practice policies for male infertility. Journal of Urol 2002; 167: 2138-44.

Jeyendran RS, Van Der Ven HH, Perez-Pelaez M, Crabo BG, Zaneveld LJ. Development of an assay to assess the functional integrity of the human sperm membrane and its relationship to other semen characteristics". J Rep Fert 1984; 70:219-28.

Kamal KM, Javeri K, Zini A. Microsurgical varicocelelectomy in the era of assisted reproductive technology: influence of initial semen quality on pregnancy rates. Fertil Steril 2001; 75:1013-6.

Kay R, Alexander NJ, Baugham, WL. Induced varicoceles in Rhesus monkeys. Fertil Steril 1979; 31:195.

Kibar Y, Seckin B, Erduran D. The effects of subinguinal varicocelelectomy on Kruger morphology and semen parameters. Journal of Urol 2002; 168:1071-4.

Kruger TF, Menkeveld R, Stander FSH, Van Der Merve JP, Vanzyl JA. Sperm morphologic features as a prognostic factor *in vitro* fertilization. Fertil Steril 1986; 46:1118-23.

MacLoad J. Seminal etiology in the presence of varicoceles. Fertil Steril 1965;16:735.

Marinelli CM, Borges Jr E, Antunes Jr N. Reprodução assistida e infertilidade masculina. In: Borges Jr E, Hallak J, Torres LO (coord. e edit.) International Braz J Urol 2003;29:24-7.

Monesi V. Spermatogenesis and the spermatozoa. In: Austin CR, Short RV (eds). Reproduction in mammals. Book 1. Germ cells and fertilization. London: Cambridge University Press; 1972. p.46-62.

Moore KL, Persaud TVN. Embriologia clínica. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. p.15-43.

Mori K, Daitoh T, Irahara M, Kamada M, Aono T. Significance of D-mannose as a sperm receptor site on the zona pellucida in human fertilization. *Am J Obstet Gynecol* 1989;161:207-11.

Mortimer D, Curtis EF, Dravland JE. The use of strontium-substituted media for capacitating human spermatozoa: an improved sperm preparation method for the zona-free: an improved sperm preparation method for the zona-free hamster egg penetration test. *Fertil Steril* 1986; 46(1):97-103.

Moss J, Faundes D, Kopf GS, Schults RM. Composition of the human zona pellucida and modifications following fertilization. *Human Reprod* 1995;10:2467-71.

Nahoum CRD, Cardozo D. Staining for volumetric count of leucocytes in semen and prostate-vesicular fluid. *Fertil Steril* 1980; 34: 68-9.

Neves PA, Luiz FAB, Fazano FAT, Lucio MA, Burmeister MLMB. Relação entre os parâmetros do espermograma e a recuperação dos espermatozoides pela técnica de “swim-up”. *J Bras Urol* 1990; 16:33-6.

Neves PA. Impacto das técnicas de reprodução assistida no tratamento da infertilidade masculina [Tese de doutorado]. Campinas (SP): Faculdade de Ciências Médicas – Universidade Estadual de Campinas; 1995.

Neves PA. Micromanipulação de gametas. In:Rodrigues Netto Jr N, Neves PA. Infertilidade masculina, 1º ed. São Paulo: Ed.Atheneu; 2002. 211-16.

Ng S-C, Bongso A, Ratnam SS, Sathananthan H, Chan CL, Wong PC, et al. . Pregnancy after transfer of sperm under zona. *Lancet* 1988; 11(8164):790.

Orejuela FJ, Moreira Jr SG, Lipshultz LI. Varicocele. In: Rodrigues Netto Jr N, Neves PA. Infertilidade Masculina, 1º ed. São Paulo: Editora Atheneu; 2002. p. 113-22.

Palomo A. Radical cure of varicocele by new technique: preliminary report. J Urol 1949, 61: 604- 7

Pasqualotto FF, Lucon AM, Góes PM, Sobreiro BP, Hallak J, Pasqualoto EB; et al. Semen profile, testicular volume, and hormonal levels in infertile patients with varicoceles compared with fertile men with and without varicoceles. Fertil Steril 2005; 83:74-7.

Pompeu ACL, Errico G, Martello R. Varicocele. In: Borges Jr E, Hallak J, Torres LO (coord. e edit.) International Braz J Urol 2003;29:24-7.

Redmon JB, Carey P, Pryor JL. Varicocele - the most common cause of male factor infertility. Hum Reprod Update 2002; 8:53-8

Rogers BJ, Bentwood BJ. Capacitation acrosome reaction and fertilization. In: Zaneveld LDJ, Chatterton RT. Biochemistry of mamalian reproduction. New York: John Wiley & Sons;1982. p.230-7.

Santos JRF, Neves PA. Capacitação e reação acrossômica. In: Rodrigues Netto Jr N, Neves PA. Infertilidade masculina, 1o ed. São Paulo: Ed. Atheneu; 2002.p. 45-8.

Shilds, FE. Artificial insemination as related to female. Fertil Steril 1950; 1:271-4.

Silveira CF, Neves PA, Fazano FAT, Lucio MA, Moraes SS. Patterns of expression of d-mannose receptors in spermatozoa of fertile men. J Brasileiro Reprod Assist 2004; 8: 9-13.

Silveira-Barbetti CF. Manual de procedimentos operacionais padrão de laboratório de reprodução humana assistida.2ª.ed. Campinas: Laproferti, 2007.115p.

Steptoe PC, Edwards RG. Birth after reimplantation of a human embryo. Lancet 1978; 2(8085):366.

Tesarik J, Mendoza C, Carreras A. Expression of D-mannose binding sites on human spermatozoa: comparison of fertile donors and infertile patients. *Fertil Steril* 1991;56:113-8.

Tulloch WS. Varicocele in subfertility, results of treatment. *Br Med J* 1955; 2(4935): 356-8

Turner TT. Varicocele: still an enigma. *J Urol* 1983;129: 695.

Van Kooij RJ. Fertilization/Practice. In: Bras M, Lens JW, Piederietm H, Rijnders PM, Verveld M, Zeilmaker GH. IVF LAB.- Laboratory aspects of in-vitro fertilization. NV Organon;1996. p.147-64.

Veeck LL. An atlas of human gametes and conceptuses: an illustrated reference for assisted reproductive technology. New York: The Parthenon Publishing Group; 1998.

WHO. World Health Organization. Scientific group on the epidemiology of infertility. WHO: Tech Rep Ser, 1975. 582p.

WHO. World Health Organization. The influence of varicocele on parameters of fertility in a large group of men presenting to infertility clinics. *Fertil Steril* 1992; 57:1289-93.

WHO..World Health Organization. Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction,4th ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press,1999.

Yanagimachi R. Capacitation. Mastroianni L, Biggers JD. Fertilization and embryonic development in vitro. New York: Plenum Press;1981. p.81-112.

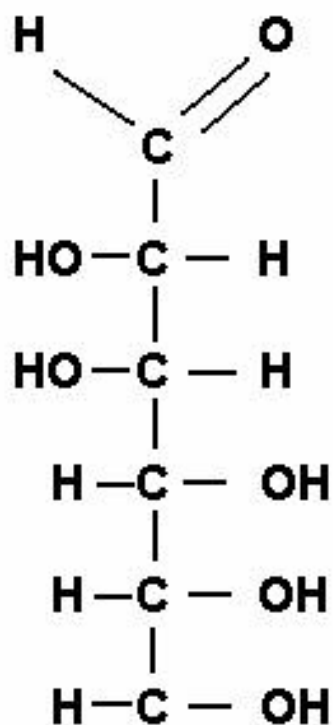
Youssef HM, Doncel GF, Bassiouni BA, Acosta AA. Manose binding sites on human spermatozoa and sperm morphology. *Fertil Steril* 1996; 66: 640-5.

7. Anexos

7.1. Anexo 1 – Tabela de Referência da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1999)

CRITÉRIOS	PADRÃO DE NORMALIDADE
Liquefação	Completa
Viscosidade	Normal
Volume	Entre 2 e 5 mililitros
pH	Entre 7,2 – 7,8
cor	Branco opalescente
Motilidade	? 50% de graus A+B
Vitalidade	? 50% de formas vivas
Concentração	? $20,0 \times 10^6$ por mililitro de sêmen
Morfologia Estrita de Kruger	? 14% de formas normais
Leucócitos	? $1,0 \times 10^6$ por mililitro de sêmen
Hiposmótico	? 60% de formas inchadas

**7.2. Anexo 2 – Estrutura molecular da D-manose proposta por Fisher
(adaptado de Aranha,1998)**



7.3. Anexo 3 – Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, paciente do Ambulatório de Urologia/Andrologia do Hospital das Clínicas – UNICAMP fui informado sobre a realização da pesquisa “Determinação do padrão de expressão de receptores de D-manose em espermatozoides de homens férteis” cujo objetivo é melhorar o conhecimento científico sobre a infertilidade masculina.

Concordo em participar voluntariamente desta pesquisa sabendo que não receberei nenhum benefício pessoal, comparecendo primeiramente ao Ambulatório de Urologia do HC - UNICAMP onde será realizado um exame clínico pelos Drs. Paulo A. Neves e Marcelo Vieira antes da minha cirurgia de vasectomia () varicocelectomia(). Realizado este exame, comprometo-me a comparecer em data previamente agendada no Laboratório de Reprodução Humana – CAISM – UNICAMP tendo mantido abstinência sexual (sem ocorrência de ejaculação) por no mínimo dois e no máximo cinco dias, para coletar, por masturbação, amostra de sêmen. Esta amostra terá a finalidade única e exclusiva de atingir o objetivo desta pesquisa, sendo a mesma descartada após a realização das análises de rotina (espermograma) e dos testes propostos no estudo (D-manose e reação acrossômica). Caso seja encontrado qualquer tipo de alteração durante exame clínico ou no espermograma serei notificado.

Fui informado e estou ciente dos possíveis desconfortos, riscos e benefícios que o exame clínico e a coleta da amostra de sêmen podem acarretar.

Os ambulatórios do HC- UNICAMP não deixarão de atender-me caso eu desista de participar deste estudo, respeitando os meus direitos como voluntário de acordo com a declaração de Helsink-II e da resolução 196/96 do CONEP.

Estou ciente de que serei compensado dos custos de transporte como também receberei um comprovante de comparecimento do LRH para que eu possa apresentar em meu trabalho, após a coleta da amostra de sêmen.

Todos os pesquisadores envolvidos neste estudo comprometem-se a esclarecer qualquer dúvida que eu tiver sobre o mesmo, como também garantem o total sigilo, assegurando a privacidade dos meus dados confidenciais nesta pesquisa.

Campinas, ____ de ____ de 200 ____.

Assinatura do Voluntário

Assinatura do Investigador

Exame clínico realizado em: ____/____/____

Data da coleta: ____/____/____ **no LRHF: (19)3788-9358**

Pesquisadores Responsáveis: **Carolina Fernanda Silveira** (Bióloga e aluna da Tocogineco-LRH-CAISM) F: (19)3788-9358; **Dr. Paulo Augusto Neves** (Urologista do Amb. Andro/Uro do HC – UNICAMP) F: (19)3788-7481
Dr. Francisco A.T. Fazano (Responsável pelo LRH – CAISM-UNICAMP) F: (19)3788-9358.
FCM – Comitê de Ética em Pesquisa – UNICAMP – F: (19)3788-8936

7.4. Anexo 4 – Carta de Aprovação do CEP



CEP, 18/09/01
(Grupo III)

FACULDADE DE CIÊNCIAS MÉDICAS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
✉ Caixa Postal 6111
13083-970 Campinas-S.P.
☎ 0 19 37888936
fax 0 19 37888925
✉ cep@head.fcm.unicamp.br

PARECER PROJETO: Nº 170/2001

I-IDENTIFICAÇÃO:

PROJETO: “DETERMINAÇÃO DO PADRÃO DE D-MANOSE EM HOMENS COM VARICOCELE”

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Carolina Fernanda Silveira

INSTITUIÇÃO: Departamento de Cirurgia/FCM/UNICAMP

APRESENTAÇÃO AO CEP: 03/08/2001

II - OBJETIVOS

Avaliar os receptores de D-manose em homens férteis e homens inférteis com varicocele.

Determinar padrões para o teste de receptores de D-manose para homens férteis e homens inférteis com varicocele

Verificar se os padrões (visuais e numéricos) determinados para homens férteis são próximos aos padrões internacionais, propostos em estudos anteriores por BENOFF et.al., (1993).

Comparar os padrões do teste D-manose observados entre homens férteis e homens com varicocele em relação ao aumento ou não do número de espermatozoides ligados a D-manose após um período de incubação.

III - SUMÁRIO

O projeto relata que não se conhece o real papel da varicocele sobre a fertilidade e quais homens se beneficiariam da correção cirúrgica dessa patologia. Coloca que alguns trabalhos relacionam a presença da varicocele com a infertilidade masculina, porém outros trabalhos afirmam que homens portadores de varicocele, podem gerar filhos naturalmente mesmo apresentando um espermograma deficiente. Inúmeros aspectos fisiológicos dos espermatozoides têm sido pesquisados na presença da varicocele na tentativa de determinar qual alteração funcional pode estar presente. A pesquisadora procurará elucidar estas dúvidas e hipóteses que surgiram a partir desta indagação, realizando o presente estudo, onde pretende realizar o teste de D-manose em espermatozoides de homens férteis e de homens portadores de varicocele. O teste, segundo o projeto, permite visualizar em quais regiões do espermatozoide há receptores preenchidos com um carboidrato conhecido como

D-manose, sendo esta encontrada em alta concentração na superfície dos óvulos. Estes receptores são importantes para que os espermatozoides liguem-se aos óvulos. A determinação do padrão D-manose entre sujeitos objetos da pesquisa, terá como objetivo avaliar possíveis alterações entre esses dois grupos, procurando-se determinar uma possível alteração funcional associada à varicocele.

A amostra do estudo serão de 40 homens férteis (Grupo Controle) do Programa de Vasectomia e 40 homens inférteis portadores de varicocele do Ambulatório de Infertilidade Masculina. Cada sujeito colherá uma amostra de sêmen, através de masturbação (sem ocorrência de ejaculação), em frasco estéril de plástico, após três dias de abstinência sexual. Serão feitas análises macroscópicas e microscópicas.

O estudo terá como hipótese de que a presença de varicocele pode de forma alguma impedir que os espermatozoides apresentem seus receptores para o D-manose, presente na superfície dos óvulos, impedindo a fertilização, também é verificar se os indivíduos férteis estudados apresentam o mesmo padrão visual e numérico proposto por BENOFF et.al., (1993).

IV - COMENTÁRIOS DOS RELATORES

O projeto está bem elaborado, com objetivos, hipótese, metodologia bem fundamentado.

Não utilizará nenhum tipo de medicamento.

Trará benefícios aos homens inférteis se sua hipótese for confirmada, trazendo novos conhecimentos para a equipe no tratamento desta população.

O Termo de Consentimento está de fácil entendimento para os sujeitos da pesquisa.
PROJETO APROVADO

V - PARECER DO CEP

O Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP, após acatar os pareceres dos membros-relatores previamente designados para o presente caso e atendendo todos os dispositivos das Resoluções 196/96 e 251/97, bem como ter aprovado o Termo do Consentimento Livre e Esclarecido, assim como todos os anexos incluídos na Pesquisa, resolve aprovar sem restrições o Protocolo de Pesquisa supracitado.

VI - INFORMAÇÕES COMPLEMENTARES

O sujeito da pesquisa tem a liberdade de recusar-se a participar ou de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado (Res. CNS 196/96 – Item IV.1.f) e deve receber uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, na íntegra, por ele assinado (Item IV.2.d).

Pesquisador deve desenvolver a pesquisa conforme delineada no protocolo aprovado e descontinuar o estudo somente após análise das razões da descontinuidade pelo CEP que aprovou (Res. CNS Item III.1.z), exceto quando perceber risco ou dano não

previsto ao sujeito participante ou quando constatar a superioridade de regime oferecido a um dos grupos de pesquisa (Item V.3.).

O CEP deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (Res. CNS Item V.4.). É papel do pesquisador assegurar medidas imediatas adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e enviar notificação ao CEP e à Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA – junto com seu posicionamento.

Eventuais modificações ou emendas ao protocolo devem ser apresentadas ao CEP de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas. Em caso de projeto do Grupo I ou II apresentados anteriormente à ANVISA, o pesquisador ou patrocinador deve enviá-las também à mesma junto com o parecer aprovatório do CEP, para serem juntadas ao protocolo inicial (Res. 251/97, Item III.2.e)

Relatório final deve ser apresentado ao CEP, ao término do estudo.

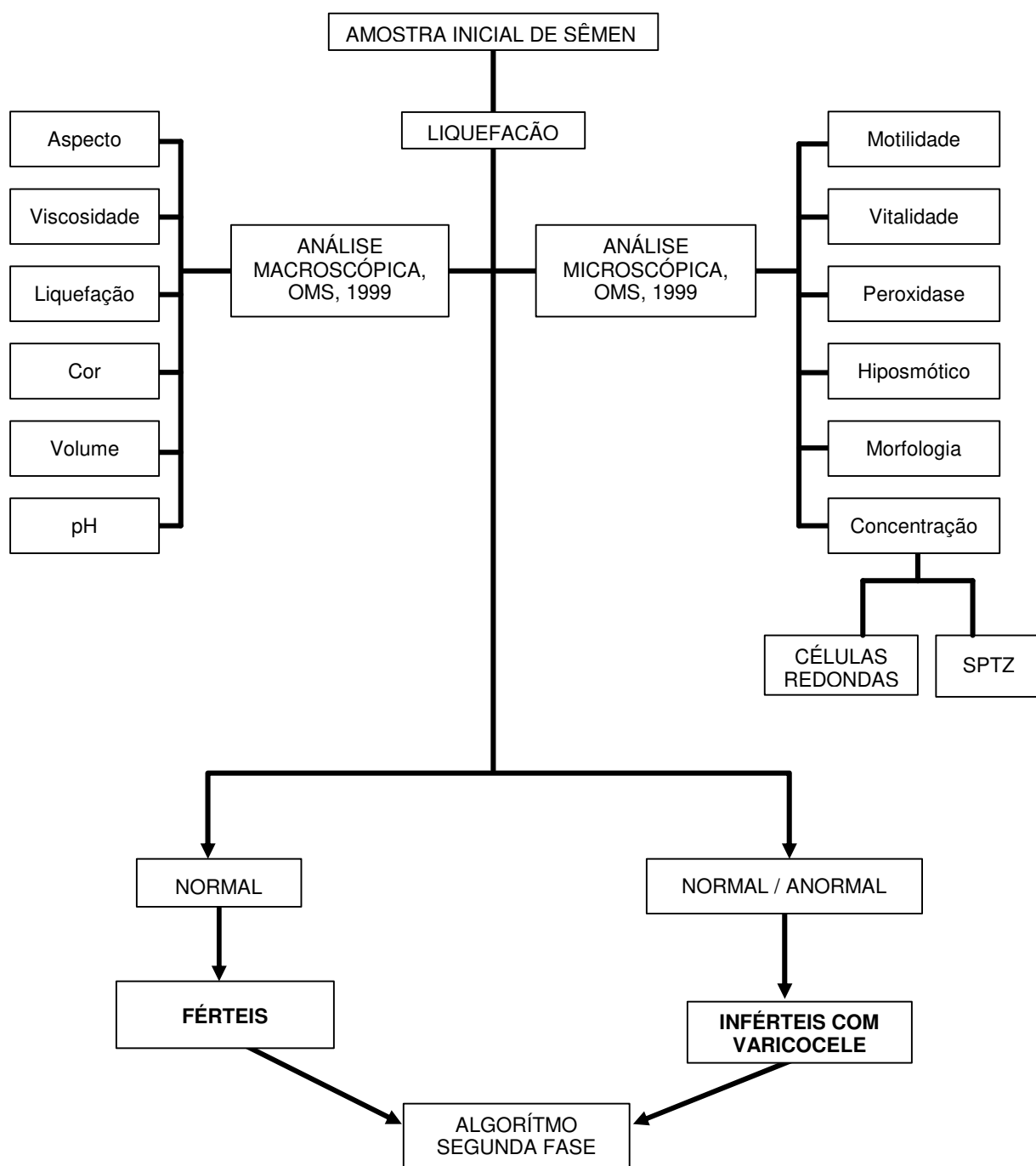
VII - DATA DA REUNIÃO

Homologado na IX Reunião Ordinária do CEP/FCM, em 18 de setembro de 2001.

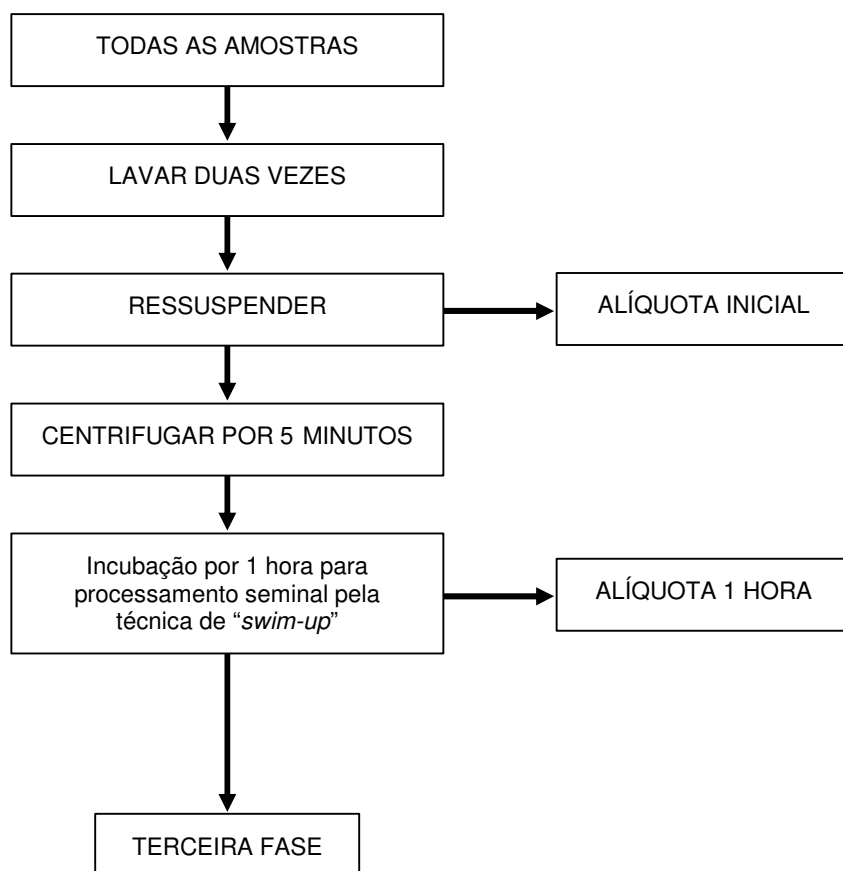
Prof. Dr. Sebastião Araújo
PRESIDENTE do COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FCM / UNICAMP

7.5. Anexo 5 – Algoritmo

ALGORITMO: PRIMEIRA FASE



ALGORITMO: SEGUNDA FASE



ALGORITMO: TERCEIRA FASE

