UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

JORGE VICTOR WILFREDO CACHAY WESTER

**Caracterização molecular e classificação funcional de novos padrões de
expressão génica e de RNA não codificadores no tecido testicular de homens
com infertilidade genética ou idiopática**

Ribeirão Preto - SP

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA

Caracterização molecular e classificação funcional de novos padrões de expressão génica e de RNA não codificadores no tecido testicular de homens com infertilidade genética ou idiopática

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. João Monteiro de Pina Neto

Ribeirão Preto - SP

2021

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRONICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA DESDE QUE CITADA A FONTE.

Cachay Wester, Jorge Victor Wilfredo

Caracterização molecular e classificação funcional de novos padrões de expressão gênica e de RNA não codificadores no tecido testicular de homens com infertilidade genética ou idiopática. Ribeirão Preto, 2021.

222 p. : il. ; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Genética.

Orientador: Prof. Dr. João Monteiro de Pina Neto

1. MicroRNA. 2. microRNA. 3. RNA mensageiro. 4. Transcriptoma.
5. FFPE

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cachay Wester, Jorge Victor Wilfredo.

Caracterização molecular e classificação funcional de novos padrões de expressão gênica e de RNA não codificadores no tecido testicular de homens com infertilidade genética ou idiopática.

Tese de Doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Genética

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Humana e Médica, localizado no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMPR) – USP com o apoio financeiro das seguintes instituições:

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA).

Fondo Nacional de Desarrollo Científico, Tecnológico y de Innovación Tecnológica (Fondecyt) del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación Tecnológica (CONCYTEC) de la República del Perú. Processo número 093-2016-FONDECYT-DE.

Dedico este trabalho

Ao meu filho Jorge Martin, a manifestação do amor e que com um sorriso alivia cada dia de trabalho.

À luz da minha vida, María Teresa quem me ensinou que todo o amor sempre é correspondido.

À minha mãe Irma, pelo amor incondicional e pelo esforço de todos estes anos longe de casa.

Ao meu pai Jose, que cuidou de nós com amor antes de partir ao encontro com o pai.

AGRADECIMENTOS

Às famílias que participaram do estudo.

Agradeço principalmente ao meu orientador Prof. Dr. João Monteiro de Pina Neto, pela orientação, paciência, amizade e dedicação durante estes 4 anos de trabalho.

Ao Professor Dr. Alfredo Ribeiro Silva chefe do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP, pela amizade, confiança e pelo apoio incondicional durante o trabalho.

A Profa. Dra. Rita de Cassia Viu Carrara e ao Dr. Rafael Bisnella pelos conhecimentos e apoio com o material biológico utilizado no presente trabalho.

A Dra. Kamila Chagas Peronni Sueli pela orientação, amizade e excelente apoio na realização dos experimentos de expressão gênica do presente trabalho.

Ao Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Ao Programa de Pós-Graduação em Genética da FMRP.

Ao Setor de Genética Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Ao Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP.

Ao Serviço de Patologia (SERPAT) do Hospital das Clínicas da FMRP.

Ao Centro de Medicina Genômica do Hospital das Clínicas da FMRP.

À Susie, secretária do Programa Pós-Graduação em Genética da FMRP.

À Daniela e a Marcia Aparecida Ferreira pela amizade e apoio técnico no laboratório.

Ao Fondo Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación Tecnológica del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología e Innovación Tecnológica (Fondecyt-Concytec) do Perú pelo apoio financeiro sob processo número: 093-2016 FONDECYT-DE.

À CAPES, o presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

WESTER, J.V.W.C. **Caracterização molecular e classificação funcional de novos padrões de expressão gênica e de RNA não codificadores no tecido testicular de homens com infertilidade genética ou idiopática.** 2021. 222f. Tese (Doutorado). Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Genética, 2021.

A infertilidade masculina é uma condição patológica com causas genéticas, não genética, multifatoriais e idiopáticas que resultam em fenótipos heterogêneos diversos, observados principalmente no ejaculado e no tecido testicular. O objetivo do presente trabalho foi identificar os processos biológicos e vias gênicas desregulados na infertilidade masculina primária causada por diversas etiologias utilizando a detecção e quantificação de moléculas de RNA no tecido testicular de homens inférteis. Para isto, selecionamos tecido parafinizado e biópsia fresca de testículo de homens inférteis. As amostras foram classificadas de acordo ao fenótipo obtido do espermograma, do tipo de histologia e da etiologia. O transcriptoma das amostras parafinizadas foi obtido mediante experimentos de RNA-seq e small RNA-seq, enquanto que o transcriptoma das amostras de biópsia fresca foi obtido mediante experimentos de expressão gênica por microarranjos. A quantificação e classificação dos RNAs foram obtidas mediante a análise de Bioinformática dos dados genômicos. A quantificação de alguns genes foi validada por experimentos de RT-qPCR. Os resultados mostraram padrões de expressão gênica diferentes entre as etiologias da infertilidade masculina primária, observamos que os idiopáticos com SCOS (síndrome de célula de Sertoli) têm alteração na adesão celular. Os idiopáticos com MA (parada de maturação) têm falha na morfogênese celular. A síndrome de Klinefelter apresentou alteração no processo de *splicing*. As microdeleções na região AZF geram a perda de genes associados ao catabolismo e a translocação robertsoniana tem perda da expressão de genes sub centroméricos. Outrossim, identificamos novos processos biológicos associados a disfunção da espermatogênese pela variação na expressão de microRNA em SCOS idiopáticos. O transcriptoma das biópsias frescas revelou a desregulação de vias gênicas e RNAs não codificadores da espermatogênese. Finalmente, nós concluímos que a variação dos padrões de expressão gênica assim como a hierarquia dos processos biológicos alterados ocorre de forma independente da etiologia da infertilidade masculina primária.

Palavras chave: Infertilidade masculina, MicroRNA, RNA mensageiro, Transcriptoma, FFPE.

ABSTRACT

WESTER, J.V.W.C. **Molecular characterization and functional classification of new patterns of gene and non-coding RNA expression in testicular tissue of men with genetic or idiopathic infertility.** 2021. 222f. Thesis (Doctoral). Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de Concentração: Genética, 2021.

Male infertility is pathological condition with genetics, multifactorial and idiopathic causes that result in heterogeneous phenotypes which are observed in the ejaculated and the testicular tissue. In this study, we sought to identify the molecular mechanisms that are dysregulated in primary male infertility caused by the different etiologies using detection and quantification of RNA molecules in testicular tissue of infertile man. We used Formalin Fixed Paraffin Embedded (FFPE) and fresh frozen samples. Samples were classified by the phenotype obtained with the spermogram, histology and etiology. FFPE transcriptomes were obtained by RNA-seq and small RNA-seq experiments and FF transcriptomes were obtained by gene expression microarrays. RNA quantification and classification were obtained by Bioinformatics analysis of genomic data. Some genes were validated by RT-qPCR experiments. Results showed different patterns of gene expression for each etiology such as genes for cellular adhesion in idiopathic Sertoli cell-only syndrome (SCOS). In addition we detected differential expression in cellular morphogenesis of idiopathic maturation arrest (MA). Klinefelter syndrome had altered gene for RNA splicing and AZF microdeletions can lead the loss of gene expression in catabolic process and Robertsonian translocation had loss of sub centromeric genes. Otherwise, we tested microRNA expression and we identified novel biological process associated to spermatogenesis fail in idiopathic SCOS. Transcriptome of FF samples showed a dysregulation of genetic pathways and non-coding RNAs of spermatogenesis. Finally, we concluded that patterns of expression in primary male infertility as well as the modification of biological process occurs according to the etiology.

Key-words: Male infertility, MicroRNA, messenger RNA, Transcriptome, FFPE.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da classificação fenotípica da infertilidade masculina pela quantidade de espermatozoides observados no ejaculado e sua associação com a frequência das alterações genéticas.	25
Figura 2. Classificação histológica da infertilidade masculina primaria observada em biópsia de testículo humano.	27
Figura 3. Alterações numéricas e estruturais nos cromossomos sexuais detectados no cariótipo de homens inférteis.....	29
Figura 4. Microdeleções na região AZF do cromossomo Y e sua correlação com o fenótipo de infertilidade masculina.	32
Figura 5. Mutações monogênicas que resultam em infertilidade masculina prê-testicular, testicular e pós-testicular.	35
Figura 6. Mutações monogênicas na infertilidade primaria que resultam em falha da espermatogênese em diferentes estádios do desenvolvimento das células germinativas.....	37
Figura 7. Identificação molecular dos genes envolvidos no desenvolvimento das células germinativas utilizando a metodologia de sequenciamento de segunda geração para detecção de RNA mensageiro (RNA-seq).....	44
Figura 8. Localização da expressão de microRNA nos diversos tipos celulares encontrados no tecido testicular.	53
Figura 9. Esquema de trabalho com biópsias de testículo parafinizadas. QC: controle de qualidade.....	62
Figura 10. Esquema de trabalho com biópsias de testículo.....	63
Figura 11. Gráficos de qualidade do RNA no Bioanalyzer mostrando o valor do DV200.....	72
Figura 12. Gráficos de qualidade do RNA no Bioanalyzer mostrando o valor de DV200.....	73
Figura 13. Controle de qualidade por multiQC.....	78
Figura 14. Localização e frequência das sequências obtidas no genoma de referência GRCh38.....	80
Figura 15. Validação dos primers.....	85
Figura 16. Controle de qualidade dos arquivos fastq obtidos nos experimentos de small-RNAseq.	87
Figura 17. Percentagem de erro para todas as sequências obtidas e submetidas a análise bioinformática.....	88
Figura 18. Mapeamento e alinhamento das sequências com o genoma de referência GRCh38.....	89

Figura 19. Distribuição dos níveis de expressão detectados pelo sinal de hibridação.	95
Figura 20. Descrição dos dados clínicos.	98
Figura 21. Histologia testicular dos indivíduos com Parada na maturação de células germinativas.	99
Figura 22. Histologia testicular da síndrome de célula de Sertoli.....	100
Figura 23. Análise estatística dos valores hormonais entre os grupos patológicos estudados.	101
Figura 24. Valores totais de expressão de genes baseado no número de transcritos por milhão (TPM).	102
Figura 25. Quantificação dos níveis de expressão relativa dos genes do cromossomo Y por RT-qPCR.....	103
Figura 26. Estudo da expressão gênica obtida a través dos RNA mensageiros.	106
Figura 27. Análise de expressão gênica diferencial entre a Síndrome de Célula de Sertoli (SCOS) e azospermia obstrutiva (OA).	107
Figura 28. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos em SCOS, utilizando Gene Ontology (GO).	110
Figura 29. Classificação hierárquica dos processos biológicos obtidos com os genes <i>downregulated</i> (A) e <i>upregulated</i> (B).	111
Figura 30. Análise de expressão gênica diferencial entre a Parada na Maturação de Células Germinativas (MA) e amostras com azospermia obstrutiva (OA).	113
Figura 31. Genes diferencialmente expressos com ausência de transcritos detectados em MA.....	114
Figura 32. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos em MA, utilizando Gene Ontology (GO)..	116
Figura 33. Classificação hierárquica dos processos biológicos obtidos com os genes <i>downregulated</i> (A) e <i>upregulated</i> (B).	117
Figura 34. Análise de expressão gênica diferencial entre a Parada na Maturação de Células Germinativas (MA) e amostras com síndrome de célula de Sertoli (SCOS).	119
Figura 35. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos em MA, utilizando Gene Ontology (GO).	121
Figura 36. Análise de expressão gênica diferencial entre a síndrome de célula de Sertoli com etiologia idiopática (SCOS) e azoospermia obstrutiva.....	122
Figura 37. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos em SCOS-idiopáticos, utilizando Gene Ontology (GO).....	124

Figura 38. Análise de expressão gênica diferencial entre a Parada na Maturação de Células Germinativas com etiologia idiopática (MAidio) e amostras com azoospermia obstrutiva (OA).....	126
Figura 39. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos em MA-idiopáticos, utilizando Gene Ontology (GO).	128
Figura 40. Análise de expressão gênica diferencial entre a Síndrome de célula de Sertoli com etiologia genética por Síndrome de Klinefelter (Klinefelter) e amostras com azoospermia obstrutiva (OA).	129
Figura 41. Análise de expressão gênica diferencial entre a Síndrome de célula de Sertoli com etiologia genética por Síndrome de Klinefelter (Klinefelter) e amostras com azoospermia obstrutiva (OA)..	130
Figura 42. Análise de expressão genica diferencial dos genes específicos das células de Sertoli em indivíduos com a síndrome de Klinefelter.	131
Figura 43. Análise de expressão genica diferencial dos genes específicos das células de Leydig em indivíduos com a síndrome de Klinefelter.	131
Figura 44. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos na síndrome de Klinefelter, utilizando Gene Ontology (GO).....	133
Figura 45. Análise de expressão gênica entre a etiologia de microdeleções na região AZF (AZF) e amostras com azoospermia obstrutiva (OA).	134
Figura 46. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos em AZF, utilizando Gene Ontology (GO).	135
Figura 47. Anotação funcional dos genes <i>downregulated</i> em AZF, utilizando Gene Ontology (GO).....	136
Figura 48. Análise de expressão gênica entre a translocação robertsoniana e azoospermia obstrutiva.	137
Figura 49. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos em MA-idiopáticos, utilizando Gene Ontology (GO).	138
Figura 50. Valores de expressão gênica dos genes do cromossomo 14 utilizando o método de TPM.	140
Figura 51. Diagrama de Venn comparando as assinaturas de genes diferencialmente expressos nos grupos patológicos.....	141
Figura 52. Diagrama de Venn comparando as assinaturas de genes diferencialmente expressos nas etiologias.....	142
Figura 53. Resultados de Histopatologia, expressão de microRNA e anotação funcional. ..	143
Figura 54. Processos biológicos, vias metabólicas, doenças e rede de interação preditos para os microRNA reprimidos na condição de SCOS.....	144

Figura 55. Processos biológicos, vias metabólicas, doenças e rede de interação preditos para os microRNA induzidos na condição de SCOS.	145
Figura 56. Identificação dos microRNA e genes alvo no tecido com síndrome de célula de Sertoli.	149
Figura 57. Predição da rede de interação entre microRNA e RNA mensageiro.	149
Figura 58. Resultado de MLPA (P360-B1) do participante I11.....	151
Figura 59. Resultado de MLPA (P360-B1) do participante I05.....	151
Figura 60. Resultado de MLPA (P360-B1) do participante I07.....	152
Figura 61. Resultado de MLPA (P360-B1) do participante I16.....	152
Figura 62. Resultado de qPCR dos participantes I05 e I07.....	153
Figura 63. Mapa de calor não supervisionado mostrando 67480 transcritos diferencialmente expressos.....	154
Figura 64. Mapa de calor mostrando os RNA mensageiros diferencialmente expressos com valor de p ajustado menor de 0,01.	155
Figura 65. Mapa de calor mostrando os microRNA diferencialmente expressos com valor de p menor de 0,05.	156
Figura 66. Mapa de calor mostrando os RNA longos intergênicos diferencialmente expressos com valor de p ajustado menor de 0,05.	157
Figura 67. Processos Biológicos desregulados e especificidade celular dos genes alterado em MA.....	159
Figura 68. Genes associados aos processos biológicos desregulados em MA.....	162
Figura 69. Rede de interação entre os genes desregulados em MA.	163
Figura 70. Rede de interação entre os microRNA desregulados em MA.	164
Figura 71. Rede de interação entre os lincRNA desregulados em MA.....	165
Figura 72. Vias gênicas identificadas na infertilidade masculina primaria.....	166
Figura 73. Correlação linear dos resultados obtidos no trabalho de Dias, 2018 e no presente estudo (This study).....	174

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Classificação clínica e tipo de tratamento/procedimento na infertilidade masculina.....	24
Tabela 2. Estudos de expressão de microRNAs realizados nos últimos 20 anos no testículo/epidídimo com foco na caracterização molecular de novos marcadores da infertilidade masculina.	499
Tabela 3. Características das amostras parafinadas utilizadas no estudo.	666
Tabela 4. Participantes do estudo molecular do transcriptoma.	688
Tabela 5. Quantificação e controle de qualidade do RNA total extraído a partir de blocos de parafina contendo biópsia de tecido testicular.....	744
Tabela 6. Controle de qualidade das sequências obtidas nos experimentos de NGS.	81
Tabela 7. Primers para amplificar genes do cromossomo Y e genes de referência.....	844
Tabela 8. Resumo do controle de qualidade aplicado as sequências utilizadas para o mapeamento.....	899
Tabela 9. Top 20 dos genes diferencialmente expressos no grupo SCOS.	1099
Tabela 10. Top 20 dos genes diferencialmente expressos em MA.	1155
Tabela 11. Descrição dos 10 genes diferencialmente expressos em MA.	12020
Tabela 12. Top 20 dos genes diferencialmente expressos em SCOS-idiopáticos.	1233
Tabela 13. Genes perdidos na etiologia idiopática de MA.....	1277
Tabela 14. Genes diferencialmente expressos com valor de p menor de 0,01.....	1322
Tabela 15. Genes desregulados do cromossomo 14.	1399
Tabela 16. Anotação funcional dos microRNA reprimidos	1466
Tabela 17. Expressão diferencial e anotação funcional dos miRNA	16060
Tabela 18. Genes alvo dos microRNA diferencialmente expressos com valor de $p < 0,05$	16161

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

®	Marca registrada
ANOVA	Análise da Variança
BAM	Mapa de alinhamento binário
°C	Grau centígrado
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
DNA	Ácido desoxirribonuclêico
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
FastQC	Programa para o controle de qualidade dos dados
FFPE	Biópsia em bloco de parafina
FIV	Fecundação in vitro
FSH	Hormônio folículo estimulante
FPKM	Fragments por Kb por milhão de sequências mapeadas para um determinado gene
GC	Guanina/Citocina
GTG	Bandamento-G por tripsina e giemsa
GATK3	Programa de análise para detecção de mutações
LGHM	Laboratório de Genética Humana e Médica. Departamento de Genética
rLog	Transformação dos valores absolutos para o log ₂
Log ₂	Logaritmo base 2
<i>lfcSE</i>	Erro padrão do fold-change
NGS	Sequenciamento de segunda geração
NP	Motilidade não progressiva
g	Gramma
GO	Gene Ontology
MDS	Análise estatística multidimensional
MA	Parada na maturação de células germinativas
MLPA	Multiplex ligation probe amplification
ng	Nanograma
µg	Micrograma
µL	Microlitro
mg	Miligrama
mL	Mililitro

OA	Azoospermia obstrutiva
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PMCG	Parada na maturação de células germinativas
PR	Motilidade progresiva
pKa	Constante de dissociação ácida
QC	Controle de qualidade
RNA	Ácido ribonuclêico
RT-qPCR	Reação em cadeia da polimerase acoplada a transcrição reversa
SERPAT	Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP
SCOS	Síndrome de célula de Sertoli-only
STAR	Programa para o alinhamento no genoma de referência
t.a.	Temperatura ambiente
TESE	Testicular Sperm Extraction

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Classificação de acordo com os defeitos quantitativos na espermatogênese segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS-2010)	25
1.2 Classificação patológica de acordo à histologia do tecido testicular.....	26
1.2.1 Azoospermia obstrutiva.....	26
1.2.2 Parada na Maturação de Células Germinativas	26
1.2.3 Síndrome de Célula de Sertoli (Sertoli cell only Syndrome)	28
1.3 Causas genéticas da infertilidade masculina primária.....	28
1.3.1 Síndrome de Klinefelter	28
1.3.2 Microdeleções na região AZF do cromossomo Y	30
1.3.3 Translocações Robertsonianas e recíprocas	33
1.3.4 Causas Gênicas e mutações pontuais	33
1.4 Dinâmica do Transcriptoma no tecido testicular	37
1.4.1 A alteração nos perfis de expressão de RNAs resultam na falha da espermatogênese e uma variedade de fenótipos histológicos no tecido testicular.....	37
1.5 As assinaturas de microRNA variam de acordo ao fenótipo testicular observado e controlam os genes envolvidos na geração de gametas.....	45
2 OBJETIVOS	55
2.1 Objetivo principal	55
2.2 Objetivos específicos.....	55
3 HIPÓTESE DO TRABALHO.....	57
4 AVALIAÇÃO E APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	59
5 MATERIAL E METODOS	61
5.1 Metodologia.....	61
5.1.1 Desenho experimental	61
5.1.2 Amostra e informações clínicas.....	64
5.1.2.1 Casuística das amostras parafinadas.....	65
5.1.2.2 Casuística das amostras em biópsia fresca	67
5.1.3 Extração de RNA total de amostras de biópsia de testículo parafinizadas (FFPE).....	68
5.1.3.1 Controle da qualidade do RNA	70
5.1.4 Análise do Transcriptoma em biópsia de testículo parafinizada	75

5.1.4.1 Sequenciamento de RNA extraído de amostras de biópsia de testículo parafinizadas utilizando a plataforma Illumina (TruSeq RNA-exome)	75
5.1.4.2 Pré-processamento dos dados de sequenciamento de nova geração: Controle de qualidade das sequências e retirada dos adaptadores	77
5.1.4.3 Mapeamento com o genoma de referência GRCh38 (Genoma Humano de Referência) e quantificação dos transcritos detectados	79
5.1.4.4 Análise da expressão gênica diferencial	82
5.1.5 Transcrição reversa acoplada a reação em cadeia da polimerase quantitativa (RTqPCR)	83
5.1.5.1 Síntese de cDNA	83
5.1.5.2 Desenho, seleção, e validação dos primers e reação de qPCR	83
5.1.6 Análise de expressão dos microRNAs (miRNAs) no tecido de testículo parafinizado ...	86
5.1.6.1 Sequenciamento dos microRNA utilizando a metodologia de Small-RNAseq	86
5.1.6.2 Controle de qualidade das sequências obtidas e mapeamento com o genoma de referência humano GRCh38	86
5.1.6.3 Quantificação e análise de expressão diferencial de microRNA	90
5.1.7 Citogenética convencional e bandamento GTG	90
5.1.8 Extração do DNA de sangue periférico	91
5.1.9 PCR (Reação em cadeia da polimerase) multiplex para detecção de microdeleções na região AZF do cromossomo Y	91
5.1.10 Detecção de rearranjos submicroscópicos por MLPA (<i>Multiplex Ligation Probe Amplification</i>)	92
5.1.11 Confirmação de rearranjos submicroscópicos por PCR em tempo real (qPCR)	93
5.1.12 Extração do RNA total em biópsia fresca de testículo	93
5.1.13 Microarranjos para a detecção da expressão gênica, microRNA e RNAs longos não codificadores	94
5.1.13.1 Análise bioinformática dos experimentos de microarranjos	95
5.1.13.1.1 Controle de qualidade dos dados obtidos	95
5.1.13.1.2 Análise da expressão gênica diferencial e anotação funcional	96
6 RESULTADOS	98
6.1 Estudo molecular em biópsias parafinizadas	98
6.1.1 Descrição dos dados clínicos dos indivíduos com infertilidade masculina	98
6.1.2 Os níveis de expressão dos genes do cromossomo Y variam nas diferentes etiologias da infertilidade masculina primária	101
6.1.3 Análise do Transcriptoma por tipo de tecido testicular na infertilidade masculina	104
6.1.3.1 Padrões de expressão gênica nos três grupos histopatológicos	104

6.1.3.2 Expressão diferencial entre SCO e OA: As histopatologia de Síndrome de Célula de Sertoli, porém com etiologias diferentes, apresentam assinaturas alteradas de genes associados com o ciclo celular	105
6.1.3.3 Expressão diferencial entre MA e OA: O padrão de expressão gênica em amostras com Parada na Maturação de Células Germinativas mostra a perda da função de genes essenciais para a espermatogênese	112
6.1.3.4 Expressão diferencial em SCOS e MA: A parada na maturação das células germinativas manteve a função de genes importantes do processo meiótico da espermatogênese, porém a segregação cromossômica foi desregulada	118
6.1.4 Análise do Transcriptoma por etiologia da infertilidade masculina primaria	121
6.1.4.1 Expressão diferencial entre SCOS-idiopáticos e OA: O tecido testicular na etiologia SCOS-idiopática perdeu a capacidade de entrar em meiose	121
6.1.4.2 Expressão diferencial entre MA-idiopáticos e OA: O tecido testicular com Parada na Maturação de Células Germinativas com etiologia idiopática apresenta genes desregulados associados a regulação da morfogênese celular.....	125
6.1.4.3 Expressão diferencial entre Klinefelter e OA: A Síndrome de Klinefelter pode apresenta desregulação de genes específicos das células de Sertoli e células de Leydig.....	129
6.1.4.4 Variação da expressão gênica entre microdeleções no AZF e OA: As microdeleções na região AZF desregulam genes necessários no ciclo celular e na diferenciação das células germinativas.....	134
6.1.4.5 Variação da expressão gênica entre a translocação robertsoniana e OA: A translocação robertsoniana apresenta genes do cromossomo 14 desregulados.....	136
6.1.5 Comparação das assinaturas de expressão gênica	140
6.1.6 Análise de expressão e anotação funcional de microRNA.....	142
6.1.6.1 Expressão diferencial entre SCOS-idiopáticos e OA	142
6.1.6.2 Reconstrução de redes de regulação microRNA-mRNA no tecido testicular com SCOS-idiopáticos	148
6.2 Estudo genético y molecular em biópsias frescas	150
6.2.1 Avaliação clínica e citogenética somática.....	150
6.2.2 Detecção de microdeleções na região AZF do cromossomo Y.....	150
6.2.3 Análise do Transcriptoma envolvendo a expressão de mRNA, miRNA e lincRNA	153
6.2.3.1 Expressão diferencial entre MA-idiopáticos e AO.....	153
6.2.3.2 Classificação funcional por GO e KEEG	158
6.2.3.2.1 Classificação de RNA mensageiros.....	158
6.2.3.2.2 Classificação de RNA não codificadores de proteína	158
6.2.3.3 Reconstrução de redes de regulação gênica no tecido germinativo	162
6.2.3.4 Identificação de vias de regulação gênica da infertilidade masculina.....	166
7 DISCUSSÃO	168
7.1 A importância dos genes do cromossomo Y na infertilidade masculina primaria	168

7.2 As patologias testiculares como a Síndrome de célula de Sertoli e a Parada na maturação de células germinativas apresentam assinaturas de genes diferencialmente expressos associados ao ciclo celular	169
7.3 A translocação robertsoniana envolvendo os cromossomos 13 e 14 pode gerar a perda de um gene importante nas espermatogônias e seus predecessores celulares	171
7.4 O transcriptoma testicular na síndrome de Klinefelter	172
7.5 O papel dos microRNA na infertilidade masculina idiopática com aplasia de células germinativas	173
7.6 Análise integrado de detecção de alterações genéticas e moleculares em indivíduos com infertilidade masculina primaria	174
7.6.1 Expressão diferencial de RNA mensageiro no tecido testicular com linhagens de células germinativas com falha no desenvolvimento	176
7.6.2 Expressão de RNA não codificadores de proteínas na falha do desenvolvimento da espermatogênese	177
7.6.3 Correlação das vias genicas alteradas e o fenotipo clínico da infertilidade masculina primaria.....	177
8 CONCLUSÕES.....	180
9 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	183
10 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	185
APÊNDICE	204

Introdução

1 INTRODUÇÃO

A infertilidade é considerada como um problema de saúde pública pela Organização Mundial da Saúde (OMS) que gera impacto social, econômico e psicológico (Cousineau & Domar, 2007) e esta condição médica é definida como a incapacidade de engravidar após doce meses de relações sexuais sem contracepção que pode ser de responsabilidade materna, paterna ou dos dois. É uma condição com prevalência mundial de 10% nos casais em idade reprodutiva, sendo que 50% destes casos estão associados ao fator masculino de infertilidade primária (Irvine, 1998).

A infertilidade masculina é uma condição patológica com causas genéticas, não genéticas, multifatoriais ou idiopáticas e fenótipos heterogêneos diversos que podem resultar na diminuição ou ausência de espermatozoides no espermograma ou alterações na qualidade do esperma (Cooper et al., 2010). As causas genéticas, principalmente as alterações cromossômicas clássicas como aneuploidias, são a maior causa da infertilidade masculina. Além disso estão as alterações da meiose por patologias do complexo sinaptonêmico e as microdeleções no cromossomo Y. Já as causas não genéticas ocorrem por varicocele, traumatismos testiculares, infecções como tuberculose ou hanseníase. (Zorrilla & Yatsenko, 2013). Porém, a infertilidade masculina pode apresentar causas multifactoriais ou sem causa conhecida chamadas idiopáticas (Bracke, Peeters, Punjabi, Hoogewijs, & Dewilde, 2018).

Atualmente, ainda é um desafio entender todas as possíveis causas da infertilidade masculina devido à alta ocorrência relatada em todos os continentes, sendo que o continente asiático apresenta o maior número de relatos sobre esta condição seguidos da África, Europa e Norte América (Agarwal, Mulgund, Hamada, & Chyatte, 2015). Na América do Sul, o Brasil apresenta o maior número de estudos associados a infertilidade masculina (Carrara et al., 1998, 2004; Pina-Neto et al., 2006).

Além da avaliação do esperma ejaculado, a infertilidade masculina é identificada e caracterizada pela avaliação clínica do paciente mediante a altura, envergadura, nível intelectual, características sexuais secundárias do aparelho urogenital, observando-se principalmente alterações na morfologia das gônadas (tamanho testicular, consistência das gônadas), pilosidade genital, tamanho do pênis, etc (Csilla Krausz & Forti, 2000), mas esta avaliação é complementada pelos exames hormonais, sorologia para as principais infecções, espermograma, etc e pelo estudo histológico da biópsia do testículo que visa a identificação da gravidade da patologia (Levin, 1979; SCHOOR, ELHANBLY, NIEDERBERGER, &

ROSS, 2002). O resultado histopatológico pode ser correlacionado diretamente com o resultado do espermograma para determinar o fenótipo tecidual da alteração observada no laboratório (Cerilli, Kuang, & Rogers, 2010; Gert R Dohle, Elzanaty, & van Casteren, 2012). Dependendo dos resultados fazem-se os exames genéticos tais como cariótipo com bandamento G de no mínimo 100 metáfases, estudo da meiose testicular e do complexo sinaptonêmico e de microdeleções de AZF (Silber, 2018).

O processo biológico encarregado pela produção dos espermatozoides é a espermatogênese, a qual acontece nos testículos. Assim, os testículos apresentam uma estrutura complexa que consiste em túbulos seminíferos cercados por tecido conjuntivo nomeado como interstício. Já os túbulos seminíferos contêm as células germinativas, células de Sertoli e células mioides peritubulares que rodeiam os túbulos seminíferos. O interstício está composto por células de Leydig, fibroblastos, macrófagos, vasos sanguíneos, assim como células nervosas e ocasionalmente mastócitos (Jegou et al., 2000; Soraggi, Riera, Rajpert-De Meyts, Schierup, & Almstrup, 2020).

Após a avaliação física, o médico deve obter a história clínica do indivíduo com suspeita de infertilidade masculina. A história clínica do indivíduo deve considerar os seguintes pontos: 1) a história reprodutiva do casal focando na frequência das relações sexuais, estado erétil e ejaculatório assim como o conhecimento do ciclo menstrual; 2) a história médica detalhada focando na presença de patologias que podem ter impacto na fertilidade como diabetes mellitus, alteração renal, câncer ou patologia autoimune; 3) histórico das cirurgias como vasectomia; 4) Medicamentos que possam afetar a função testicular; 5) Infecções no aparelho urogenital; 6) estilo de vida como uso de drogas, cigarro, consumo de álcool ou exposição a reagentes químicos como solventes, pesticidas e metais pesados; 7) o histórico familiar é muito importante para determinar possíveis causas genéticas na família (Agarwal, Gupta, & Sharma, 2016).

Com as informações obtidas do exame físico e do prontuário do paciente, a infertilidade masculina pode se encaixar na classificação de acordo com a patologia associada a infertilidade. Em forma geral, a infertilidade em homens poder ser classificada em três categorias que contém a maioria das etiologias da infertilidade masculina:

A primeira categoria é a infertilidade masculina prê-testicular ou Secundária que corresponde as patologias principalmente endócrinas relacionadas ao eixo hipotálamo-hipófise que controlam o funcionamento do sistema reprodutor masculino como a Síndrome de Kallman (Stamou & Georgopoulos, 2018) ou o hipogonadismo hipogonadotrófico

normosômico (Demirbilek et al., 2015) que apresentam falha na secreção dos hormônios folículo estimulante (FSH) e luteinizante (LH) por alterações no hipotálamo ou na hipófise por etiologia genética ou idiopática.

A segunda categoria é a infertilidade masculina Testicular ou Primária que corresponde aos defeitos quantitativos na espermatogênese com etiologia genética ou idiopática que resultam na falha testicular e que apresentam uma frequência de aproximadamente 75% como fator principal da infertilidade masculina. Além disto, observam-se nesta categoria as disfunções ou obstruções nos túbulos deferentes que impede a saída dos espermatozoides e é considerada a segunda etiologia mais comum na infertilidade masculina primária (Csilla Krausz & Riera-Escamilla, 2018).

Já a terceira categoria inclui a obstrução das vias seminíferas em qualquer ponto do aparelho reprodutor impedindo a saída dos espermatozoides. Os indivíduos com este tipo de patologias apresentam espermatogênese completa, porém a obstrução pode ocorrer por causas genéticas, traumatismos ou infecções do trato urinário e genital e reações imunológicas que precisam de atenção médica (Csilla Krausz & Forti, 2000; Kumar, 2008).

De acordo com o nível da patologia, é possível realizar tratamentos especializados para recuperar a produção de espermatozoides, induzir a produção hormonal, melhorar a qualidade de vida mediante cirurgia ou tratamento com antibióticos. Outrossim, dependendo do tipo de patologia é possível realizar procedimentos cirúrgicos para capacitação de células germinativas e realização de procedimentos de reprodução assistida como a fecundação *in vitro* FIV (A. Jungwirth, T. Diemer, G.R. Dohle, Z. Kopa, C. Krausz, 2016; Baazeem et al., 2011; Coutton, Fissore, Palermo, Stouffs, & Touré, 2016; Silber, 2018; Sole-Balcells, Jimenez-Cruz, de Cabezón, & Rosello, 1977; Zorrilla & Yatsenko, 2013) (Tabela 1).

Tabela 1. Classificação clínica e tipo de tratamento/procedimento na infertilidade masculina

Classificação	Tratamento/Procedimento para FIV
Prê-testicular	
Endócrino (deficiência gonadotrópica)	
Congênito (síndrome de Kallman)	Endocrinologia
Adquirido (Tumor)	Cirurgia
Alterações funcionais	
Disfunção erétil	Farmacológico, psicológico
Falha na ejaculação	FIV
Pós-testicular	
Obstrutivo	
Ao nível do epidídimo	PESA/TESE + ICSI
Ao nível de vasos	PESA/TESE + ICSI
Infecção de glândulas acessórias	Antibióticos
Doença autoimune	FIV
Testicular	
Congênito	
Criptorquidia	Cirurgia
Causas Genéticas	
Síndrome de Klinefelter e variantes	TESE/microTESE + ICSI
Microdeleções no AZF	TESE/microTESE + ICSI
Alterações cromossômicas estruturais (Exemplo: Translocação robertsoniana)	microTESE + ICSI
Varicocele	Cirurgia
Alterações monogênicas	
Drogas de abuso, toxicidade	Desintoxicação
Quimioterapia, Radioterapia	Crio conservação do espermatozoides
Orchitis	FIV
Causa Idiopática	FIV

*FIV: Fecundação *in vitro*

1.1 Classificação de acordo com os defeitos quantitativos na espermatogênese segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS-2010)

Em 2010 a Organização Mundial da Saúde (OMS) estabeleceu os parâmetros atualizados para a avaliação do conteúdo coletado nas análise de esperma com a finalidade de diagnóstico de infertilidade masculina, assim como teste de rotina nos procedimentos de fecundação *in vitro* como ICSI (Cooper et al., 2010).

A classificação é feita mediante análise do espermograma, considerando os valores dos seguintes parâmetros: Volume do ejaculado (mL), Concentração do esperma ($10^6/\text{mL}$), Número total de espermatozoides ($10^6/\text{ejaculado}$), Motilidade total (PR + NP, %), Motilidade progressiva (PR, %), Formas normais (%) e Vitalidade (%). Assim, os espermatozoides são observado ao microscópio com a finalidade de descrever a morfologia considerando o acrossomo, a calda e determinar a vitalidade dos espermatozóides (Demirbilek et al., 2015).

A normozoospermia é considerada como o valor referência na última estimativa da OMS na qual se estipula que o valor referencial da concentração do esperma deveria ser de $\geq 15 \times 10^6/\text{mL}$ e a na avaliação qualitativa os espermatozoides não deveriam apresentar alterações morfológicas (Cooper et al., 2010). A oligozoospermia é a expressão fenotípica da infertilidade masculina que mostra uma diminuição no número de espermatozoides no ejaculado. Considera-se uma concentração de esperma $< 15 \times 10^6/\text{mL}$ (Cooper et al., 2010). Já a criptozoospermia é a diminuição significativa no valor de concentração de esperma com valores menores a $1 \times 10^6/\text{mL}$ (Csilla Krausz & Riera-Escamilla, 2018). Por último, a Azoospermia é a manifestação fenotípica da maioria das etiologias da infertilidade masculina que caracteriza-se pela ausência de espermatozoides no ejaculado (Cooper et al., 2010; Csilla Krausz & Riera-Escamilla, 2018) (Figura 1).

Figura 1. Esquema da classificação fenotípica da infertilidade masculina pela quantidade de espermatozoides observados no ejaculado e sua associação com a frequência das alterações genéticas. (Figura obtida de Krausz & Riera-Escamilla, 2018)

1.2 Classificação patológica de acordo à histologia do tecido testicular

A caracterização patológica da infertilidade masculina é feita mediante análise histológica em biópsia de testículo sendo detectadas três condições patológicas: 1) Azoospermia obstrutiva, causada pela obstrução dos túbulos deferentes impedindo a saída dos espermatozoides; pacientes com esta condição apresentam espermatogênese normal. 2) Parada na maturação de células germinativas, que pode ser ao nível de espermatogônia, espermatócito primário ou secundário e espermátide causando azoospermia ou oligozoospermia. 3) Síndrome de célula de Sertoli-only, condição que envolve aplasia de células germinativas e em alguns casos ausência de células de Leydig do tecido testicular. Os indivíduos com esta condição sempre apresentam azoospermia na avaliação laboratorial do ejaculado (Figura 2).

1.2.1 Azoospermia obstrutiva

A obstrução ou disfunção dos túbulos seminíferos refere-se a qualquer interferência no transporte do espermatozoide no nível proximal ou distal do trato urogenital. Na azoospermia obstrutiva observa-se ausência de espermatozoides no ejaculado, porém com histologia normal do testículo e espermatogênese completa (P. J. Stahl & Schlegel, 2012) (Figura 2. A-A').

A única forma congênita com etiologia genética conhecida que resulta em azoospermia obstrutiva é a ausência de túbulos deferentes com anatomia renal normal (CAVD). A causa genética corresponde a mutações recessivas no gene *CFTR* (cystic fibrosis trans-membrane conductance regulator) que pode afetar um (agenesia unilateral congênita) ou os dois (agenesia bilateral congênita) túbulos deferentes ocasionando agenesia das vesículas seminais e malformações no epidídimo (Fesai, Pampukha, Solovyov, & Livshits, 2008).

1.2.2 Parada na Maturação de Células Germinativas

Este tipo de histologia é observado em indivíduos com interrupção total ou parcial no desenvolvimento das células germinativas em um dos estágios de desenvolvimento. Assim, podemos identificar parada no nível de espermatogônia que mostra células germinativas imaturas dentro dos túbulos seminíferos. Além disto, a interrupção pode acontecer no estágio

de espermatócito observando-se espermatogônias, espermatócitos e poucos ou escassos espermátides nos túbulos. Já a ausência de espermátides alongados com calda está diretamente associada com a interrupção no estado de espermátide impedindo a espermiogênese (Larriba & Bassas, 2018) (Figura 2 B-B'). A variedade de possibilidades da falha no desenvolvimento das células germinativas faz com que este tipo de patologia tenha maior complexidade na identificação das causas genéticas ou moleculares (Jan et al., 2018).

Figura 2. Classificação histológica da infertilidade masculina primária observada em biópsia de testículo humano. A. Microfotografia de biópsia de testículo marcada com HE de uma amostra com azoospermia obstrutiva com espermatogênese completa mostrado um túbulo seminífero com todos os tipos de células germinativas. A'. Esquema gráfico mostrando os tipos celulares achados no tecido testicular com espermatogênese completa (OA): a) Espermatogônias; b) Espermatócito; c) Espermátide; d) espermatozoide. B. Microfotografia de biópsia de testículo marcada com HE de uma amostra com parada na maturação de células germinativas ao nível de espermatócito. B'. Esquema gráfico mostrando os tipos celulares achados no tecido testicular com parada na maturação de células germinativas (MA) ao nível de espermatócito. C. Microfotografia de biópsia de testículo marcada com HE de uma amostra com síndrome de célula de Sertoli mostrando aplasia de células germinativas. C'. Esquema gráfico mostrando os tipos celulares achados no tecido testicular com síndrome de célula de Sertoli (SCOS). S: representa a célula de Sertoli.

1.2.3 Síndrome de Célula Sertoli-only (Sertoli cell-only syndrome)

Histopatologia conhecida pela ausência de células germinativas no tecido testicular. A caracterização microscópica detecta unicamente células de Sertoli nos túbulos seminíferos e este tipo de tecido é comumente achado em indivíduos com azoospermia (Silber, 2018). A caracterização desta patologia pode evidenciar a presença de etiologias genéticas associadas à falha na espermatogênese (Winge et al., 2018) (Figura 2 C-C').

1.3 Causas genéticas da infertilidade masculina primária

1.3.1 Síndrome de Klinefelter

As anormalidades cromossômicas são a principal causa genética da infertilidade masculina que podem se apresentar em até 10% da população (Balkan, Tekes, & Gedik, 2008; Carrara et al., 2004; Pina-Neto et al., 2006; Sadeghi-Nejad & Farrokhi, 2006; Y. Yang et al., 2003).

A Síndrome de Klinefelter é a causa cromossômica mais comum da infertilidade masculina com uma frequência de 3% do total homens inférteis e com ocorrência de 15% dentre os homens com azoospermia (Stuppia et al., 1998). Esta síndrome foi descrita pela primeira vez em 1942 (Klinefelter Jr, Reifstein Jr, & Albright Jr, 1942) em homens adultos e inférteis, caracterizada por um fenótipo que consiste em hipogonadismo hipergonadotrófico observando-se fibrose e hialinização grave dos túbulos seminíferos (Aksglaede et al., 2006), azoospermia, ginecomastia e em alguns casos mais avançados da doença os homens podem apresentar psicose (Smyth & Bremner, 1998). Em relação ao tecido testicular foi relatado que a fibrose e a hialinização dos túbulos seminíferos característicos da Síndrome de Klinefelter começa na adolescência. Esta conclusão foi obtida a partir da análise histológica de biópsias de testículo de fetos, juvenis na puberdade e na adolescência portadores da síndrome de Klinefelter estabelecendo assim a faixa etária do início da aparição do fenótipo mas grave desta síndrome e a morte das células germinativas no testículo (Van Saen et al., 2018).

O cariótipo da síndrome de Klinefelter se caracteriza pela presença de uma alteração numérica denominada aneuploidia dos cromossomos sexuais descrita pela primeira vez em 1959 (Klinefelter Jr et al., 1942). Assim, a análise citogenética somática consegue detectar um ou mais cromossomos X adicionais (47,XXY ou 48,XXXY e variantes) nas metáfases

analisadas o que já foi amplamente correlacionado com as características fenotípicas desta síndrome (Wikström & Dunkel, 2011). Os portadores desta síndrome podem apresentar cariótipos em mosaico pois são detectadas metáfases normais (46,XY) e metáfases com aneuploidia do cromossomo X (47,XXY) (Garcia-Quevedo et al., 2011; Sarkar & Marimuthu, 1983) (Figura 3).

Figura 3. Alterações numéricas e estruturais nos cromossomos sexuais detectados no cariótipo de homens inférteis. Cariótipo masculino normal (46, XY), cariótipo com detecção da síndrome de Klinefelter (47, XXY), cariótipo com detecção de síndrome de homén-46, XX (SRY+) (* a translocação do loco SRY para o cromossomo X ocorre em 80% dos indivíduos com esta síndrome) e cariótipo com detecção do isocromossomo Yq (46, X isso Yq). Em vermelho está indicada a translocação da região pseudoautosômica ligada ao X no cromossomo Y. O azul indica a região de heterocromatina do cromossomo Y. Figura adaptada de (Csilla Krausz & Riera-Escamilla, 2018)

Os indivíduos adultos portadores da síndrome de Klinefelter certamente apresentam a histologia testicular compatível com a síndrome de célula Sertoli-only (SCOS) associada a hialinização testicular e hiperplasia acentuada das células de Leydig devido à estimulação prolongada às gonadotrofinas LH (hormônio luteinizante) e FSH (hormônio estimulador do folículo) (Aksglaede et al., 2006). Além disso, podemos observar diferenças morfológicas nos túbulos seminíferos resumidas em dois tipos: túbulos seminíferos com aplasia total de células germinativas e túbulos seminíferos com remanescentes de espermatogênese (hipoespermatogênese) (D'Aurora et al., 2017).

Estudos ao redor do mundo são realizados para mapear a frequência da Síndrome de Klinefelter junto às demais causas genéticas da infertilidade masculina (Wikström & Dunkel, 2011) assim como as consequências moleculares no tecido testicular (D'Aurora et al., 2015, 2017; Winge et al., 2018).

Nos últimos cinco anos, os estudos de frequência das anormalidades dos cromossomos sexuais associadas à infertilidade masculina relataram que nos países do continente africano como o Marrocos, a frequência da síndrome de Klinefelter é de 2,97% de uma corte de indivíduos com infertilidade e alteração na genitália (Elkarhat et al., 2019). Já na Europa, as recentes pesquisas sobre a frequência revelaram uma prevalência de 11/100 000 recém nascidos na Dinamarca (Berglund et al., 2019). A última revisão feita por Cioppi, Rosta, & Krausz, 2021 relata que a frequência da síndrome de Klinefelter é de 1 em 600 (0,1-0,2%) dos recém nascidos masculinos além disso esta prevalência se estende em até um 3% dos homens adultos inférteis e 12% dos homens com azoospermia.

No Brasil, a síndrome de Klinefelter é ainda uma patologia pouco diagnosticada devido a que os indivíduos portadores da alteração cromossômica conhecem o diagnóstico só na fase adulta. Existe uma baixa porcentagem de indivíduos diagnosticados na puberdade o que dificulta o tratamento e aconselhamento genético dos portadores. A frequência se mantém desde o estudo realizado pelo nosso grupo de pesquisa em 2006. O estudo foi realizado no Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto e contou com a participação de 165 homens inférteis. Os resultados demonstraram que a frequência da síndrome de Klinefelter foi de 6% dos pacientes estudados, esta porcentagem de homens apresentaram cariótipo 47,XXY e em mosaico 46,XY/47,XXY (Pina-Neto et al., 2006). Estes dados são similares com o estudo de 126 pacientes homens afetados por oligozoospermia ou azoospermia no qual os pesquisadores determinaram que 80-90% dos indivíduos com síndrome de Klinefelter mostraram um cariótipo sem mosaico (47,XXY), 20% dos casos apresentaram mosaico (47,XXY/46,XY) ou cromossomos sexuais adicionais (48,XXXY, 48,XXYY, 49, XXXXY) enquanto outros apresentaram anormalidades estruturais no cromossomo X (47, X,iXq,Y) (Maiburg, Repping, & Giltay, 2012).

1.3.2 Microdeleções na região AZF do cromossomo Y

A segunda causa cromossômica com maior ocorrência na infertilidade masculina são as microdeleções na região AZF, quer dizer a perda de material genético localizado numa

região do braço longo do cromossomo Y (Yq). A região AZF está dividida em três sub-regiões denominadas AZFa, AZFb, AZFc onde estão localizados genes importantes para o desenvolvimento do testículo e a correta funcionalidade da espermatogênese (P. H. Vogt et al., 1996).

A frequência de microdeleções no cromossomo Yq em homens com azoospermia ou oligozoospermia grave é de 5% a 10% aproximadamente na população mundial (P. H. Vogt et al., 1996; P H Vogt, 1998; Peter H. Vogt, 2004; Peter H. Vogt, Bender, Zimmer, & Strowitzki, 2017). Assim, existem numerosos trabalhos relatando a frequência das microdeleções na população masculina com infertilidade primária (Colaco & Modi, 2018) por exemplo a análise de 131 homens inférteis revelou que 8,7% possuíam microdeleções na região AZF do cromossomo Yq. (C. Krausz et al., 1999). Casos similares ocorreram na análise de 3000 homens inférteis onde a frequência de microdeleções na região AZF foi de 7,3% (Rolf, Gromoll, Simoni, & Nieschlag, 2002) e no trabalho de Pina-Neto et al., 2006, no qual foi detectada uma frequência de 7,5% de microdeleções na região AZF do cromossomo Yq.

Estudos realizados em homens inférteis de diferentes países asiáticos como Azerbaijão, China, Japão e Coreia assim como de cidades européias entre elas Eslováquia, Eslovênia, Portugal e República da Macedônia e até de países do oriente como Jordânia, Índia, Turquia e Marrocos, entre outros, tem relatado que a incidência de microdeleções na região AZF se mantém entre 1-10% da população analisada (Ambulkar et al., 2014; Balkan et al., 2008; Behulova et al., 2011; Imken et al., 2007; Khabour, Fararjeh, & Alfaouri, 2014; Omrani, Samadzade, Bagheri, & Attar, 2006; Park et al., 2008; R. X. Wang et al., 2010).

Nosso grupo de pesquisa desenvolve trabalhos de pesquisa em infertilidade masculina associada as microdeleções no cromossomo Y desde 1996, que se iniciou com o estudo intitulado “Estudo Citogenético e Molecular da Esterilidade Masculina Humana” no qual foi identificada uma frequência de 6% destes rearranjos submicroscópicos (Carrara, 2000; Carrara et al., 2004). A continuidade do estudo molecular foi estendida para uma amostra de 165 homens inférteis avaliados nos ambulatórios de Genética Médica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, mantendo a frequência das microdeleções. Os estudos visaram a seleção de indivíduos que não apresentaram alterações associadas a infertilidade masculina de tipo pré-estipular (Exemplo: síndrome de Kallman), infecções, criptoorquidia, hanseníase e câncer (Pina-Neto et al., 2006).

As deleções na região AZF causam danos no testículo porque alteram o correto desenvolvimento das células germinativas. A deleção completa da sub região AZFa resulta na aparição do fenótipo de síndrome de célula de Sertoli-only (SCOS), porém os indivíduos portadores da deleção parcial podem apresentar espermatogênese completa (C Krausz & Casamonti, 2017). Por outro lado, a deleção completa da sub região AZFb resulta no fenótipo testicular de parada na maturação de células germinativas em diferentes estádios da espermatogênese (Stouffs, Vloeberghs, Gheldof, Tournaye, & Seneca, 2017). Já a deleção completa da região AZFc pode causar uma variedade de fenótipos testiculares desde parada na maturação de células germinativas até a síndrome de célula Sertoli-only (A Ferlin et al., 2005; Noordam et al., 2011) (Figura 4).

Figura 4. Microdeleções na região AZF do cromossomo Y e sua correlação com o fenótipo de infertilidade masculina. O gráfico indica as regiões do cromossomo Y: Yp (braço curto), PAR1 (região pseudo-autossômica 1), Cen (centrômero), Região AZF, PAR2 (região pseudo-autossômica 2), Yq (braço longo). Em laranja está indicada a sub-região AZFa, em verde a sub-região AZFb e em roxo a sub-região AZFc. As linhas pontuadas estão representando os tamanhos das microdeleções detectadas em homens com infertilidade masculina.

O estudo das microdeleções no cromossomo Y é importante devido as consequências que estes rearranjos submicroscópicos podem gerar na fertilidade e na saúde do portador (Colaco & Modi, 2019; Peter H. Vogt et al., 2017). Estas microdeleções geram uma variedade de fenótipos histológicos no testículo que vão desde a falha na espermatogênese em qualquer nível do desenvolvimento das células germinativas até a aplasia desta linhagem celular (A Ferlin et al., 2005; Reijo et al., 1995; Yamada et al., 2010). No entanto, é possível que um

homem portador do rearranjo possa ter descendência devido ao fenótipo de hipoespermatogenese, porém existe uma alta possibilidade que os filhos portadores desenvolvam infertilidade primária (Peter H. Vogt et al., 2017). Por isto, são desenvolvidas novas metodologias utilizando PCR em tempo real (Alechine & Corach, 2014), MLPA (Dutta et al., 2020), análise de fragmentos (Bahrami Zadegan et al., 2018) e microarranjos de DNA (Yuen et al., 2014).

1.3.3 Translocações Robertsonianas e recíprocas

Dentre as causas cromossômicas menos frequentes na infertilidade masculina temos a translocações Robertsonianas, que ocorrem em 1,5% de homens oligospermicos e em 0,2% dos azoospermicos sendo que as translocações (13;14) e (14;21) apresentam maior frequência em homens com azoospermia (G R Dohle et al., 2002; Frydman et al., 2001; Johannisson, Schwinger, Wolff, Vom Ende, & Löhrs, 1993). Além disso, estudos demonstraram que as translocações recíprocas podem apresentar-se com uma frequência de 0.7% de oligospermicos ou azoospermicos (Oliver-Bonet et al., 2005).

Já foi descrito na literatura que esta alteração estrutural envolvendo os cromossomos 13 e 14 tem como consequência a disjunção das cromátides irmãs na maioria dos cromossomos durante o paquíteno, assim como a presença de trivalentes dos cromossomos sexuais gerando a parada no desenvolvimento dos últimos estádios das células germinativas (Johannisson et al., 1993).

1.3.4 Causas Gênicas e mutações pontuais

Além das alterações cromossômicas, existem causas gênicas que podem ocorrer em azoospermia ou oligozoospermia severa. A espermatogênese depende da cooperação de múltiplos genes que são expressos em diferentes etapas da diferenciação como na fase mitótica, meiótica e pós-meiótica. A falha na correta expressão destes genes pode gerar fenótipos de infertilidade (Stahl et al. 2010; Waclawska and Kurpisz 2012). Na espermatogênese normal, dentre os genes que estão significativamente expressos antes e durante a meiose são aqueles das famílias *DAZ* (*deleted in azoospermia*) e *TSPY1* (*testis specific protein, Y-linked*) entretanto, após a meiose é comum encontrar aumento na expressão

dos genes *PRM2* (protamine 2), *TNP1* (transition protein 1), *SYNJ2* (synaptojanin 2) e *ZPBP* (zona pellucida binding protein) (Fox, Ares, Turek, Haqq, & Reijo Pera, 2003).

Estudos demonstraram que genes da família *SPATA*, *SPATA6*, *SPATA9*, *SPATA15* e *SPATA33*, estão associados à infertilidade e estão expressos em todas as etapas da espermatogênese. (Bornstein et al., 2011; Hengling Chen, Yi, Sheng, Cheng, & Zhou, 2013). Assim mesmo, a expressão dos genes *ODF1*, *TNP1* e *PRM2* é importantes na formação dos espermatozoides (Gatta et al., 2010). Por isto sugere-se que a desregulação destes genes impede o correto desenvolvimento das células germinativas.

Outrossim, a desregulação de fatores de transcrição como o gene *NF-Y* (nuclear transcription factor Y) que participa na etapa pré-meiótica da espermatogênese poderia levar a morte celular de células germinativas (VanWert, Wolfe, & Grimes, 2008). Em outro estudo foi identificado que a repressão da expressão dos genes *DE* (insulin-degrading enzyme) e *RAN* (Ras-related nuclear protein) estão associadas com infertilidade masculina (Feig et al. 2007). Outro gene com potencial associação com a parada na maturação é *TAF7L*, um fator de transcrição que é translocado para o núcleo durante a meiose (Pointud et al., 2003)

Homens com falha em qualquer etapa da espermatogênese, podem ter alteração na expressão de genes envolvidos no ciclo celular como *SYCP3* (synaptotemal complex group), que codifica uma proteína do complexo sinaptonêmico ou do gene responsável pela inibição de formação de ruptura de cadeia dupla meiótica *MEI1* (Meiotic Double-Stranded Break Formation Protein 1) (Miyamoto et al., 2003; Sato et al., 2006).

As novas metodologias de análise molecular e geração de grandes quantidades de dados genômicos como o sequenciamento de segunda geração (*Next Generation Sequencing*) utilizadas na detecção de variação em número de cópias, SNPs, CNVs e principalmente mutações pontuais que resultam em fenótipos patológicos, mostraram a possibilidade de muitas causas gênicas que não podem ser descritas utilizando metodologias tradicionais como cariotipagem ou mesmo a avaliação clínica. Na infertilidade masculina, a primeira alteração monogênica associada a infertilidade masculina foram as mutações no gene *CFTR*, no entanto agora existe uma lista de genes que estão associados a infertilidade masculina pré-testicular, testicular e pós testicular e estimasse que a ocorrência de causas monogênicas está incrementando com o passar do tempo e a transmissão de mutações de pais para filhos (Oud et al., 2019) (Figura 5).

As causas monogênicas observadas na infertilidade masculina testicular estão associadas a 35 genes descritos em trabalhos sobre famílias com mutações dominantes e em

sua maioria recessivas (Oud et al., 2019). Porém, a patogenicidade das mutações foi confirmada funcionalmente em apenas 10 genes que estariam envolvidos no desenvolvimento das células germinativas e estas mutações resultam em fenótipos testiculares de infertilidade como parada na maturação de células germinativas e síndrome de célula de Sertoli (Kasak & Laan, 2020).

Figura 5. Mutações monogênicas que resultam em infertilidade masculina pré-testicular, testicular e pós-testicular. A figura mostra os genes relatados com mutações recessivas identificados por metodologias de sequenciamento de nova geração: Exoma e WGS (whole genome sequencing). Os genes em marrom são aqueles que estão muito associados ao fenótipo de infertilidade. Os genes em vermelho representam uma associação forte e os genes em amarelo representa uma associação moderada. O gráfico foi obtido da revisão sistematizada realizada por Oud et al., 2019.

As alterações monogênicas estão divididas em dois grupos: indivíduos só com problema de infertilidade primária e indivíduos com problemas de saúde provavelmente congênitos e infertilidade primária (sindrômicos) (Kasak & Laan, 2020). No primeiro

grupo encontramos uma mutação recessiva no gene *FANCM*, gene de reparo do DNA nas células germinativas masculinas, resultando no fenótipo testicular de SCOS (Kasak et al., 2018; Yin et al., 2019). Da mesma forma uma mutação recessiva no gene *MEI1*, responsável pela sinapse cromossômica durante a meiose no testículo, resulta no fenótipo de parada na maturação das células germinativas (Ben Khelifa et al., 2018). Outrossim, uma mutação recessiva no gene de reparo de cadeia dupla de DNA na espermatogônia (*MEIOB*) gera falha na espermatogênese (Gershoni et al., 2019). A mutação recessiva no gene *STAG3* encarregado pela coesão das cromátides irmãs e o reparo da dupla fita de DNA no espermátócito resulta na ausência de espermátides (Riera-Escamilla et al., 2019). Mutações recessivas em membros da família de genes *TEX* (*TEX11*, *TEX14* e *TEX15*) resultam em diversos fenótipos histológicos no testículo desde a parada no desenvolvimento dos espermátócitos até a ausência de células germinativas (Colombo, Pontoglio, & Bini, 2017; Gershoni et al., 2017; Nakamura et al., 2017; Okutman et al., 2015; Sha et al., 2018; F. Yang et al., 2015; Yatsenko et al., 2015).

Igualmente, no segundo grupo foi descrita uma mutação dominante no gene *NR5A1*, fator de transcrição responsável pela ativação de genes envolvidos na determinação sexual, que gera parada na maturação de células germinativas e síndrome de célula de Sertoli-only (Alberto Ferlin et al., 2015; Zare-Abdollahi et al., 2015). Outrossim, uma mutação recessiva no gene *SETX*, responsável pelo processamento de DNA e RNA no tecido testicular, resulta em parada na maturação de células germinativas (Becherel et al., 2019; Catford, O'Bryan, McLachlan, Delatycki, & Rombauts, 2019). Finalmente, uma mutação dominante no gene *WT1* foi descrita como causa do fenótipo testicular de SCOS e parada na maturação de células germinativas (Becherel et al., 2019; Catford et al., 2019).

A descoberta de novos genes candidatos a marcadores da infertilidade masculina só foi possível com a chegada das novas tecnologias de sequenciamento genômico massivo como o WES (Exoma) e WGS (sequenciamento do genoma completo). Desta forma são identificadas mutações em genes que geram fenótipos de infertilidade como a falha na espermatogênese (Figura 6). Neste processo biológico de produção de gametas já foram identificados mais de uma dezena de genes associados, entretanto, a limitação destes estudos é que só podem ser detectadas as mutações recessivas ou dominantes em famílias com consanguinidade transmitidas dos pais para os filhos, pelo que ainda é um desafio identificar padrões monogênicos ou utilizar estas metodologias na triagem de indivíduos com infertilidade devido

à complexidade do processo biológico e quantidade de genes envolvidos (Kasak & Laan, 2020; Csilla Krausz & Riera-Escamilla, 2018; Oud et al., 2019).

Figura 6. Mutações monogênicas na infertilidade primária que resultam em falha da espermatogênese em diferentes estágios do desenvolvimento das células germinativas. Os genes em marrom são aqueles que estão muito associados ao fenótipo de infertilidade. Os genes em vermelho representam uma associação forte e os genes em amarelo representa uma associação moderada. O gráfico foi obtido da revisão sistematizada realizada por Oud et al., 2019.

1.4 Dinâmica do Transcriptoma no tecido testicular

1.4.1 A alteração nos perfis de expressão de RNAs resultam na falha da espermatogênese e uma variedade de fenótipos histológicos no tecido testicular

A espermatogênese é um processo de produção e desenvolvimento de células germinativas altamente complexo pela participação de mecanismos moleculares, hormonais e estruturais que ocorrem de forma harmônica e ordenada nos túbulos seminíferos e que é controlada e regulada principalmente pela expressão de uma variedade de genes expressos nos testículos. A desregulação destes genes costuma resultar na aparição de fenótipos de

infertilidade (Larriba & Bassas, 2018). Inicialmente, foram descritos 3000 genes envolvidos na espermatogênese, no entanto, hoje se conhece que há 4000 genes envolvidos assim como 110 genes que codificam proteínas de união ao RNA e 137 RNAs longos não codificadores (lncRNA) (Jan et al., 2017) e junto a isto outros RNAs não codificadores como microRNA (miRNA) (Harchegani, Shafaghathian, Tahmasbpour, & Shahriary, 2018) e piwi-RNA (piRNA) (Cao et al., 2018) foram detectados nas células germinativas e, provavelmente tem um papel importante na espermatogênese e na infertilidade masculina (Salas-Huetos et al., 2020).

Resumidamente, a espermatogênese é um processo biológico complexo que envolve divisões mitóticas (fase pre-meiótica), divisões meióticas (fase meiótica) e transformações morfológicas (fase pós meiótica). Em cada uma das fases da espermatogênese humana são identificadas diversos subtipos celulares de acordo com a avaliação microscópica do tecido testicular (Muciaccia et al., 2013). Na fase prê-meiótica são detectadas espermatogônias tipo A_{dark} (células quiescentes), tipo A_{pale} (células em constante divisão mitótica) e tipo B (células em processo de diferenciação) (Rowley, Berlin, & Heller, 1971). Eventualmente, a espermatogonia tipo B se diferencia em espermatócito prê-leptoteno (DE ROOIJ & RUSSELL, 2000) onde ocorre a última duplicação de DNA antes de entrar na fase meiótica. Já na fase meiótica, os processos com maior importância como o pareamento dos cromossomos homólogos, recombinação meiótica e crossing-over ocorrem na prófase da primeira divisão meiótica. Logo depois da prófase I, os espermatócitos passam por duas divisões meióticas que resulta na geração de espermátides haplóides (Holstein, Schütte, Becker, & Hartmann, 1987). Na fase pós-meiótica ocorrem mudanças morfológicas muito importantes nas espermátides, assim foram amplamente descritas a compactação da cromatina, reorganização do citoplasma e organelas e finalmente o desenvolvimento da calda com a finalidade de gerar espermatozóides (Haiqi Chen, Mruk, Xiao, & Cheng, 2017) (Figura 6).

Em humanos, o conhecimento sobre todos os processos moleculares que controlam e regulam a espermatogênese é limitado. Os estudos de expressão gênica global ou também nomeado como Transcriptoma, realizados no tecido testicular são utilizados na identificação de genes provavelmente envolvidos na falha da espermatogênese. Por exemplo, na literatura foram relatados perfis de RNA mensageiro do tecido testicular com diferentes fenótipos histológicos obtidos de indivíduos com infertilidade utilizando plataforma de microarranjos de expressão gênica, os quais sugerem que a espermatogênese é controlada por uma complexa

rede de vias moleculares (Ellis et al., 2007; Feig et al., 2007; Fox et al., 2003; Gatta et al., 2010; Rockett, Patrizio, Schmid, Hecht, & Dix, 2004; Spiess et al., 2007; Zhuang et al., 2015).

O primeiro trabalho sobre a expressão gênica global no tecido testicular visou implementar a tecnologia dos microarranjos de expressão gênica para a identificação de genes diferencialmente expressos entre indivíduos com fertilidade comprovada e indivíduos com infertilidade diagnosticada por aplasia de células germinativas (SCOS). Este trabalho apresentou o padrão inicial do transcriptoma do testículo envolvendo genes autossômicos e ausência na detecção de genes dos cromossomos sexuais (Fox et al., 2003). Estes resultados foram confirmados por outro grupo de pesquisa que estudou a primeira variação dos perfis de expressão gênica, incluindo a parada na maturação de células germinativas no estudo. Assim mesmo estabeleceram que estes padrões são replicáveis no camundongo como organismo modelo de estudo de infertilidade masculina (Rockett et al., 2004).

Em 2007, um grupo de pesquisa propôs a variação no perfil transcricional de indivíduos com diversas manifestações fenotípicas patológicas no tecido testicular em homens com infertilidade primária. Desta maneira, eles analisaram biópsias de testículo que apresentavam falha no desenvolvimento das células germinativas e incluíram indivíduos com histologia de SCOS e obstrução dos túbulos seminíferos (OA). Este trabalho resultou na detecção da variação da expressão gênica de 1181 genes provavelmente associados a infertilidade primária (Feig et al., 2007; Spiess et al., 2007). Paralelamente, outro grupo de pesquisa corroborou estes resultados e mostrou que além dos principais tipos de tecido patológico na infertilidade, outras patologias como por exemplo a varicocele também desenvolvem alteração nos níveis de expressão gênica nos testículos (Ellis et al., 2007). Igualmente, os perfis de expressão gênica global foram acessados com a finalidade de identificar marcadores molecular associados a infertilidade masculina idiopática com fenótipo histológico de SCOS. Os resultados mostraram que existe uma assinatura de genes reprimidos e muito expressos nos testículos com aplasia de células germinativas por causa desconhecida e que a maioria dos genes desregulados estão diretamente associados com a espermatogênese (Okada et al., 2008).

Como descrito anteriormente, as microdeleções na região AZF estão diretamente associadas aos fenótipos histológicos de infertilidade primária (Peter H. Vogt et al., 2017), embora estas microdeleções possam gerar a perda na expressão dos genes localizados nestas regiões como sugerido em trabalhos anteriores (A. Ferlin, Moro, Garolia, & Foresta, 1999; A

Ferlin et al., 2005; Foresta, Ferlin, & Moro, 2000), foi o trabalho publicado em 2010 que descreveu pela primeira vez a expressão global de genes autossômicos e dos cromossomo sexuais assim como os processos biológicos associados em biópsia testicular de indivíduos com microdeleções na região AZFc; porém os resultados mostraram que não existe um padrão único de expressão gênica dos genes do cromossomo Y entre os portadores das microdeleções o que sugere um mecanismo de regulação do desenvolvimento das células germinativas independente deste cromossomo (Gatta et al., 2010) desde que as microdeleções AZFc não afetam o desenvolvimento da espermatogonia (Nickkholgh, Korver, van Daalen, van Pelt, & Repping, 2015).

Assim como as microdeleções, a síndrome de Klinefelter é uma das causas cromossômicas com maior frequência na infertilidade masculina. Por isto o estudo de expressão gênica global foi realizado com a finalidade de entender o mecanismo molecular que envolve os testículos na perda de células germinativas, assim como a fibrose e hialinização dos túbulos seminíferos, porém os resultados só confirmaram o que já era conhecido sobre a síndrome de célula de Sertoli-only (SCOS) e identificar variações de expressão gênica entre indivíduos com síndrome de Klinefelter puro e aqueles que apresentaram um cariótipo em mosaico e apresentavam hipoespermatogênese (D'Aurora et al., 2015, 2017).

A infertilidade masculina idiopática é um desafio devido à ausência de causas genéticas detectadas por metodologias tradicionais como o cariótipo ou as microdeleções no cromossomo Y, e os indivíduos afetados desenvolvem histologias testiculares semelhantes as detectadas nas etiologias genéticas. Isto sugere a existência de um fator genético intrínseco que poderia desencadear o fenótipo de infertilidade. Assim o trabalho realizado em 18 indivíduos com histologia testicular compatível com a parada na maturação de células germinativas em diferentes estádios e síndrome de célula de Sertoli-only, porém todos com causas desconhecidas, mostrou pela primeira vez que as assinaturas de RNA mensageiro são semelhantes entre os indivíduos de um mesmo grupo e divergem significativamente com os outros grupos. Assim o trabalho relatou pela primeira vez marcadores de infertilidade primária idiopática obtidos a partir de experimentos de expressão gênica global (Malcher et al., 2013).

Ainda que a metodologia de microarranjos para estudo da expressão gênica norteie os estudos dos genes que controlam a espermatogênese e mostrou para a comunidade científica que podemos detectar assinaturas gênicas em tipos de tecido testicular diferentes, é necessário

a quantificação absoluta dos transcritos tanto no tecido completo como em cada célula componente da estrutura do testículo (Larriba & Bassas, 2018)

Nos últimos cinco anos, o desenvolvimento das tecnologias de sequenciamento de segunda geração abriu a possibilidade de explorar o transcriptoma do tecido testicular de forma global e absoluta, quer dizer analisando todos os componentes presentes no tecido assim como os processos biológicos e vias gênicas que regulam a espermatogênese (Govindkumar et al., 2019; Jan et al., 2018, 2017; Paduch et al., 2019; Winge et al., 2018; Wu et al., 2020; Zhu et al., 2016) assim como a descrição detalhada dos genes expressos em cada uma das células germinativas, somáticas e epiteliais presentes no tecido testicular utilizando a metodologia de sequenciamento de segunda geração de célula única (single-cell RNAseq) (Guo et al., 2018; Hermann et al., 2018; Sohni et al., 2019; Soraggi et al., 2020).

O primeiro transcriptoma do tecido testicular obtido por sequenciamento de segunda geração em 2016 foi realizado com o intuito de detectar as mudanças do transcriptoma no desenvolvimento das células germinativas no testículo. A metodologia dos microarranjos mostrou a existência destas mudanças entre diferentes tipos de tecidos, o sequenciamento foi realizado em células germinativas obtidas do tecido testicular de indivíduos com espermatogênese completa, e cultivadas em laboratório. Assim, foi possível obter as variações nos níveis de expressão dos genes em espermatogônias, espermatócitos e espermátides. Os autores relataram que a dinâmica do transcriptoma durante a espermatogênese poderia ser orquestrado por um grupo de genes específicos de cada tipo celular (Zhu et al., 2016).

Sobre o mesmo ponto de vista, outro trabalho de sequenciamento de segunda geração em biópsias de testículo de indivíduos saudáveis revelou a detecção de 4000 genes diretamente associados a espermatogênese, assim como outros tipos de RNA não codificadores que participariam deste processo biológico. Os autores realizaram a microdissecção das linhagens celulares observadas no testículo normal com a finalidade de quantificar os níveis de expressão gênica por cada estágio da espermatogênese. Assim a primeira conclusão que eles obtiveram foi que o perfil transcritômico do testículo é menor quando as células germinativas são mais diferenciadas. Por exemplo, a fase pré-meiótica tem expressão de 12000 transcritos e esta quantidade se reduz quando a célula germinativa se diferencia em espermatócito, desta maneira as células pré-meióticas e pós-meióticas tem diferença nas assinaturas de expressão gênica (Jan et al., 2017). Já no tecido testicular de indivíduos com infertilidade masculina e falha na espermatogênese, é possível observar padrões de expressão gênica diferentes de acordo ao estágio em que a espermatogênese se deteve e o desenvolvimento das células

germinativas parou promovendo até a morte desta linhagem celular presente no testículo (Jan et al., 2018).

Em 2018, dois grupos publicaram em paralelo os resultados das pesquisas envolvendo a caracterização transcricional das células contidas no tecido testicular, como células germinativas, células de Sertoli, células de Leydig, células epiteliais, macrófagos e células mioides utilizando a metodologia de Single-cell RNAseq (Guo et al., 2018; Hermann et al., 2018). O primeiro trabalho teve como objetivo identificar os genes responsáveis pela manutenção das células tronco de espermatogônia e os mecanismos moleculares envolvendo a diferenciação da espermatogônia assim como o desenvolvimento da gametogênese. O trabalho foi realizado em biópsias de testículo humano de doadores com espermatogênese completa e ausência de infertilidade obstrutiva ou não obstrutiva. Como resultado os pesquisadores obtiveram as primeiras assinaturas de expressão gênica para cada tipo celular estudado e desta maneira classificaram os genes de acordo com o nível de expressão que apresentaram nos tipos celulares. Assim, observaram que o maior número de genes era altamente expresso nos primeiros estádios da espermatogênese até a fase de espermátide não alongada. Já as espermátides alongadas como os espermatozóides compartilham assinaturas de expressão gênica. Finalmente os pesquisadores mostraram que as células tronco de espermatogônia, passam por cinco estádios antes de se diferenciar em espermatogônia e esta transição está controlada por 2186 genes expressos exclusivamente neste tipo celular (Guo et al., 2018).

De acordo com o trabalho acima citado, o segundo estudo publicado em 2018 confirmou a mudança na dinâmica transcricional que acontece na transição de espermátides não alongadas para espermátides alongadas controlada por um grupo de genes marcadores deste tipo celular. Além disso, os autores deixaram claro que esta dinâmica das células germinativas masculinas humanas, são conservadas no modelo de camundongo abrindo a possibilidade de novos estudos sobre infertilidade masculina neste modelo. Outrossim, os autores identificaram três estádios com base na variação da expressão gênica e que a espermatogônia apresenta antes de entrar na fase de diferenciação em espermátide. Com tudo, o estudo mostrou que há cluster de genes que controlam o desenvolvimento das células germinativas e revelou novos marcadores dos estádios das espermatogônias (Hermann et al., 2018).

Um grupo de pesquisa da Universidade de Califórnia, San Diego, continuaram a busca de marcadores que possam explicar o desenvolvimento das células progenitoras de

espermatogônia em espermatogônia. Para isto eles desenvolveram a caracterização da expressão gênica a nível de célula em tecido testicular de adultos e neonatos. O intuito foi determinar a dinâmica transcricional das células germinativas e das células somáticas presentes no testículo e observar os padrões de células primordiais do testículo em desenvolvimento para assim comparar os padrões de expressão gênica no testículo entre a idade inicial e adulta da vida do homem. O estudo identificou novos estádios das espermatogônias que não foram identificados nos estudos anteriores. Como esperado, os tecidos testiculares de neonatos apresentaram menor quantidade de células germinativas quando comparado com o tecido adulto, entretanto o número de células primordiais ou progenitoras de espermatogônia ou células tronco de espermatogônia foi suficiente para identificar novos marcadores moleculares altamente expressos no início do desenvolvimento das células germinativas. Enquanto, as células somáticas, unicamente as células de Leydig e as células mióides apresentam mudanças de expressão gênica entre o neonato e o adulto indicando que estas linhagens celulares passam por um processo de desenvolvimento controlado por alguns genes marcadores destes tipos celulares (Sohni et al., 2019).

Dinâmica da expressão gênica na Espermatogônia Guo et al., 2018

Marcadores moleculares de RNAm no desenvolvimento das células germinativas Hermann et al., 2018

Assinaturas de genes controladores dos estádios das células germinativas Sohni et al., 2019

Figura 7. Identificação molecular dos genes envolvidos no desenvolvimento das células germinativas utilizando a metodologia de sequenciamento de segunda geração para detecção de RNA mensageiro (RNA-seq).

Os três estudos acima relatados concordam com o fato da exclusividade de certos genes para uma determinada linhagem ou tipo celular (Figura 7) porém só foi em 2020 que um grupo de pesquisa da Universidade de Aarhus na Dinamarca, realizaram o estudo Bioinformático e sistemático dos resultados obtidos em 3 indivíduos do estudo de Guo et al., 2018, 4 indivíduos do estudo de Hermann et al., 2018 e os dois indivíduos do estudo de Sohn et al., 2019. O resultado destas publicações revela as assinaturas de expressão gênica que existem em cada tipo celular presente no testículo humano (Soraggi et al., 2020). O resultado é concordante com os dados apresentados por um grupo de pesquisa chinês que utilizou uma plataforma experimental diferente porém com objetivos similares para caracterizar a dinâmica em que os transcritos se expressam dentro do tecido testicular (M. Wang et al., 2018).

1.5 As assinaturas de microRNA variam de acordo ao fenótipo testicular observado e controlam os genes envolvidos na geração de gametas

Os microRNAs são pequenas moléculas de RNA de simples fita não codificadores de proteína com tamanho de 18 a 24 nucleotídeos produzidos nas células de forma endógena. Estas moléculas de RNA têm como principal função a regulação da expressão gênica mediante a formação de estruturas complementarias com a região 3'UTR dos genes alvo (Ambros, 2001).

Os miRNAs são transcritos a partir de diversas regiões do genoma, incluindo unidades codificadoras e não codificadoras de proteínas. Eles possuem 7-metil guanosina na extremidade 5' e cauda poli (A) na extremidade 3', semelhante aos mRNAs (Starega-Roslan, Koscianska, Kozlowski, & Krzyzosiak, 2011)

A biossíntese dos microRNA (miRNA) ocorre em uma via não canônica de síntese de RNA, utilizando assim um mecanismo próprio e exclusivo para este tipo de molécula. Brevemente, os microRNA são transcritos pela enzima RNA polimerase II dentro do núcleo, gerando assim uma estrutura em forma de grampo nomeada como pri-miRNA. Esta estrutura é processada pela enzima Drosha, um membro da família de enzimas RNpAse III, gerando assim uma nova estrutura com o nome de pre-miRNA, caracterizada ainda pela estrutura de duplex de RNA em forma de grampo, porém com um tamanho molecular menor à pri-miRNA. O pre-miRNA é exportado para o citoplasma pela exportina 5, uma proteína de membrana nuclear e já no citoplasma, a molécula de RNA é processada pela enzima Dicer, um membro da família das RNase III, que promove o desenrolamento da estrutura de duplex de RNA em forma de grampo, gerando uma nova estrutura conhecida como microRNA maduro que pode ser uma das fitas da estrutura ou ambas. Este microRNA é incorporado ao complexo RISC, um complexo ribonucleoproteico encarregado da repressão da expressão de genes mediante a degradação ou a repressão da tradução do RNAm. O microRNA funciona como uma fita de instruções para determinar quais serão os genes que sofreram repressão da expressão gênica. Um único microRNA pode controlar a expressão de multiplos genes assim como múltiplos microRNAs podem controlar a expressão de um único gene (Pritchard, Cheng, & Tewari, 2012).

Estudos mostram que os miRNAs têm um papel fundamental em diversos processos biológicos, incluindo o desenvolvimento (Alvarez-Garcia & Miska, 2005), proliferação celular (Lenkala et al., 2014) e diferenciação (Shivdasani, 2006). Além disso, vários estudos

descrevem a participação de diversos miRNAs em processos patológicos como no câncer (Croce, 2009).

As bases moleculares da infertilidade masculina são ainda pouco estudadas, entretanto já existe evidência da participação de RNAs não codificadores como os microRNAs no controle e regulação da diferenciação das células germinativas, espermatogênese, maturação e função dos espermatozoides (Daneshmandpour et al., 2020; Harchegani et al., 2018; Salas-Huetos et al., 2020) e na infertilidade masculina associada aos distintos tipos de fenótipos teciduais observados nos testículos e epidídimo (Tabela 2).

De fato, alguns microRNAs são exclusivamente expressos num determinado tipo de célula germinativa enquanto outros são expressos na maioria de células somáticas presentes nos testículos (X. Chen, Li, Guo, Zhang, & Zeng, 2017) (Figura 8). Agora por exemplo sabemos que as espermatologias utilizam microRNAs na própria regulação (Q. Yang et al., 2013), autorenovação (J. Chen et al., 2017; He et al., 2013) e na mitose; estes processos são muito importantes para garantir o início da espermatogênese no testículo, os microRNA validados experimentalmente como hsa-miR-34c, a família hsa-miR-let7 e a família miR-290-295 são expressos na maioria de células germinativas porém regulam o desenvolvimento das espermatogônias (Bouhallier et al., 2010; Niu et al., 2011; Q. Yang et al., 2013).

A segunda etapa mais importante da espermatogênese consta de divisões meióticas necessárias para a recombinação do material genético. Este processo ocorre nos espermátócitos, o tipo celular apresenta níveis de expressão altos de microRNAs das famílias de miR-34 e miR-449 provavelmente envolvidos na regulação de genes de proliferação e diferenciação celular como *NOTCH2* (Bouhallier et al., 2010), *BCL2* e *ATF1* (X. Chen et al., 2017). A expressão do has-miR-122 foi detectada nos estádios post-meióticos e sua validação em modelos de laboratório confirmaram sua participação na remodelação da cromatina nos espermátócitos, regulando a expressão do gene *TPN2* (Yu, Raabe, & Hecht, 2005).

A dinâmica de expressão de microRNA no tecido testicular segue o mesmo padrão que a expressão gênica, desta forma já na espermiogênese é perdida a expressão de muitos microRNAs. Só os microRNA necessários para o processo de fecundação são mantidos nos até chegar no estágio de espermatozoides (C. Li & Zhou, 2012) e são detectados junto aos microRNAs presentes nos exosomas e microvesículas presentes no líquido seminal (C. Wang et al., 2011).

A busca de microRNA como biomarcadores e continuamente atualizada pela detecção de novos candidatos com participação na espermatogênese ou manutenção no testículo ou

epidídimo para o diagnóstico molecular de azoospermia, oligospermia, asthenospermia e teratozoospermia (Daneshmandpour et al., 2020). Estudos dos últimos 20 anos buscando microRNA como marcadores de infertilidade masculina estão resumidos na tabela 2. O banco de dados de microRNAs conhecido como miRBase (Release 22.1, outubro 2018; <http://www.mirbase.org/>) traz um registro de 1917 microRNAs humanos validados. Porém, novos microRNAs estão sendo descobertos com a ajuda do sequenciamento de segunda geração e a Bioinformática de dados genômicos a grande escala. Assim, como nova e importante peça do processo de regulação gênica, os microRNAs apresentam diversas e cruciais funções biológicas nas células animais e tem sido alvo de muito interesse para estudo nos últimos anos.

Finalmente, até existe um único estudo que visou a caracterização integrada da expressão de microRNAs y RNAs mensageiros em indivíduos com infertilidade primária. Os resultados mostraram que é possível detectar as assinaturas de ambos grupos de RNAs e estas são complementarias. Os processos biológicos envolvidos na falha na espermatogênese de estes indivíduos apontam a desregulação do ciclo celular assim como alterações nas vias de sinalização que promovem a proliferação celular (Zhuang et al., 2015).

Nosso grupo de pesquisa desenvolveu estudos de expressão diferencial de microRNA em biópsias frescas de testículo de homens com infertilidade masculina idiopática. Os indivíduos foram divididos em três grupos de acordo a análise histopatológico do tecido testicular: 1) Azoospermia obstrutiva, porém com espermatogênese completa (OA); 2) Parada na maturação de células germinativas (MA) e 3) Síndrome de célula de Sertoli (SCOS). O trabalho de Doutorado concluiu que são detectadas assinaturas de microRNA específicas para cada tipo de tecido, agrupando os integrantes de cada fenótipo em 3 clusters correspondentes com o tipo de histologia. Além disso, no trabalho foram detectados microRNAs diferencialmente expressos quando comparados os grupos OA vs MA, OA vs SCOS e MA vs SCOS. O impacto de desregulação foi maior nos indivíduos com SCOS pelo fato da aplasia das células germinativas no tecido. Os microRNA foram classificados funcionalmente e detectou-se a alteração de vias de regulação associadas à proliferação celular e ciclo celular (Dias, 2018).

Por isso tudo, observamos a necessidade de continuar o estudo molecular sobre a expressão de todos os tipos de RNAs presentes no tecido testicular em virtude de entender os mecanismos que poderiam levar a o desenvolvimento de patologias testiculares que resultam em infertilidade primária, assim mesmo buscamos entender a dinâmica molecular que

acontece no testículo de homens com etiologias genéticas, as mesmas que poderiam dar uma visão de possíveis tratamentos da infertilidade em homens. Assim decidimos utilizar as novas metodologias de quantificação da expressão gênica como o sequenciamento de próxima geração para RNAm (RNAseq) e microRNA (smallRNAseq) em tecidos parafinados e frescos de biópsia de testículo que guardam informação muito importante sobre a complexidade molecular deste tecido. E finalmente obter correlações entre tipos de tecidos, etiologias, tipo de amostra e transcriptoma/fenótipo.

Tabela 2. Estudos de expressão de microRNAs realizados nos últimos 20 anos no testículo/epidídimo com foco na caracterização molecular de novos marcadores da infertilidade masculina.

Estudo / Referência	Características clínicas e/ou patológicas	Tipo de amostra	Objetivo da pesquisa	Principais conclusões
A) RT-qPCR				
(Liang, Ridzon, Wong, & Chen, 2007)	Testículos com espermatogênese completa.	Biópsia fresca	Padrões de expressão de microRNA.	15 microRNA exclusivos nos testículos.
(J Lian et al., 2010)	Testículos com Parada na maturação, hipo-espermatogênese e SCOS.	Biópsia fresca	Função do microRNA hsa-miR-383	hsa-miR-383 é expresso nas espermatogônias e espermátócito primários nos testículos.
(Munoz et al., 2015)	Testículos com Parada na maturação, SCOS e obstrução dos túbulos seminíferos.	Biópsia fresca	Expressão celular dos padrões de microRNA	As diferentes patologias histológicas apresentam um padrão de expressão de microRNA específico associado com a desregulação de processos biológicos importantes no testículo.
(Tang, Huang, Liu, & Zhang, 2016)	Testículos com parada na maturação, SCOS e obstrução nos túbulos seminíferos.	Biópsia fresca	Mecanismo de regulação do hsa-miR-210 na espermatogênese.	hsa-miR-210 é super expresso nas condições patológicas de parada na maturação e SCOS.
(Tian et al., 2013)	Testículos com Parada na maturação, hipo-espermatogênese e obstrução dos túbulos seminíferos.	Biópsia fresca	Expressão do hsa-miR-383 em amostras de testículo.	A expressão do hsa-miR-383 é reduzida em algumas amostras com parada na maturação.

Estudo / Referência	Características clínicas e/ou patológicas	Tipo de amostra	Objetivo da pesquisa	Principais conclusões
B) <u>Microarrays</u>				
(Barad et al., 2004)	Testículo com espermatogênese completa.	Biópsia fresca	Padrões de expressão de microRNA no testículo.	5 microRNA específicos e altamente expressos no testículo.
(Y. Liu et al., 2015)	Testículos com obstrução nos túbulos seminíferos.	Biópsia fresca	Identificação de microRNA diferencialmente expressos entre tipos de células germinativas: espermatogônia, espermatócito e espermátide.	110 microRNA diferencialmente expressos entre a espermatogônia e espermatócito; 193 microRNA diferencialmente expressos entre espermatócitos e espermátides; 316 microRNA diferencialmente expressos entre espermatogônia e espermátide.
(Abu-Halima et al., 2014)	Testículo com SCOS, Parada na maturação, atrofia mista e obstrução dos túbulos seminíferos.	FFPE	Padrões de expressão de microRNA nos diferentes tipos de tecido patológico.	197 microRNA diferencialmente expressos em SCO; 68 em parada na maturação e 46 na atrofia mista.
(Jie Lian et al., 2009)	Testículos com parada na maturação e obstrução nos túbulos seminíferos.	Biópsia fresca	Identificar microRNA diferencialmente expressos na parada na maturação.	173 microRNA diferencialmente expressos.
(Noveski et al., 2016)	Testículo com hipoespermatogênese, SCOS, parada na maturação, microdeleções AZF, S. de Klinefelter e obstrução dos túbulos seminíferos.	FFPE	Caracterizar os padrões de expressão de microRNA.	6 microRNA em AZF, 30 na parada de maturação, 52 em SCOS e ausência na S. de Klinefelter.

Estudo / Referência	Características clínicas e/ou patológicas	Tipo de amostra	Objetivo da pesquisa	Principais conclusões
(Zhang et al., 2020)	Testículo com parada na maturação de células germinativas	Biópsia fresca	Identificação de padrões de microRNA.	129 microRNA diferencialmente expressos.
(Zhuang et al., 2015)	Testículos com parada na maturação e obstrução dos túbulos seminíferos.	Biópsia fresca	Identificação de microRNA desregulados.	93 microRNA diferencialmente expressos detectados no testículo.
(Belleannée et al., 2012)	Epidídimo com espermatogênese normal	Biópsia fresca	Caracterizar a expressão de microRNA no epidídimo.	35 microRNA detectados como diferencialmente expressos em diferentes regiões do epidídimo.
C) <u>Small-RNA-seq</u>				
(Q. Yang et al., 2013)	Testículos com espermatogênese normal.	Biópsia cadáver	Expressão de microRNA no testículo com espermatogênese completa.	770 microRNA conhecidos e 5 novos microRNA.
(Tang et al., 2018)	Testículos com criptorquidia e obstrução dos túbulos seminíferos.	Biópsia fresca	Perfis de expressão de microRNA na criptorquidia.	449 microRNA diferencialmente expressos.
(Fang et al., 2019)	Testículos com parada na maturação e SCOS.	Biópsia fresca	MicroRNAs diferencialmente expressos entre a parada na maturação e SCOS.	180 microRNAs diferencialmente expressos.
(Yao et al., 2017)	Testículos com parada na maturação de células germinativas e obstrução dos túbulos seminíferos.	Biópsia fresca	Perfil de expressão de microRNA na espermatogônia, espermátocito e espermátide.	396 microRNA diferencialmente expressos na espermatogônia; 395 nos espermátocitos; 378 nas espermátides.
(Browne, Leir,	Epidídimo com espermatogênese	Biópsia fresca	Identificar expressão regional	259 microRNA exclusivos do

Estudo / Referência	Características clínicas e/ou patológicas	Tipo de amostra	Objetivo da pesquisa	Principais conclusões
Egger, & Harris, 2018)	normal.		de microRNAs no epidídimo.	epidídimo.
(Y. Li et al., 2012)	Epidídimo com espermatogênese completa.	Biópsia cadáver	Perfil de expressão de microRNAs no epidídimo.	527 microRNAs conhecidos.

*FFPE: Biópsia parafinizada.

Figura 8. Localização da expressão de microRNA nos diversos tipos celulares encontrados no tecido testicular. Leydig cells: células de Leydig. SCs: células de Sertoli. SSCs: células tronco ou progenitoras de espermatogônia. SPG: espermatogônia. PSPC: espermatócito primário. SSPC: espermatócito secundário. RS: espermátide não alongada. SPs: espermátide. Figura obtida de Harchegani et al., 2018.

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Identificar os mecanismos moleculares desregulados na infertilidade masculina primária causada por diversas etiologias, utilizando a detecção e quantificação de moléculas de RNA no tecido testicular de três fenótipos histopatológicos.

2.2 Objetivos específicos

- ✓ Caracterização molecular das principais etiologias genéticas da infertilidade masculina.
- ✓ Quantificação de RNA mensageiro nos testículos.
- ✓ Quantificação de microRNA nos testículos.
- ✓ Correlacionar os resultados da quantificação molecular de RNA e os resultados clínicos dos indivíduos com infertilidade masculina primária.

Hipótese do Trabalho

3 HIPÓTESE DO TRABALHO

Os mecanismos moleculares da infertilidade masculina são ainda pouco conhecidos devido à grande diversidade de etiologias e fenótipos que apresentam os homens e à dificuldade do estudo *in situ* do tecido afetado.

Por isto, neste trabalho pretendemos testar a hipótese de que “Os genes autossômicos e dos cromossomos sexuais estariam sujeitos a variação dos níveis de expressão gênica entre grupos histopatológicos ou etiológicos de homens com azoospermia ou oligozoospermia grave” com a finalidade de compreender melhor os processos biológicos envolvidos na patogênese e quais são vias gênicas e metabólicas desreguladas nos tecidos patológicos quando comparados com um tecido que apresenta espermatogênese completa.

Avaliação e Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa

4 AVALIAÇÃO E APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

O presente trabalho foi APROVADO pelo COMITE DE ETICA EM PESQUISA (CEP) do HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO sob o registro CAAE: 35888720.3.0000.5440 e NÚMERO DO PARECER: 4.191.253. O Parecer Consubstanciado do CEP encontra-se nos ANEXOS neste trabalho.

Material e Métodos

5 MATERIAL E METODOS

5.1 Metodologia

5.1.1 Desenho experimental

O presente trabalho visou a obtenção, análise e descrição de dados de expressão gênica e de microRNA em biópsia parafinada de testículo com a finalidade de entender os mecanismos moleculares envolvidos na infertilidade masculina primária. Para isto desenhamos um estudo descritivo-quantitativo para correlacionar os dados de biologia molecular com a casuística clínica dos participantes.

Figura 9. Esquema de trabalho com biópsias de testículo parafinizadas. QC: controle de qualidade. Seq: Sequenciamento por NGS. $\Delta\Delta Cq$: Método de análise de expressão gênica.

Figura 10. Esquema de trabalho com biópsias de testículo. QC: controle de qualidade. Seq: Sequenciamento por NGS. $\Delta\Delta Cq$: Método de análise de expressão gênica

5.1.2 Amostra e informações clínicas

Para o estudo realizado em biópsias parafinizadas de testículo (Figura 9), foram selecionados os indivíduos atendidos no ambulatório de Infertilidade do Hospital de Clínicas FMRP/USP entre os anos de 2001 e 2016 que apresentavam infertilidade primária e que foram assistidos nos procedimentos de FIV (Fecundação in vitro) ou ICSI (Injeção intracitoplasmática de espermatozoides). Assim coletamos os blocos de parafina da biópsia de testículo armazenadas no Laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP (SERPAT). Além disso, foram obtidas as lâminas contendo cortes dos blocos com a finalidade de observar o tipo de tecido contido no bloco de parafina e as informações clínicas como espermograma e níveis hormonais foram obtidas dos prontuários de cada indivíduo. Desta maneira classificamos as amostras de acordo com a etiologia e o tipo de tecido testicular.

No caso do estudo molecular em biópsia fresca de testículo (Figura 10), foram coletadas 21 amostras de biópsia testicular e sangue periférico de homens inférteis que estavam sendo assistidos pelos médicos do ambulatório de Infertilidade do Hospital de Clínicas FMRP/USP e submetidos aos procedimentos de biópsia de testículo por TESE (*Testicular Sperm Extraction*) ou microTESE (*Microdissection Testicular Sperm Extraction*). Estes pacientes estavam em tratamento para a realização da fertilização in vitro.

O tecido coletado era dividido em dois fragmentos. Um fragmento era congelado em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta e mantidos desta forma até o momento da extração do RNA. O outro fragmento era acondicionado em um frasco contendo fixador e enviado para análise histopatológica. O sangue periférico era coletado em dois tubos Vacutainer®. Um tubo de 10 mL contendo heparina sódica, destinada à cultura temporária de linfócitos para exame citogenético (cariótipo) e o outro tubo de 4 mL contendo EDTA, destinadas à extração de DNA.

Antes da coleta do material biológico dos pacientes todas as informações a respeito do projeto de pesquisa eram fornecidas ao paciente e eventuais dúvidas eram esclarecidas e ao final o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido era assinado.

Informações sobre exames subsidiários como espermograma, níveis hormonais e histopatológico, foram obtidos a partir de pesquisa realizada no prontuário Hospital das Clínicas FMRP/USP dos pacientes com a supervisão do Professor Doutor João Monteiro de Pina Neto.

5.1.2.1 Casuística das amostras parafinadas

Os resultados publicados na Tese de doutorado intitulada “Estudo citogenético e molecular da esterilidade masculina humana” (R. D. C. V. Carrara, 2000), assim como os dados apresentados no trabalho de (Pina-Neto et al., 2006) foram utilizados na seleção de 16 amostras parafinadas de indivíduos com infertilidade primária avaliados pela genética médica e com resultados laboratoriais de citogenética somática e germinativa assim como resultados moleculares, hormonais e de anatomia patológica (Tabela 3).

O grupo I contém 3 indivíduos que apresentaram o resultado da patologia compatível com espermatogênese completa, assim mesmo o cariótipo e análise de meiose no testículo eram normais. Não apresentaram alterações hormonais nem alterações na análise molecular de detecção de microdeleções na região AZF do cromossomo Y ou alterações no gene receptor de andrógenos (AR) ou mutações no gene CFTR que causa a fibrose quística.

O grupo II contém 4 indivíduos com resultado de anatomia patológica do testículo correspondente a parada na maturação das células germinativas. Dois dos quatro indivíduos foram diagnosticados com etiologia idiopática que apresentaram alteração na análise de meiose no testículo correspondente com o bloqueio meiótico no espermátócito I e os exames hormonais e moleculares sem alteração. Outrossim, um indivíduo apresentou uma translocação robertsoniana envolvendo os cromossomos 13 e 14 e a análise meiótica no testículo resultou na detecção do bloqueio meiótico na prófase I. Já os resultados moleculares do indivíduo com o rearranjo cromossômico não apresentaram alteração. O último indivíduo do grupo II apresentou um cariótipo normal, a análise meiótica mostrou o bloqueio da meiose no espermátócito I e os resultados moleculares detectaram uma microdeleção na região AZFc do cromossomo Y.

O grupo III está composto por 9 indivíduos com aplasia de células germinativas. Os resultados de meiose no testículo confirmaram a ausência de células meióticas. Dois dos nove indivíduos apresentaram um cariótipo normal, porém com o resultado de microdeleções na região AZF alterado. Um dos indivíduos apresentou um cariótipo alterado 45, XY+frag e detecção de 13 microdeleções no cromossomo Y. Dois indivíduos apresentaram o cariótipo alterado compatível com a síndrome de Klinefelter e ausência de alterações nos resultados moleculares. Finalmente, foram também escolhidos 4 indivíduos com diagnóstico de infertilidade masculina primária idiopática com cariótipo normal e sem alterações nos resultados moleculares.

Tabela 3. Características das amostras parafinadas utilizadas no estudo.

SEPAT*	LGHM**	Etiologia	Cariótipo	Meiose	Resultados moleculares
Espermatogênese Completa (OA)	J9OA	Espermatogênese Completa	46, XY	Meiose Completa (Grupo A)	Sem alteração
	J13OA				
	J16OA				
Parada na Maturação de Células Germinativas (MA)	J6MA	Idiopáticos	46, XY	Bloqueio meiótico no Espermatócito I	Sem alteração
	J7MA				Sem alteração
	J2MA	Translocação Robertsoniana	45, XY, rob (13q;14q)	Bloqueio na Prófase I	Sem alteração
	J4MA	Microdeleções na AZF	46, XY	Bloqueio meiótico no Espermatócito I	Microdeleção em Yq11
Aplasia de Células Germinativas (SCOS)	J1SCOS	Microdeleções na AZF	46, XY	-----	Microdeleção em Yq11
	J12SCOS		46, XY	-----	Microdeleção em Yq11
	J5SCOS		45, X +frag	-----	Microdeleção em Yq11
	J3SCOS	Síndrome de Klinefelter	47, XXY	-----	Sem alteração
	J8SCOS			-----	Sem alteração
	J10SCOS			-----	Sem alteração
	J11SCOS	Idiopáticos	46, XY	-----	Sem alteração
	J14SCOS			-----	Sem alteração
	J15SCOS			-----	Sem alteração

5.1.2.2 Casuística das amostras em biopsia fresca

Foram estudados 21 pacientes (I01-I21) com infertilidade masculina primária atendidos no ambulatório de Reprodução do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Tabela 4). Os pacientes foram inicialmente convidados a participar do estudo molecular do transcriptoma do testículo de homens infértis. Após assinar o Termo de Livre Consentimento Esclarecido, foram coletadas as amostras do sangue periférico e da biopsia de testículo durante o procedimento de TESE ou microTESE realizada pelo Médico Urologista correspondente.

Os resultados dos espermogramas disponíveis dos pacientes revelaram que I02, I18 e I19 apresentaram oligozoospermia grave ($> 0,1$ mlh/mL) e os outros pacientes apresentaram azoospermia.

Os dados de histopatologia, mostraram que 6 pacientes apresentaram o tecido testicular com espermatogênese completa com possível diagnóstico de obstrução dos vasos deferentes. Além disso, 8 pacientes apresentaram a histologia de parada na maturação de células germinativas e 5 pacientes apresentaram aplasia de células germinativas.

Nossa análise do cariótipo confirmou as alterações cromossômicas dos pacientes I01, I02, I06 e I20 descritas na tabela 4. Devido à falta de estudos moleculares nestes pacientes foi feita a análise molecular de detecção de microdeleções na região AZF do cromossomo Y.

Tabela 4. Participantes do estudo molecular do transcriptoma.

Participante	Diagnostico	Histologia	Cariotipo
I01	Azoospermia	SCOS	46,XY/47,XXY
I02	Oligozoospermia grave	MA	45,XY,t(13;14)
I03	Azoospermia	OA	46,XY
I04	Azoospermia	OA	46,XY
I05	Azoospermia	SCOS	46,XY
I06	Azoospermia	SCOS	47,XXY
I07	Azoospermia	MA	46,XY
I08	Azoospermia	MA	46,XY
I09	Azoospermia	SCOS	46,XY
I10	Azoospermia	OA	46,XY
I11	Azoospermia	OA	46,XY
I12	Azoospermia	OA	46,XY
I13	Azoospermia	MA	46,XY
I14	Azoospermia	MA	46,XY
I15	Azoospermia	MA	46,XY
I16	Azoospermia	SCOS	46,XY
I17	Azoospermia	OA	46,XY
I18	Oligozoospermia grave	MA	46,XY
I19	Oligozoospermia grave	MA	46,XY
I20	Azoospermia	MA	46,XY
I21	Azoospermia	SCOS	47,XXY

5.1.3 Extração de RNA total de amostras de biópsia de testículo parafinizadas (FFPE)

De acordo aos dados coletados nos prontuários dos participantes aplicamos critérios de seleção de amostras que iriam ser submetidas a análise por TruSeq-Exome RNA-Seq e Small-RNA-Seq para a caracterização molecular dos RNA mensageiros e microRNAs. Utilizamos os seguintes critérios: 3 blocos de biópsia parafinada de indivíduos com azoospermia obstrutiva, porém com espermatogênese completa, 4 blocos de biópsia parafinada de indivíduos com parada na maturação de células germinativas e 9 blocos de biópsia parafinada de indivíduos com síndrome de célula de Sertoli.

As amostras de biópsia parafinizada foram submetidas a extração de RNA utilizando o kit comercial Quick-RNA FFPE da empresa Zymo Research (cat: R1008) seguindo o protocolo fornecido pelo fabricante e com algumas modificações feitas para otimizar o rendimento da extração de RNA e microRNA.

Para a extração de RNA total foram obtidos um total de 10 cortes de 20 μM e uma superfície não maior de 20 mm^2 por amostra utilizando um micrótomo da empresa Leica. Inicialmente o micrótomo foi limpo cuidadosamente utilizando uma solução de RNase away da Invitrogen cat: 10328-011 que visa abolir a contaminação por RNA exógeno nas amostras processadas no equipamento. Seguido, foram utilizadas navalhas para histologia descartáveis de alto perfil da empresa Leica e foi utilizada uma navalha por amostra como controle de qualidade do experimento. Os cortes eram recolhidos em tubos Eppendorf de 1,5 mL previamente esterilizados. Para otimizar o cuidado com a contaminação, as luvas eram trocadas ao finalizar cada amostra assim como a limpeza do micrótomo era realizada após o processamento de cada amostra. Este procedimento foi realizado no Laboratório de Oncopatologia do departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP sob a supervisão do prof. Dr. Alfredo Ribeiro-Silva.

As amostras foram armazenadas até o processamento de extração de RNA em ambiente seco a temperatura ambiente seguindo os protocolos de biossegurança para o trabalho com amostras de bloco de parafina.

A extração do RNA foi realizada em cabina de exaustão previamente limpa com álcool 70% e esterilizada por 15 min com luz UV. O material e equipamento utilizado foram tratados com as mesmas condições acima descritas dentro da cabina de exaustão. Os experimentos envolvendo RNA foram realizados pelo pesquisador utilizando todas as medidas de biossegurança (por exemplo: uso de equipo de proteção individual, e troca de luva constante) com a finalidade de abolir a contaminação antes, durante e depois dos experimentos.

No processamento da amostra, foram adicionados 400 μL de uma solução de desparafinização no tubo de 1,5 mL contendo os cortes e em seguida a amostra foi incubada em banho seco a 55 °C por 1 minuto. Depois o tubo foi submetido a vórtex rapidamente por 5 segundos. Logo foi adicionada uma solução de digestão contendo 1X de buffer de digestão e 0,2 mg de proteinase K. As amostras foram incubadas a 55 °C por 4 horas. Após o tempo de digestão o tubo foi transferido para outro banho seco com temperatura de 65 °C por 15 minutos com a finalidade de reparar o RNA degradado.

O isolamento do RNA foi realizado utilizando 600 μL de buffer de lisis. Seguido, os tubos contendo as amostras foram submetidos a centrifugação por 1 min a 16000 $\times$ g. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo de 1,5 mL estéril e foram adicionados 700 μL de etanol absoluto (MERCK). Após misturar cuidadosamente, o conteúdo foi vertido na coluna Zymo-Spin IICR e levado a centrifugação por 30 segundos a 16000 $\times$ g a temperatura ambiente.

Como um terceiro controle de qualidade da nossa amostra, realizamos o tratamento com DNase para garantir a eliminação de qualquer tipo de DNA contaminante. Para isto, a coluna foi lavada com 400 μL de buffer de lavado e seguido foi levada a centrifugação a 16000 $\times$ g por 30 segundos. Uma solução contendo 5 unidades de DNase em 75 μL de buffer de digestão de DNA foi adicionado a coluna e foi deixado em repouso por 15 minutos a temperatura ambiente.

Logo depois foram adicionados 400 μL de buffer RNA-prep e os tubos foram levados para centrifugação a 16000 $\times$ g por 30 segundos. Seguido, duas lavagens utilizando o buffer de lavado foram realizadas com a finalidade de remover reagentes que poderiam contaminar nossa amostra.

Finalmente, a coluna foi transferida para um novo tubo de 1,5 mL e adicionaram-se 30 μL de água livre de DNase/RNase. Os tubos foram centrifugados a 16000 $\times$ g por 30 segundos e colocados imediatamente em gelo para garantir a integridade do RNA. O RNA extraído foi quantificado no Nanodrop para garantir concentrações acima de 100 ng por microlitro e valores de absorbância de 260/280 acima de 1,8.

5.1.3.1 Controle da qualidade do RNA

Com a finalidade de detectar expressão de genes em amostras de biópsia de testículo parafinadas, escolhemos a metodologia de sequenciamento do transcriptoma por captura de exons (Truseq-Exome RNA-Seq) que visa a detecção dos 20 mil genes humanos.

O RNA isolado a partir das 16 amostras selecionadas passou por rigorosos controles de qualidade com a finalidade de obter um material de partida dentro dos padrões estabelecidos nos protocolos de preparação de bibliotecas e sequenciamento. Inicialmente observamos que o maior rendimento de extração do RNA era obtido utilizando 10 cortes de 20 micras para cada amostra estudada. A primeira quantificação de concentração do RNA total oscilou entre 1 a 3 μg com valores de pureza (260nm/280nm) de 1,8 a 2.0 entre as

amostras submetidas a análise de quantificação e qualidade por espectrofotometria (Nanodrop) (Tabela 5).

Já na quantificação microfluídica (Bioanalyzer), observamos que os três parâmetros indicados no protocolo estavam dentro dos limites estabelecidos, desta maneira a concentração mais baixa obtida foi de 15 ng/μL e a máxima de 1047 ng/μL com valores de DV200 acima de 30% e RIN com valores variáveis (Figura 9-10). Este resultado era esperado pela complexidade do tipo de amostra. Além disso, um terceiro controle de qualidade foi realizado mediante a quantificação por fluorimetria no qual observamos que a menor concentração foi de 19,4 ng/μL e a maior de 71 ng/μL. Assim, todas as amostras apresentaram boa qualidade e foram submetidas ao preparo das bibliotecas com uma concentração final de 100 ng e logo depois ao sequenciamento (Tabela 5) (Figura 11 e Figura 12).

Figura 11. Gráficos de qualidade do RNA no Bioanalyzer mostrando o valor do DV200.

Figura 12. Gráficos de qualidade do RNA no Bioanalyzer mostrando o valor de DV200.

Tabela 5. Quantificação e controle de qualidade do RNA total extraído a partir de blocos de parafina contendo biópsia de tecido testicular

SEPAT*	LGHM**	Nanodrop (espectrofotometria)		Bioanalyzer (microfluidico)			Qubit (Fluorimeria)	Concentração
		ng/μL	Rendimento (μg)	ng/μL	Rendimento (μg)	DV200 (%)	(μg)	final (ng)
6939	J1SCOS	216,1	5,4	318	7,9	37	1,3	100
1959	J2MA	216,7	5,4	127	3,1	48	1,3	100
7048	J3SCOS	298,5	7,4	188	4,7	51	0,4	100
4468	J4MA	151,3	3,7	62	1,5	70	9,9	100
4589	J5SCOS	321,7	8	31	0,7	62	5,6	100
1084	J6MA	103	2,5	67	1,6	35	0,4	100
1070	J7MA	100	2,5	15	0,3	32	0,3	100
5954	J8SCOS	695,9	17,4	999	24,9	64	0,8	100
8139	J9OA	279,9	6,9	362	9	33	0,4	100
211	J10SCOS	273,1	6,8	213	5,3	72	1,4	100
8523	J11SCOS	1142,9	28,5	1047	26,1	64	0,9	100
14264	J12SCOS	772,6	19,3	442	11	54	0,4	100
9225	J13OA	1134,3	28	996	24,9	47	1,3	100
7425	J14SCOS	131,6	3,2	137	3,4	49	1,2	100
8267	J15SCOS	65	1,6	61	1,5	33	0,7	100
5771	J16OA	519,7	12,9	521	13	61	0,6	100

*SERPAT: Serviço de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP **LGHM: Laboratório de Genética Humana e Médica. Departamento de Genética.

5.1.4 Análise do Transcriptoma em biópsia de testículo parafinizada

5.1.4.1 Sequenciamento de RNA extraído de amostras de biópsia de testículo parafinizadas utilizando a plataforma Illumina (TruSeq RNA-exome)

O sequenciamento de nova geração tem por finalidade obter dados genômicos a grande escala com a finalidade de obter toda a informação genética das amostras estudadas. No caso do sequenciamento do RNA podemos obter informação sobre os níveis de expressão dos RNA mensageiros e outros tipos de RNA que estão nas células assim como o nível estrutural destas moléculas de RNA. A principal limitação desta técnica é o requerimento de níveis muito altos de qualidade de RNA pelo que foi necessário otimizar a metodologia para trabalhar com amostras que se consideram não aptas para este tipo de experimento. Assim, identificamos o TruSeq RNA Exome (metodologia para preparação de bibliotecas para o sequenciamento) da plataforma Illumina que é a melhor opção para trabalhar com amostras de RNA extraídas de tecido parafinizado.

O protocolo de TruSeq RNA Exome (Reference guide 10000000039582 v01 - Illumina) indica como converter RNA total em bibliotecas de origem genômico conhecido e logo depois realizar a captura de regiões codificadoras do transcriptoma e desta forma as bibliotecas geradas podem ser utilizadas para geração de clusters de DNA e o sequenciamento.

O processamento de todas as amostras iniciou-se com concentrações de 100 ng do RNA total no volume final de 8,5 µL. O RNA foi inicialmente fragmentado utilizando uma solução contendo cátions divalentes a uma temperatura de 94 °C por 8 minutos e logo resfriado a 4 °C.

A próxima etapa consistiu na síntese do cDNA de simples fita a partir do RNA fragmentado mediante o processo de transcrição reversa utilizando a enzima SuperScript II e hexâmeros randômicos (random primers) como iniciadores da reação molecular. Com a finalidade de garantir que a transcrição reversa ocorra utilizando unicamente o molde de RNA, foi adicionada na reação a Actinomicina D que evita a síntese de cDNA dependente de molde de DNA. Desta forma garantimos o nosso controle de qualidade de amostra de RNA, obtendo-se um volume final de 8 µL por reação. A reação foi submetida as seguintes condições de temperatura: 25 °C por 10 minutos, 42 °C por 15 minutos, 70 °C por 15 minutos e resfriamento a 4 °C até a próxima etapa.

Logo, foi realizada a síntese da segunda fita de cDNA para formar o cDNA de dupla fita (ds-cDNA). Assim, o molde de RNA é totalmente substituído por um molde de cDNA

garantindo a estabilidade da reação molecular nas próximas etapas. Nesta etapa ocorre a incorporação de uridina ao invés de dTTP na geração do ds-cDNA, isto evita a síntese da segunda fita de cDNA durante a etapa de amplificação por PCR. Assim, a reação consiste na adição de 5 µL buffer de resuspensão e 20 µL do mix de reação para síntese da segunda fita de cDNA no volume final de 50 µL de reação. A reação foi incubada a 16 °C por uma hora.

A purificação do ds-cDNA foi realizada utilizando beads magnéticas que visam união unicamente de moléculas de DNA. Desta forma resgatamos moléculas de ds-cDNA com extremos livres para ligação de adaptadores na próxima etapa. Após a recuperação do ds-cDNA, as amostras foram armazenadas no freezer -20 °C.

No dia seguinte, realizamos a adenilação do ds-cDNA que consistiu na adição de um nucleotídeo de adenina na terminação 3' com a finalidade de garantir a ligação específica dos adaptadores que apresentam um nucleotídeo de timina na terminação 3' e assim evitar a formação de quimeras de DNA. Para isto, foi adicionada uma solução contendo 2,5 µL de buffer de resuspensão e 12,5 µL do mix de reação de adenilação. A reação foi incubada a 37 °C por 30 minutos e logo a 70 °C por 5 minutos. Imediatamente depois, a reação foi resfriada em gelo.

Na próxima etapa, foi realizada a ligação dos adaptadores as extremidades do ds-cDNA. Assim, foi adicionada uma solução contendo 2,5 µL de buffer de resuspensão, 2,5 de enzima ligase e 2,5 µL de adaptadores. A reação foi incubada a 30°C por 10 minutos e imediatamente depois resfriada em gelo. Logo, foi adicionado 5 µL do buffer para finalizar a atividade da enzima. A recuperação dos fragmentos de ds-cDNA ligados aos adaptadores foi realizado utilizando beads magnéticas e foram transferidos para uma placa de PCR.

O enriquecimento dos fragmentos de ds-cDNA obtidos foi realizado mediante PCR com iniciadores específicos para hibridar os adaptadores ligados. Desta forma é realizada uma reação de PCR convencional contendo 25 µL do mix para PCR e 5 µL dos primers com as seguintes condições de temperatura: 15 ciclos de 98°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; uma extensão final a 72°C por 5 minutos e incubação a 4°C. Após esta etapa, as amostras eram armazenadas a -20°C até o seguinte dia.

No outro dia, iniciou com a checagem do tamanho e qualidade das bibliotecas utilizando-se a electroforese microfluídica. Após a checagem, realizamos a primeira hibridação das sondas. Nesta etapa utilizamos sondas específicas para as regiões codificadoras marcadas com biotina com a finalidade de capturar a maior quantidade de genes expressos na nossa amostra. Para isto, foram gerados agrupamentos chamados de “*pools*” de bibliotecas. De acordo a nossa quantidade de amostras geramos 4 grupos de 4 amostras por grupo. Assim, a cada grupo de amostras contendo 45 µL de biblioteca foram adicionados 50 µL de buffer de

captura e 5 μ L das sondas. A reação foi incubada com as seguintes condições de temperatura: 95°C por 10 minutos, 18 ciclos de 1 minuto cada com variação de temperatura em modo decrescente começando em 94°C e decrescendo 2°C por cada ciclo; e 58°C por 90 minutos.

Logo depois, foi realizada a captura das sondas hibridadas utilizando beads magnéticos ligadas a estreptavidina que conseguiram capturar todas as regiões hibridadas com as sondas marcadas. A hibridação e captura das sondas foi realizada duas vezes com a finalidade de garantir a especificidade das sondas. Depois as amostras foram submetidas a lavagem e os ds-cDNA hibridados foram eluídos e recuperados utilizando outras beads magnéticas sem marcação.

Finalmente, o enriquecimento final da biblioteca foi realizado mediante PCR convencional. Desta forma, os fragmentos de ds-cDNA foram amplificados utilizando uma reação de PCR contendo 20 μ L de buffer de reação e 5 μ L de iniciadores com as seguintes condições de temperatura: 98°C por 30 segundos, 10 ciclos de 98°C por 10 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos; uma extensão final de 72°C por 5 minutos e incubação indefinida a 10°C. As amostras amplificadas passaram por uma curta etapa de lavagem para retirar todos os componentes da PCR e recuperação utilizando beads magnéticas. O volume final de biblioteca obtido foi de 30 μ L que foram injetados no cartucho de sequenciamento e este foi colocado no equipamento Hi-Seq da Illumina. As bibliotecas foram sequenciadas durante 100 ciclos no protocolo de *paired-end*. Os arquivos gerados de tipo *Base call* foram convertidos para o formato “.fastq” utilizando o programa Bcl2Fastq (Illumina).

5.1.4.2 Pré-processamento dos dados de sequenciamento de nova geração: Controle de qualidade das sequências e retirada dos adaptadores

De forma geral, todas as amostras foram submetidas ao primeiro controle de qualidade dos dados obtidos e nenhuma das amostras apresentou sequências com baixa qualidade. Esta análise foi realizada utilizando os algoritmos FastQC (Bioinformatics, 2011) e MultiQC (Ewels, Magnusson, Lundin, & Käller, 2016). Observamos que as medianas de todas as leituras com tamanhos de 36 a 76 pares de bases encontravam-se no primeiro quartil de qualidade ou faixa verde (Figura 13).

Dentre os dados de qualidade com maior importância para análise bioinformática estão, o número de sequências duplicadas provavelmente inseridas durante a amplificação por PCR, a porcentagem de GC (%GC), o número de sequências com sobre representação, inserção de adaptadores e o tamanho das sequências detectadas. Estes parâmetros foram levados em

consideração no segundo controle de qualidade dos dados. Neste controle de qualidade de dados, retiramos as sequências que eram compatíveis com os adaptadores fornecidos pelo fabricante, além disso foram retiradas todas as sequências duplicadas e mantivemos as sequências com tamanho maior a 70 pb. Este procedimento foi realizado utilizando o algoritmo de Trimmomatic (Bolger, Lohse, & Usadel, 2014) com os seguintes parâmetros: 1) Foram utilizados os dois arquivos obtidos da metodologia de “paired-end”; 2) Foram gerados arquivos pareados e não pareados para uma mesma amostra; 3) Remoção dos adaptadores da Illumina em sequências de até 50 nucleotídeos (30 phread), a leitura era feita em sequências de 16 nucleotídeos com um máximo de 2 erros; 4) Remoção de sequências com baixa qualidade ou bases inespecíficas chamadas de “N”; 5) Releitura das sequências filtradas porém de 4 em 4 nucleotídeos e remoção das sequências com qualidade abaixo de 15 e 6) Remoção de sequências com menos de 36 nucleotídeos após os passos anteriores. Após a retirada das sequências acima descritas, foi realizada uma nova análise de qualidade com FastQC e MultiQC (Tabela 6).

Figura 13. Controle de qualidade por multiQC. As sequências obtidas foram submetidas a análise bioinformática de qualidade, para isto foram obtidos os Phred Score de cada conjunto de sequências por amostra estudada antes (parte superior) e depois da retirada dos adaptadores (Parte inferior). As linhas verdes representam as amostras estudadas. A área verde indica qualidade alta, a área laranja indica qualidade intermedia e a área vermelha indica qualidade baixa. O conjunto total de sequências/amostras apresentaram qualidade alta desde que o Phred Score foi superior a 30.

5.1.4.3 Mapeamento com o genoma de referência GRCh38 (Genoma Humano de Referência) e quantificação dos transcritos detectados

As sequências pareadas obtidas após o último controle de qualidade foram alinhadas na última versão do genoma de referência humano (GRCh38) utilizando o algoritmo STAR (versão 2.5.2b) (Dobin et al., 2013). O procedimento foi realizado utilizando os seguintes parâmetros: 1) Os dois arquivos pareados gerados pelo algoritmo Timmomatic foram utilizados para o alinhamento; 2) Um arquivo BAM com as sequências mapeadas e classificadas por coordenada foi gerado; 3) Um arquivo Fastq com as sequências não mapeadas foi gerado; 4) Só as sequências mapeadas uma única vez eram utilizadas para determinar os eventos de *splicing*; 4) Foi realizado um segundo alinhamento com o genoma de referência utilizando a informação dos eventos de *splicing*; 5) Manter as sequências que contém os eventos de *splicing* detectados; 6) Geração de um arquivo contendo a quantificação absoluta dos transcritos detectados pelo alinhamento. Amostras com um número maior de 1 milhão de sequências mapeadas foram submetidas a análise de expressão gênica (Tabela 6).

Na próxima etapa, avaliamos a distribuição das sequências obtidas sob regiões codificantes (*cds_red*), regiões exônicas (*exon_red*), regiões 5'UTR (*fiveUTR_red*), intergênicas (*intergenic*), regiões promotoras (*promoter_red*), regiões 3'UTR (*threeUTR_red*) e associadas a transcritos (*transcript_red*) utilizando o algoritmo GenomicFeatures do pacote SystemPiper (Backman & Girke, 2016) (Figura 14). A amostra J9OA tinha um número menor de sequências do que o esperado, provavelmente pela qualidade da biblioteca que foi sequenciada, que não apresentou uma representatividade suficiente como as outras pelo que não foi incluída na análise de expressão gênica diferencial.

A quantificação dos transcritos detectados a partir do alinhamento foi realizado utilizando o algoritmo HTseq (Anders, Pyl, & Huber, 2015) no arquivo BAM contendo as sequências classificadas pela localização cromossômica, obtido a partir do mapeamento com o genoma de referência. Foram utilizados os seguintes parâmetros: 1) Contar as sequências alinhadas tanto no sentido 5' como no sentido 3' no genoma de referência para um determinado gene; 2) As sequências estão classificadas pela posição no genoma de referência; 3) A quantificação foi feita ao nível de exon; 4) A quantificação de todos os exons gera a quantificação de cada gene em que estes exons estão contidos; 5) Geração de um arquivo contendo a quantificação da expressão gênica de todos os genes detectados em cada amostra.

Figura 14. Localização e frequência das sequências obtidas no genoma de referência GRCh38. O gráfico calcula o número de sequências que foram alinhadas em uma determinada região do genoma de referência como codificadoras de proteína (cds_red), exon (exon_red), 5'UTR (fiveUTR_red), intergênica (intergenic), promotoras (promoter_red), 3'UTR (threeUTR_red) e transcritos (transcript_red). No eixo Y mostra o tipo de região identificada e no eixo X mostra o número normalizado de sequências que foram alinhadas. Em verde estão representadas as sequências que foram localizadas na direção 3'-5' (Antisense) e em vermelho as sequências localizadas na região 5'-3' (Sense).

Tabela 6. Controle de qualidade das sequências obtidas nos experimentos de NGS.

SERPAT	LGHM	1º FASTQC			2º FASTQC (Trimmomatic)			STAR map		DeSeq2	GATK3
		Reads*	%GC	Tamanho	Reads*	%GC	Seq. Filt.	Reads*	Seq. map	Gen. Expr.	Var. Call.
6939	J1SCOS	3609533	58/45	35-76	3006885	57/46	83%	1492402	49.63%	Sim	Não
1959	J2MA	69714898	48/38	35-76	58832586	47/39	84%	29835113	50.71%	Sim	Sim
7048	J3SCOS	3217074	34/29	35-76	2721625	32/29	84%	704000	25.87%	Sim	Não
4468	J4MA	10826539	47/38	35-76	9177020	46/39	84%	3951518	43.06%	Sim	Não
4589	J5SCOS	6433918	43/36	35-76	5389125	39/17	83%	2194957	40.73%	Sim	Não
1084	J6MA	40644195	14/17	35-76	35523997	42/36	87%	4128736	11.62%	Sim	Não
1070	J7MA	20934380	24/23	35-76	18177859	22/23	86%	3598158	19.79%	Sim	Não
5954	J8SCOS	3980961	48/39	35-76	3280708	39/46	82%	1297011	39.53%	Sim	Não
8139	J9OA	2356*	46/42	35-76	1565	42/41	-----	-----	-----	-----	-----
211	J10SCOS	87822914	42/42	35-76	82885008	43/43	94%	65947261	79.56%	Sim	Sim
8523	J11SCOS	5795010	33/35	35-76	4955470	36/38	85%	3242056	65.42%	Sim	Não
14264	J12SCOS	10003013	26/29	35-76	7965742	32/30	79%	3975237	49.90%	Sim	Não
9225	J13OA	10323664	24/27	35-76	8180104	30/28	79%	4261370	52.09%	Sim	Não
7425	J14SCOS	78570450	33/33	35-76	68941118	36/35	87%	51234675	74.32%	Sim	Sim
8267	J15SCOS	83255127	45/44	35-76	77636569	46/45	93%	64768699	83.43%	Sim	Sim
5771	J16OA	78515487	45/44	35-76	74720092	44/45	95%	65918574	88.22%	Sim	Sim

*Número de sequências

5.1.4.4 Análise da expressão gênica diferencial

Como parte importante do fluxo de trabalho com dados obtidos nos experimentos de RNA-seq (TruSeq RNA-exome) é necessário realizar a detecção de genes diferencialmente expressos. Desta maneira são analisados em conjunto todas as sequências mapeadas para um determinado gene num contexto de grupo de amostra. Para a análise utilizamos o algoritmo DESeq2 (Love, Huber, & Anders, 2014) utilizando a plataforma de programação em linguagem R.

Primeiro, utilizamos os arquivos gerados pelo algoritmo HTSeq como ponto de partida (*input*), sendo que este arquivo é uma matriz contendo a contagem não normalizada dos fragmentos (*paired-end*) mapeados e anotados para um determinado gene nomeado como “*htseq-count*”. Paralelamente foi elaborada uma tabela contendo todas as informações dos arquivos submetidos como: o nome da amostra, nome do arquivo, tipo de amostra, etiologia da amostra e tipo de tecido da amostra. Estes arquivos foram carregados ao algoritmo para gerar uma matriz de todos os dados qualitativos e quantitativos de todas as amostras estudadas nomeada como “*DESeqDataSet*”. Nesta matriz foi indicado o tipo de comparação que o algoritmo devia realizar com base no tipo de etiologia ou tipo de tecido.

Logo depois filtramos os dados com a finalidade de retirar aqueles genes que apresentaram um número menor de 10 contagens ou “*reads*” por gene em todas as amostras, para assim melhorar a acurácia dos resultados estatísticos. Os dados obtidos foram normalizados utilizando as três metodologias disponíveis no algoritmo DESeq: VST (transformação para estabilizar a variância), FPKM (fragmentos por Kb por milhão de sequências mapeadas para um determinado gene) e rlog (transformação dos valores absolutos para o log2). As metodologias utilizadas geraram dados transformados e normalizados na escala de log2 para detectar e retirar os *outliers* da análise estatística de expressão gênica diferencial.

A análise de expressão gênica foi realizada assumindo que os dados apresentam uma distribuição negativa binomial, também conhecida como distribuição de gamma-Poisson. Desta maneira, o algoritmo atribui um valor conhecido como “*fold-change*” (*logFoldChange*) que indica o número de vezes que um determinado gene está induzido (“*upregulated*”) ou reprimido (“*downregulated*”) num determinado grupo quando comparado com outro grupo, por exemplo um grupo controle. Junto a esta informação o algoritmo gerou uma tabela contendo outros valores estatísticos como: a média calculada do total de fragmentos detectados para um determinado gene (“*baseMean*”), o erro padrão do *fold-change* (“*lfcSE*”), o valor de *p* (“*pvalue*”) e valor de *p* ajustado utilizando o método de correção de Benjamini-

Hochberg (“*padj*”). Os dados obtidos foram visualizados utilizando diversos algoritmos em R como: MA-plot, ComplexHeatmap, ggplot, plot-PCA, detalhados no *script* (Anexos).

5.1.5 Transcrição reversa acoplada a reação em cadeia da polimerase quantitativa (RTqPCR)

5.1.5.1 Síntese de cDNA

A síntese de cDNA molde para a RT-qPCR foi imediatamente realizada após a extração do RNA total. Inicialmente, 200 ng de RNA foram submetidos a reação utilizando o protocolo GoScript™ Reverse Transcription Mix, Random Primers (Promega) específico para trabalhar com amostras de FFPE. Assim, foram adicionados ao tubo de reação 4 µL de GoScript™ Reaction Buffer, Random Primer (Promega) contendo 0,01 µg/µL Random Primers, 3 mM de MgCl₂, mix de dNTPs (concentração final de 5mM), 20 U de inibidor da transcriptase reversa e 2 µL de GoScript™ Enzyme Mix contendo a enzima transcriptase reversa (Promega).

Reações sem molde de RNA e sem adição da enzima transcriptase reversa foram realizadas paralelamente como controle negativo. A reação de transcrição reversa foi realizada no termociclador com as seguintes condições de temperatura: hibridação inicial a 25°C por 5 minutos seguida pela etapa de síntese ou extensão a 42°C por 60 minutos e finalmente a inativação da enzima a 70°C por 15 minutos seguida de uma incubação indefinida a 4°C. O cDNA sintetizado foi armazenado a -20°C até o processamento.

5.1.5.2 Desenho, seleção, e validação dos primers e reação de qPCR

As sequências codificadoras dos genes *DDX3Y* e *CDY1* do cromossomo Y foram obtidos da base de dados UCSC Genome Browser on Human Dec.2013 (GRCh38/hg38) Assembly (<https://genome.ucsc.edu>). As sequências dos primers foram desenhadas utilizando o software Oligo Explorer v 1.1.2. Os primers foram desenhados para amplificar a região do primeiro exon de cada gene. No caso dos genes *ACTA2*, *VIM*, *KDM5D*, *USP9Y*, *UTY* os primers foram selecionados da base de dados PrimerBank (PCR Primers for Gene Expression Detection and Quantification) (<https://pga.mgh.harvard.edu/primerbank>). As sequências dos primers e o tamanho do produto da PCR estão descritos na Tabela 7.

As reações de qPCR foram realizadas em volume final de 12 µL contendo 1X de HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (12,5 mM MgCl₂, mix de dNTPs, EvaGreen dye and

GC-enhancer) (Solis BioDyne), 1 pmol de cada primer e 1 μ L de cDNA. As reações montadas em placa de qPCR de 96 poços (Applied Biosystems) e realizadas no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os experimentos foram realizados com as seguintes condições de temperatura: uma primeira etapa de ativação da enzima a 95°C por 2 minutos, a segunda etapa consistiu em 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 5 segundos, hibridação a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 25 segundos. Como controles negativos foram realizadas em paralelo reações sem molde de cDNA e reações utilizando o produto da reação de transcrição reversa sem a enzima transcriptase reversa.

Tabela 7. Primers para amplificar genes do cromossomo Y e genes de referência

Gene	Forward	Reverse	bp
<i>CDY1</i>	GAAGCTCTCCTAAAACGCCAGTG	GGCAGCAAATAACTTGCGGTT	97
<i>DDX3Y</i>	TGTAAGAGTTCCGCTATTCG	GTTTCAGGGTCATTTTTCACC	101
<i>BPY2</i>	ATGATGACGCTTGTCCCCAG	CATGATGCCCTCTGTAAGCAG	102
<i>USP9Y</i>	CAGCCAGTTGTAGATGGTACAG	TACGCACTCGGATGAGGGATT	117
<i>UTY</i>	CACAAAGAAGTTGCTCAGGTACG	TGTGGTTGTCGATTAGAGACAGA	98
<i>KMD5D</i>	TAACACACACCCGTTTGACAA	GCTGCTGAACTTTGAAGGCTG	97
<i>RBMY</i>	GGGAGTATGCTCCACCATCTAG	GGTGGAGCATAATCCCTGGTTTC	100
<u>Genes de referencia</u>			
<i>ACTA2</i>	AAAAGACAGCTACGTGGGTGA	GCCATGTTCTATCGGGTACTTC	76
<i>VIM</i>	AGTCCACTGAGTACCGGAGAC	CATTTACGCATCTGGCGTTC	98
<i>β-globin</i>	GAGACCAGAGGTTGATGTGATG	AGTTCCGGGGCATAAAAGTAAG	114

A análise da curva de Melting foi realizada para cada amostra no final de cada corrida de qPCR. As curvas de melting foram convertidas a picos de melting mediante a geração de um gráfico evidenciando o primeiro negativo de fluorescência em função da temperatura (-dF/dT). Este tipo de análise foi realizado para determinar se um único amplicon foi gerado para cada amostra e garantir a especificidade dos primers, ausência de dímeros de primers e ausência de contaminação por DNA exógeno. Com a finalidade de corroborar a informação da curva de melting, os produtos da reação foram analisados no gel de agarose 2% (Figura 15).

Para validarmos a ausência de DNA genômico, os primers do gene *RBMY* foram desenhados para amplificar um fragmento de 1050 pb quando detectar contaminação por DNA genômico e 100 pb quando detectar cDNA (DNA complementar).

Os níveis relativos da expressão gênica dos genes estudados e dos genes de referência foram estimados utilizando o método de $\Delta\Delta C_q$ (Livak & Schmittgen, 2001). Os genes utilizados como genes de referência foram *β -globin* e *GAPDH*. Os níveis relativos de expressão gênica foram calculados a partir de pelo menos 3 réplicas técnicas independentes e a análise dos dados foi realizada no programa 7500 software v 2.0.5 (Applied Biosystems) e os gráficos foram gerados no programa GraphPad Prism 5

Figura 15. Validação dos primers. A) Curvas de Melt para cada gene estudado. B) Gel de agarose 2% mostrando a amplificação por RT-qPCR dos genes estudados. 100pb: Marcador de peso molecular.

5.1.6 Análise de expressão dos microRNAs (miRNAs) no tecido de testículo parafinizado

5.1.6.1 Sequenciamento dos microRNA utilizando a metodologia de Small-RNAseq

Para a análise de microRNA por sequenciamento de nova geração específica para pequenos RNA (Small-RNAseq) foram utilizadas 6 amostras, 3 correspondentes a azoospermia obstrutiva, porém com espermatogênese completa e 3 com Síndrome de Célula de Sertoli-only.

O sequenciamento de pequenos RNA (Small-RNAseq) foi realizado na sede do laboratório particular Novogene (Beijing, China), localizada na cidade de Sacramento no estado da Califórnia nos Estados Unidos de América (USA).

Para isto foram enviados para a empresa, tubos eppendorf de 1,5 mL contendo 5 cortes do bloco de parafina de 20 µm cada. Brevemente o material foi utilizado para extração do RNA total de forma automatizada e o RNA foi submetido a três controles de qualidade similares aos descritos acima.

A preparação das bibliotecas foi realizada utilizando os protocolos padrões para a detecção de pequenos RNAs utilizando o kit TruSeq Small RNA Library Preparation (Illumina). A biblioteca de cDNA foi obtida após as seguintes etapas do processo: ligação dos adaptadores, transcrição reversa do RNA, enriquecimento por PCR, purificação e seleção por tamanho da biblioteca.

As bibliotecas de cDNA foram sequenciadas na plataforma Illumina, gerando sequências de 18-40 nucleotídeos do tipo *single-end* durante 300 ciclos. Os arquivos gerados de tipo *Base call* foram convertidos para o formato “.fastq” utilizando o programa Bcl2Fastq (Illumina).

5.1.6.2 Controle de qualidade das sequências obtidas e mapeamento com o genoma de referência humano GRCh38

Os arquivos fastq foram submetidos a análise de qualidade utilizando os algoritmos de FastQC (Bioinformatics, 2011) e MultiQC (Ewels et al., 2016). Observamos que as medianas de todas as leituras com tamanhos de 36 a 76 pares de bases encontravam-se no primeiro quartil de qualidade ou faixa verde (Figura 16).

Os resultados mostraram a qualidade necessária para continuar com a análise por Bioinformática. Os adaptadores 3', 5' e poly A/T/G/C foram retirados com a finalidade de abolir possível contaminação ou inserção de *bias* na próxima etapa da análise. O resumo dos dados obtidos encontrasse na Figura 17 e na Tabela 8.

Figura 16. Controle de qualidade dos arquivos fastq obtidos nos experimentos de small-RNAseq. A) Gráfico mostrando os valores de Phred em todas as amostras (linhas verdes). B) Gráfico mostrando a porcentagem de conteúdo de N (leituras incorretas). A-B) A área verde indica qualidade alta, a área laranja indica qualidade intermedia e a área vermelha indica baixa qualidade.

Figura 17. Percentagem de erro para todas as sequências obtidas e submetidas a análise bioinformática. Gráficos de barras mostrando a porcentagem de sequências que apresentaram erro no total de sequências obtidas. A seta de cor preta indica que as sequências com tamanho entre 20 e 40 nucleotídeos apresentaram menor percentagem de erro. Estas sequências foram utilizadas nas etapas seguintes da análise bioinformática. J9, J13 e J16 indicam amostras de azoospermia obstrutiva porém com espermatogênese completa. J1, J8 e J10 indicam amostras com Síndrome de célula de Sertoli.

O algoritmo utilizado na análise foi o miRDeep2 (Friedländer, Mackowiak, Li, Chen, & Rajewsky, 2012) que visa o alinhamento, detecção dos níveis de expressão gênica e o descobrimento de novos microRNA nas sequências obtidas a partir do sequenciamento. Para isto os dados “*fastq*” foram convertidos para o arquivo homólogo tipo “FASTA”. Desta forma as sequências foram alinhadas com as sequências completas, maduras e precursoras dos microRNAs depositados na última versão da base de dados mirBase 2.21. O resumo dos resultados do mapeamento com genoma humano de referência GRCh38, estão descritos na Figura 18.

Tabela 8. Resumo do controle de qualidade aplicado as sequências utilizadas para o mapeamento.

LGHM	Reads totais	Raw data (G)	Error (%)	Q20 (%)	Q30 (%)	GC (%)
J9OA	14863722	0.743	0.01	99.04	96.79	53.87
J13OA	12036502	0.602	0.01	99.03	96.83	52.04
J16OA	12923416	0.646	0.01	98.93	96.76	52.68
J1SCOS	13231702	0.662	0.01	99.12	97.01	53.09
J8SCOS	10304248	0.515	0.01	99.03	96.86	52.96
J10SCOS	11388912	0.569	0.01	99.13	96.88	54.18

Q20 (%): Percentagem de sequências com Phread maior de 20.

Q30 (%): Percentagem de sequências com Phread maior de 30.

GC (%): Percentagem de guanina e citocina no total das sequências obtidas.

Figura 18. Mapeamento e alinhamento das sequências com o genoma de referência GRCh38. O primeiro gráfico de barras mostra que mais do 70% das sequências analisadas foram alinhadas corretamente com o genoma de referência humano. O segundo gráfico de barras mostras o número de sequências mapeadas correspondentes aos diferentes tipos de pequenos RNA. O terceiro gráfico mostra o número de sequências anotadas corretamente.

5.1.6.3 Quantificação e análise de expressão diferencial de microRNA

Os níveis de expressão absoluta dos microRNA conhecidos e depositados no repositório mirBase 2.21 foram obtidos mediante o algoritmo mirDeep2. Os arquivos contendo a quantificação dos microRNAs de cada amostra foram utilizados no algoritmo DESeq2 utilizando os mesmos parâmetros de análise de expressão gênica utilizados na análise dos RNA mensageiros como descrito acima. Em resumo, foi gerada uma matriz com dados qualitativos e quantitativos das amostras e logo depois foram retirados os valores menores de 10 sequências por microRNA. Os dados foram normalizados e submetidos a análise estatística assumindo um modelo de distribuição negativa binomial. Os resultados de *log2FoldChange*, *lfcSE*, *baseMean*, *pvalue* e *ajdpval* (com o método de Benjamini-Hochberg) foram organizados na tabela de expressão gênica diferencial e os resultados foram visualizados utilizando diversos algoritmos com linguagem em R.

5.1.7 Citogenética convencional e bandamento GTG

Um volume de 2mL do sangue total foi adicionado no tubo para cultura de linfócitos contendo 6 mL de meio RPMI enriquecido com fitohemaglutinina e soro bovino fetal (Gibco). As culturas foram incubadas por 72 horas a 37°C. Trinta minutos antes de completar as 72 horas de incubação, foi adicionada a colchicina (concentração final 0,0016%), as culturas foram homogeneizadas e incubadas novamente na estufa.

Após incubação foi adicionada uma solução hipotônica (KCl 0,075M) e logo depois incubadas a 37 °C por 25 minutos. Depois da incubação adicionou-se 1 mL de fixador 3:1 (3 partes de metanol e 1 parte de ácido acético glacial) para interromper a ação da solução hipotônica. As culturas foram homogeneizadas e centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi descartado e o pellet resuspendido em 5mL de fixador 3:1, homogeneizado e centrifugado por 10 minutos duas vezes. Logo depois, os pellets foram resuspendidos em 5 mL de fixador 1:1, homogeneizados e deixados em repouso a temperatura ambiente por 1 hora para logo depois centrifugar a 3500 rpm por 10 minutos. Finalmente as lâminas foram montadas pingando 2 a 3 gotas da ressuspensão do pellet.

Uma lâmina teste por cada cultura foi corada com Giemsa diluído em tampão fosfato. Para o bandamento GTG, as lâminas foram envelhecidas durante 3 dias a temperatura constante. Após o tempo de envelhecimento, as lâminas foram mergulhadas durante 15 segundos numa solução de tripsina e logo depois foram enxaguadas e imediatamente coradas

com Giemsa durante 5 minutos. A análise das lâminas realizou-se mediante a contagem de 100 metáfases no microscópio ótico de luz branca.

5.1.8 Extração do DNA de sangue periférico

A extração do DNA foi realizada utilizando o kit QIAamp DNA Blood Midi Kit seguindo as informações do fabricante com algumas modificações.

Inicialmente eram adicionados 100 µL de enzima protease no tubo Falcon de 15 mL e em seguida eram adicionados 900 µL do sangue ao tubo. Logo, foram adicionados 1,2 mL de buffer de lisado (AL) e o conteúdo foi misturado no shaker por 1 minuto e logo depois os tubos eram incubados a 70°C por 10 minutos em banho úmido. Depois os tubos eram trabalhados na bancada a temperatura ambiente.

Foram adicionados 1 mL de Etanol absoluto e misturados por inversão. Seguido, o conteúdo era vertido dentro da coluna e centrifugado a 1850 x g por 3 minutos. O resíduo era descartado e eram adicionados 2 mL de buffer de lavagem (AW1) à coluna e os tubos foram centrifugados a 4500 x g por 1 minuto. Sem descartar o resíduo, eram adicionados à coluna 2 mL do segundo buffer de lavagem (AW2) seguido de centrifugação a 4500 x g por 1 minuto.

Finalmente a coluna foi transferida para um tubo de 15 mL limpo e o DNA foi eluído em 200 µL de água livre de DNase/RNase.

5.1.9 PCR (Reação em cadeia da polimerase) multiplex para detecção de microdeleções na região AZF do cromossomo Y

O DNA isolado e quantificado foi submetido a reação de PCR multiplex utilizando os primers descritos no Anexo tabela 1. Foram analisados 8 STS diluídos em dois mixes de reação: o Mix1 com os STS sY86, sY127, sY254, AZFY e o Mix 2 com os STS sY84, sY134, sY255, AZFY. Os mixes de PCR continham Buffer de reação 1X, MgCl₂ 1.8 mM, 1 µL do mix de cada set de primers, 200 µM de dNTPs e Taq polymerase (Sigma-Aldrich) por tubo de reação. As condições de temperatura foram as seguintes: 95°C por 5 min; 40 ciclos de 94°C por 1 min, 52°C por 1 min 30 seg, 72°C por 1 min; e 72°C por 10 min. Os fragmentos amplificados foram visualizados em gel de agarose 2.5% e analisados em foto documentadora.

5.1.10 Detecção de rearranjos submicroscópicos por MLPA (*Multiplex Ligation Probe Amplification*)

A detecção foi realizada utilizando o kit SALSA P360 Y Chromosome B1-1015 (MRC-Holland®, Amsterdam, Holanda), desenvolvido para detectar deleções/duplicações típicas e atípicas em uma ou mais sequências na região AZF do cromossomo Y nas amostras de DNA. Este kit abrange a maior parte da região AZF e contém 56 sondas MLPA com produtos de amplificação de tamanhos entre 130 nt e 507 nt, das quais 17 estão localizadas no locus AZFa, 18 no locus AZFb, 21 no locus AZFc o que permite a detecção de ganhos e perdas nesta região.

O ensaio de MLPA foi realizado segundo o protocolo original descrito por (Schouten et al. 2002) com pequenas modificações. As amostras de DNA previamente quantificadas e com boa qualidade, foram diluídas para obter uma concentração final de 100 ng/μL. O DNA foi desnaturado e imediatamente mantido a uma temperatura de 25°C. Após a desnaturação, foi realizada a hibridação das sondas do kit SALSA P360 Y Chromosome B1 com o DNA molde em uma reação contendo SALSA buffer de reação e água ultrapura.

A hibridação foi feita no termociclador a 60°C durante 18 horas e imediatamente após este tempo as reações foram mantidas a 54°C. A seguinte etapa foi a reação de ligação, que consistiu na adição de um mix contendo a enzima ligase e buffer de reação dentro da reação previamente feita. As amostras foram incubadas a 54°C por 15 minutos e em seguida a 98°C por 5 minutos e reduzida a 4°C.

Na última etapa de reação do MLPA, efetuou-se uma Reação em Cadeia da Polimerase (PCR) contendo o mix SALSA PCR, buffer de reação e a enzima taq polimerase tubo de reação. Logo as amostras foram submetidas as seguintes condições de temperatura: 35 ciclos de desnaturação a 90°C por 30 segundos, anelamento a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 60 segundos no termociclador.

Por último, as amostras foram condicionadas em uma placa de sequenciamento contendo size standard LIZ600 (Applied Biosystems) e formamida. Após, as amostras foram desnaturadas a 96° por 3 minutos e incubadas em gelo por 3 minutos.

A separação dos produtos amplificados foi realizada em sequenciador ABI 3500 Genetic analyzer (Applied Biosystems). Os eletroferogramas obtidos foram analisados usando o software Coffalyzer que determina a relação das áreas dos picos de interesse com as áreas dos picos das regiões controle, considerando um único pico como normal quando a razão entre essas áreas estiver entre 0,75 e 1,3, valores inferiores a um limar de 0,75 e acima de um

limite de 1,3 para várias sondas adjacentes indicam a presença de uma deleção ou duplicação, respectivamente.

5.1.11 Confirmação de rearranjos submicroscópicos por PCR em tempo real (qPCR).

As reações de qPCR em DNA genômico para a confirmar os rearranjos submicroscópicos foram realizadas em volume final de 12 μ L contendo 1X de HOT FIREPol® EvaGreen® qPCR Supermix (12,5 mM MgCl₂, mix de dNTPs, EvaGreen dye and GC-enhancer) (Solis BioDyne), 1 pmol de cada primer e 1 μ L de DNA. As reações montadas em placa de qPCR de 96 poços (Applied Biosystems) e realizadas no equipamento 7500 Fast Real Time PCR System (Applied Biosystems). Os experimentos foram realizados com as seguintes condições de temperatura: uma primeira etapa de ativação da enzima a 95°C por 2 minutos, a segunda etapa consistiu em 40 ciclos de desnaturação a 95°C por 5 segundos, hibridação a 60°C por 30 segundos e extensão a 72°C por 25 segundos. Como controles negativos foram realizadas em paralelo reações sem molde de DNA. A curva de Melt foi obtida para verificar ausência ou presença de amplificação.

5.1.12 Extração do RNA total em biópsia fresca de testículo

As amostras biológicas foram primeiramente lizadas e homogeneizadas em 600 μ L de tampão contendo isotiocianato de guanidina de alta desnaturação e β -mercaptoetanol, que inativa RNases para garantir o isolamento de RNA íntegros. Logo depois foram adicionados 600 μ L de etanol absoluto e o conteúdo foi misturado cuidadosamente utilizando a pipeta automática.

Um volume de 700 μ L do lizado foi transferido para a coluna RNeasy Mini spin, previamente colocada no tubo eppendor de 1,5 mL. Os tubos contendo as colunas foram centrifugadas a 8000 x g por 15 segundos. Para garantir a pureza do RNA, foi realizado o tratamento com DNase. Assim, foi adicionada uma solução contendo 25 μ L de buffer de DNase e 10 μ L de DNase stock.

Em seguida, a coluna foi lavada utilizando 700 μ L de buffer de lavagem e os tubos foram centrifugados a 8000 x g por 15 segundos. Logo depois foram adicionados 500 μ L de buffer RPE e os tubos foram centrifugados a 8000 x g por 15 segundos e 2 minutos respectivamente.

Finalmente, as colunas foram transferidas para tubos eppendorf de 1,5 mL limpos e o RNA total foi eluído em 30 μ L de água livre de RNase. O protocolo de extração permite recuperar RNA total incluindo microRNA, na coluna RNeasy Mini spin. A digestão com DNase I garante altas concentrações de RNA livre de DNA. Os contaminantes são eficientemente removidos e RNA de alta qualidade foi obtido. O RNA foi estocado em freezer a -80°C de temperatura.

A qualidade do RNA extraído foi analisada pelo equipamento Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies). O RNA extraído foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop, Thermo Scientific) e diluído para a concentração de 5ng/ μ L. Após a diluição, as amostras foram desnaturadas por incubação a 70°C por 2 minutos e imediatamente colocado no gelo. As amostras foram aplicadas no chip kit Eukaryote RNA Total Pico (Agilent), seguindo as instruções do fabricante para preparação do chip. Em seguida, o chip foi colocado no aparelho Bioanalyzer 2100 para a análise. Após a corrida, foram gerados os valores de RIN (RNA integrity number) e o gel correspondente para cada amostra. Todas as amostras apresentaram um RIN igual ou superior a sete.

5.1.13 Microarranjos para à detecção da expressão gênica, microRNA e RNAs longos não codificadores

Os experimentos para análise de expressão gênica foram realizados na plataforma GeneChip TM da Affymetrix®, seguindo os protocolos fornecidos pelo fabricante. Para isto foram utilizadas lâminas GeneChip Human Gene 2.0 HTA (Affimetry) na qual podem ser detectados mais de 30000 transcritos (mRNA) e mais de 11000 transcritos de RNA longos não codificadores (lncRNA) além de 2578 microRNA (miRNA).

O RNA total extraído do tecido (teste e controle) e que foi submetido a teste de qualidade no Bioanalyser, foi utilizado para a síntese de uma primeira fita de cDNA (DNA complementar de simples fita) utilizando transcrição reversa. Em seguida foi feita a síntese da segunda fita do cDNA e obtido o cDNA de dupla fita (ds-cDNA). Este ds-cDNA foi utilizado como molde para a reação de transcrição in vitro produzindo o cRNA (RNA complementar) que foi imediatamente purificado segundo o protocolo do fabricante.

O cRNA foi marcado com um corante fluorescente Cy3 (3-cianina) e submetido a teste de qualidade calculada a partir do rendimento total obtido e da atividade específica da Cy3. Após a quantificação dos cRNA, procedeu-se a preparação da reação de hibridação contendo o buffer de hibridação e o cRNA. A reação foi adicionada cuidadosamente sob o

chip e incubados durante 18 horas. Após a hibridação foram realizadas lavagens seriadas dos chips hibridados e posteriormente foram secos por centrifugação.

Finalmente as imagens foram capturadas no GeneChip® Scanner 30007G, digitalizadas e processadas pelo programa Affymetrix® GeneChip® Command Console® (AGCC). Os arquivos das imagens digitalizadas foram utilizados para realizar a quantificação inicial da hibridação e o resultado quantitativo das sinais de fluorescência foi obtido em arquivos de formato “.CEL”.

5.1.13.1 Análise bioinformática dos experimentos de microarranjos

5.1.13.1.1 Controle de qualidade dos dados obtidos

Os arquivos “.CEL” obtidos foram exportados e analisados utilizando a plataforma R e os diversos pacotes de Bioconductor segundo a necessidade e o tipo de análise. Para a análise do controle de qualidade foram utilizados os pacotes “oligo” e “affycoretools” que contém os algoritmos RMA de normalização de amostras e quantificação do sinal de hibridação (Figura 19 e Figura S1 – Apêndice).

Figura 19. Distribuição dos níveis de expressão detectados pelo sinal de hibridação. A) Controle de qualidade dos níveis detectados em todas as sondas. Main: RNA mensageiro. Antigenomic: sondas em sentido 3'-5'. Intronic: sondas intrônicas. N: número total de transcritos detectados. B) Níveis de expressão de RNA mensageiro detectados nas amostras estudadas.

5.1.13.1.2 Análise da expressão gênica diferencial e anotação funcional

A análise de expressão gênica diferencial foi feita utilizando o pacote “limma” que contém os algoritmos “fit” e “contrastmatrix” para obtenção dos genes diferencialmente expressos, anotados e com análise estatística por t-student com o método de correção de Benjamini-Hochberg. A visualização dos dados foi feita utilizando as ferramentas de “heatmap2” e “volcano”.

Após a obtenção dos 100 genes diferencialmente expressos, foi utilizando o pacote “topGO” para realizar a classificação destes genes utilizando os termos de Gene Ontology e a visualização dos dados foi feita utilizando o algoritmo “GOplot”. Finalmente a reconstrução da rede de regulação foi realizada utilizando o algoritmo “FGNet” que contém os algoritmos “functionalnetwork”, “analyzenetwork” e “clusterdistance” que utilizam bases de dados sob os genes humanos para a reconstrução de redes de regulação gênica. Finalmente, utilizamos o pacote “clusterprofiler” para determinar os processos biológicos envolvidos.

Resultados

6 RESULTADOS

6.1 Estudo molecular em biópsias parafinizadas

6.1.1 Descrição dos dados clínicos dos indivíduos com infertilidade masculina

Foram identificadas 55 amostras de biópsia testicular parafinadas de indivíduos com infertilidade primária diagnosticados com azoospermia ou oligozoospermia grave atendidos entre os anos de 1998 até 2016 no setor de Genética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Os dados obtidos dos prontuários clínicos mostraram que 63,6% dos indivíduos foram diagnosticados com azoospermia idiopática, 14,5% eram indivíduos com azoospermia obstrutiva, 10,9% com Síndrome de Klinefelter, 7,3% apresentaram azoospermia ou oligozoospermia grave associada à microdeleções na região AZF do cromossomo Yq e 3,6% apresentaram oligozoospermia grave associada a translocação robertsoniana dos cromossomos 13 e 14. Todos os indivíduos estudados apresentaram idade média de 35-37 anos (Figura 20).

Figura 20. Descrição dos dados clínicos. A) Gráfico de pizza indicando as frequências das etiologias da infertilidade masculina primária no total de amostras identificadas e B) Gráfico de caixa indicando idade média dos participantes incluídos no estudo classificados de acordo com a patologia testicular. AO: Dados obtidos dos indivíduos com Azoospermia Obstrutiva. PMCG: Dados obtidos dos indivíduos com Parada na Maturação de Células Germinativas. SCOS: Dados obtidos dos indivíduos com Síndrome de Célula de Sertoli.

O resultado histológico do tecido testicular indicou que 14,7% dos indivíduos apresentaram o tecido compatível com espermatogênese completa, 38,1% com a parada na

maturação de células germinativas classificados em 2 tipos: falha na espermatogônia (sgMF) e falha no espermátócito (scMF); e 47,2% apresentaram a síndrome de célula de Sertoli. As Figura 21 e Figura 22 mostram os tipos de tecidos identificados nas amostras.

Figura 21. Histologia testicular dos indivíduos com Parada na maturação de células germinativas. Análise histológico Hematoxilina-Eosina convencional. Foram selecionadas 6 figuras representativas dos 2 tipos de estágios em que houve falha no desenvolvimento das células germinativas. scMF: Corresponde a parada na maturação de células germinativas a nível de spermatócito 1°. sgMF: Corresponde a parada na maturação de células germinativas a nível de espermatogônia. A-B e E-F correspondem a etiologia idiopática. C-D correspondem a etiologia genética.

Figura 22. Histologia testicular da síndrome de célula de Sertoli. Análise histológico Hematoxilina-Eosina convencional. Foram selecionadas 6 figuras representativas da histologia da Síndrome de Célula de Sertoli. A-B correspondem a etiologia idiopática. C-F correspondem a etiologia genética. E-F apresentam hialinização dos túbulos seminíferos concordante com o tipo de etiologia genética.

Os níveis hormonais foram considerados para análise estatística. Os resultados mostraram que os níveis hormonais de FSH e LH apresentaram variação significativa entre os grupos patológicos como observado na análise de ANOVA com valores de p menores a 0,01 (Figura 23). Isto confirma que os níveis hormonais de FSH e LH estão aumentados em pacientes que apresentaram as patologias de PMCG e SCOS. Na análise comparativa entre o grupo de azoospermia obstrutiva e os indivíduos com síndrome de Klinefelter observamos

que os níveis dos hormônios FSH estão significativamente aumentados ($p = 0,01$) (Figura S2 - Apêndice), já os níveis de LH não apresentaram variação. Em relação aos níveis de testosterona e prolactina não foram achadas diferenças significativas entre os grupos estudados o que sugere normalidade na produção destes hormônios em pacientes com infertilidade primária (Figura S3 - Apêndice).

Figura 23. Análise estatística dos valores hormonais entre os grupos patológicos estudados. Os valores da quantificação do FSH (Hormônio Folículo-Estimulante) e do LH (Hormônio Luteinizante) foram analisados pelo método estatístico de ANOVA utilizando o parâmetro de significância de $p < 0,05$. Há variação significativa entre os 3 grupos de patologias estudadas. ns: corresponde a que não houve variação significativa dos dados entre os indivíduos dentro do grupo.

Portanto, os resultados confirmam que a produção normal de espermatozoides porém com obstrução das vias seminíferas está diretamente associada com um cariótipo 46,XY e níveis hormonais dentro dos valores referenciais. Já, as condições patológicas com maior complexidade como à aplasia de células germinativas ou a falha na espermatogênese podem estar associadas as alterações genéticas ou moleculares conhecidas, porém o conhecimento sob os processos moleculares envolvidos ainda não é muito bem descrito utilizando as metodologias de análise convencionais. Além disso, os casos idiopáticos são importantes para a identificação de novos mecanismos moleculares que poderiam resultar em infertilidade masculina primária.

6.1.2 Os níveis de expressão dos genes do cromossomo Y variam nas diferentes etiologias da infertilidade masculina primária

Com o fim de quantificar os níveis de expressão dos genes localizados na região AZF do cromossomo Y, observamos a quantificação absoluta obtida nos experimentos de RNA-seq

(TruSeq RNA exome) e validamos os resultados com experimentos de RT-qPCR em cDNA obtido das amostras de biópsia de testículo parafinizadas de indivíduos com azoospermia obstrutiva, parada na maturação de células germinativas e síndrome de célula de Sertoli.

Analizamos a expressão dos genes *UTY*, *USP9Y* e *DDX3Y* da sub-região AZFa e os genes *KDM5D* e *EIF1AY* da sub-região AZFb. Os genes da sub-região AZFc não foram detectados nas análises de RNA-seq demonstrando a ausência de transcritos nos três tipos de tecidos.

Figura 24. Valores totais de expressão de genes baseado no número de transcritos por milhão (TPM). Níveis de expressão absoluta dos genes *UTY*, *USP9Y*, *DDX3Y*, *KDM5D* e *EIF1AY* do cromossomo Y em amostras com 3 tipos de histologias. No eixo horizontal estão indicadas as amostras utilizadas na quantificação. No eixo vertical estão indicados os valores de expressão obtidos em função do número de transcritos detectados por milhão de bases (TPM) representando a quantificação absoluta de transcritos por gene. SCOS: Síndrome de célula de Sertoli. MA: Parada na maturação de células germinativas. OA: Obstrutiva.

O resultado da Figura 24 mostra que os níveis de expressão absoluta têm um incremento na expressão dos genes *UTY*, *USP9Y*, *DDX3Y*, *KDM5D* e *EIF1AY* no tecido com SCOS idiopático (SCOS1, SCOS2 e SCOS3). Em contraste, a expressão destes genes está significativamente diminuída em amostras com microdeleções na região AZF (AZF1 e AZF2). Já nas amostras com etiologia idiopática da parada na maturação de células germinativas (MA1) e com etiologia de translocação robertsoniana (MA2) apresentam níveis de expressão similares com as amostras de azoospermia obstrutiva. Por tanto, o resultado sugere que as microdeleções no cromossomo Y afetam a expressão de genes localizados na

região AZF e que a etiologia idiopática em SCOS tem níveis de expressão genica maiores que a espermetogênese completa.

Figura 25. Quantificação dos níveis de expressão relativa dos genes do cromossomo Y por RT-qPCR. Expressão relativa dos genes *UTY*, *USP9Y* e *DDX3Y* da sub-região AZFa e dos genes *KMD5D* e *RBMY1* da sub-região AZFb em indivíduos com microdeleções no cromossomo Y (AZF1, AZF2, AZF3 e AZF4). No eixo horizontal estão indicadas as amostras utilizadas na quantificação. No eixo vertical estão indicados os valores da quantificação relativa obtidos pelo método de $\Delta\Delta Cq$.

Os resultados da Figura 25 mostra os níveis de expressão relativa de 5 genes da região AZF, destes 3 eram da sub-região AZFa (*UTY*, *USP9Y* e *DDX3Y*) e 2 eram da sub-região AZFb (*KDM5D* e *RBMY*). A expressão relativa foi obtida de amostras com etiologia genética de microdeleções na região AZF. Assim, foram submetidas as seguintes amostras com o respetivo resultado de quantificação relativa:

- AZF1:** Tecido testicular com 1 microdeleção (sY151) na sub-região AZFc. Apresenta uma histologia de parada na maturação de células germinativas no espermátócito 1.

- b) **AZF2:** Tecido testicular com 3 microdeleções (sY143, sY147 e sY157) nas sub-regiões AZFb+c. Apresenta a histologia de aplasia de células germinativas.
- c) **AZF3:** Tecido testicular com 4 microdeleções (sY157, sY147, sY153 e sY149) na sub-região AZFc. Apresenta a histologia de apalasia de células germinativas.
- d) **AZF4:** Tecido testicular com 13 microdeleções (sY102, sY105, sY97, sY109, sY117, sY143, sY127, sY157, sY153, sY149, Y6HPc54pr, Y6BaH34pr, Fr15Hpr)

O resultado da quantificação relativa mostrou a queda da expressão dos genes *UTY*, *USP9Y*, *KDM5D* e *RMBY* e além disso observamos o aumento dos níveis de expressão do gene *DDX3Y* em todas as amostras com etiologia de microdeleções na região AZF.

Os níveis de expressão dos genes *USP9Y*, *UTY*, *KDM5D* e *RMBY* estão diminuídos no tipo de tecido de parada na maturação de células germinativas (Figura S4A - Apêndice). Outrossim, amostras parafinizadas de biópsia de testículo com síndrome de célula de Sertoli com etiologia idiopática não apresentam diferenças significativas nos níveis de expressão detectados. Já os indivíduos com síndrome de Klinefelter apresentam diminuição na expressão dos genes do cromossomo Y (Figura S4A – Apêndice). O conjunto de resultados sugere que os genes da região AZF estariam reprimidos em todas as etiologias da parada na maturação de células germinativas e microdeleções na região AZF assim como na síndrome de Klinefelter. Porém, os idiopáticos com SCOS apresentam valores normais ou aumentados dos genes estudados.

6.1.3 Análise do Transcriptoma por tipo de tecido testicular na infertilidade masculina

6.1.3.1 Padrões de expressão gênica nos três grupos histopatológicos

Os resultados evidenciaram a presença de perfis de expressão gênica no tecido testicular em cada grupo histopatológico e etiológico. Estas assinaturas corresponderiam ao funcionamento genético-molecular que dá suporte a fisiologia do tecido em cada condição patológica.

O mapa de calor representando 20 mil genes codificadores de proteínas, mostrou a intensidade da expressão genica e a variabilidade das amostras, além disso observamos assinaturas de genes semelhantes entre amostras de um mesmo grupo histopatológico ou etiológico (Figura 26). Devido a variabilidade das amostras realizamos a análise da expressão por grupos histopatológicos e grupos etiológicos com a finalidade de observar com maior

detalhe a regulação dos transcritos. A análise estatística multidimensional MDS classificou as amostras em grupos de acordo com as semelhanças nos níveis de expressão gênica (Figura S5 - Apêndice).

6.1.3.2 Expressão diferencial entre SCO e OA: As histopatologia de Síndrome de Célula de Sertoli, porém com etiologias diferentes, apresentam assinaturas alteradas de genes associados com o ciclo celular

Foram analisados os dados de expressão gênica de 11 amostras: 2 com azoospermia obstrutiva com espermatogênese completa (OA) e 9 com o tipo de tecido compatível com síndrome de Célula de Sertoli (SCOS).

A análise de expressão diferencial entre SCOS e OA detectou 629 genes diferencialmente expressos com *fold change* maior a 2 (*upregulated* ou induzidos) e menor de -2 (*downregulated* ou reprimidos) e um valor de *p* ajustado menor de 0,05. Destes genes, 227 eram reprimidos e 357 eram induzidos na condição de SCOS quando comparado com OA (Figura 27A).

A busca por genes candidatos a biomarcadores da infertilidade masculina, resultou na detecção de 17 genes super expressos no tecido testicular com espermatogênese completa, embora no tecido com SCOS estes genes apresentam valores de detecção abaixo de 20 transcritos por gene (Figura 27B). A busca de especificidade no tecido testicular, mostrou que 8 genes são expressos especificamente no testículo e 6 apresentam expressão em outros tecidos humanos. Desta forma, a ausência da expressão dos genes *BRDT*, *HIST1H2AA*, *SLCO6A1*, *HIST1H2BA*, *KCTD19*, *FSCB*, *TBL2* e *DSPP* poderia ser considerada como uma assinatura específica da histologia de SCOS em homens com azoospermia.

Figura 26. Estudo da expressão génica obtida a través dos RNA mensageiros. Assinaturas de genes corregulados em 15 amostras de tecido parafinado de biópsia de testículo. Mapa de calor mostrando a variação nos níveis de expressão de 20000 genes (mRNA) humanos. O dendrograma (classificação hierárquica) do eixo vertical mostra diversos agrupamentos de genes co-regulados nos grupos patológicos e etiológicos “Etiologia” indica a etiologia de cada amostra estudada. “Histologia” indica o grupo histopatológico das amostras estudadas. Azoospermia obstrutiva (OA): 1-2. Parada na maturação de células germinativas (MA): 3-6. Aplasia de células germinativas (SCOS): 7-15.

Figura 27. Análise de expressão gênica diferencial entre a Síndrome de Célula de Sertoli (SCOS) e azospermia obstrutiva (OA). **A)** Gráfico de barras mostrando os genes upregulated/induzidos (azul claro) e downregulated/reprimidos (azul escuro) em SCOS. A linha basal encontrasse em 0 do eixo vertical. **B)** Mapa de calor mostrando de 17 genes *dowregulated* em SCOS. Em azul estão representados os valores que indicam a diminuição dos níveis de expressão gênica e em vermelho estão representados os valores que indicam o aumento no nível de expressão gênica. Log2: indica a intensidade do valor da expressão genica. OA: Azoospermia obstrutiva. SCOS: Aplasia de células germinativas.

A Tabela 9 mostra 20 genes diferencialmente expressos que apresentaram o melhor resultado do valor de p ajustado pelo método de Benjamini_Hochberg. Todos os genes estão reprimidos em SCOS pelo que sugere uma provável função na espermatogênese. Sete dos 20 genes são específicos do testículo humano com diferentes funções. A lista completa de genes está detalhada na tabela S2 – Apêndice.

A anotação funcional mostrou que os genes diferencialmente expressos estariam envolvidos nos processos biológicos de desenvolvimento de células germinativas, regulação de processos reprodutivos como a fertilização do embrião e a regulação do metabolismo de nitrogênio na célula (Figura 28A). Os genes estariam localizados em diversos compartimentos celulares desde a membrana plasmática até o cinetócoro (Figura 28B) com diversas funções moleculares necessárias para a manutenção das células até a própria divisão celular (Figura 28C). A análise de enriquecimento de processos biológicos mostrou que os processos biológicos com maior representatividade estão associados à meiose de células germinativas masculinas (Figura 28D).

O conjunto de resultados sugerem a redução ou perda na expressão de um número significativo de transcritos com função importante na primeira etapa meiótica da espermatogênese (Figura 29A). Os genes *upregulated* mostram alteração de processos biológicos envolvidos na manutenção das linhagens celulares contidas no tecido testicular (Figura 29B)

Tabela 9. Top 20 dos genes diferencialmente expressos no grupo SCOS.

Chr	Gene	log2FC	padj	Tecido	Descrição da função
6	HIST1H2BA	-11.941	0.005	T	Histona específica do tecido testicular/esperma.
17	KPNA2	-11.821	0.002	V	Importar proteínas para o núcleo celular.
14	FSCB	-11.682	0.047	T	Formação do flagelo.
1	TCHH	-11.665	0.047	N	
9	SPATA31	-11.590	0.008	T	Proteína associada à espermatogênese.
6	HIST1H2AA	-11.315	0.037	N	
3	EPHA6	-11.072	0.032	V	Metabolismo do cobre.
7	ARL4A	-11.067	0.029	V	Proteína de união ao GTP na troca GTP-GDP.
1	BRDT	-11.036	0.037	T	Paquíteno dos espermátócitos
2	SCARNA6	-10.916	0.019	V	Função desconhecida
17	TUBG1	-10.787	0.038	V	Formação dos microtúbulos
16	KCTD19	-10.732	0.037	T	Proteína estrutural dos canais de potássio.
9	ANKRD18B	-10.684	0.035	V	Função desconhecida
5	SLCO6A1	-10.606	0.045	T	Proteína de membrana específica no testículo.
4	HTRA3	-10.463	0.029	V	Supressor de tumor.
7	DPY19L2P1	-10.142	0.018	N	
22	HIC2	-10.009	0.027	V	Repressão da transcrição
9	FRG1JP	-9.892	0.028	N	
4	DSPP	-9.614	0.040	V	Síntese de colágeno.
7	TBL2	-8.356	0.041	T	Função desconhecida no testículo.

T: específico no testículo; V: expresso em vários tecidos; N: valores de expressão desconhecidos

Figura 28. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos em SCOS, utilizando Gene Ontology (GO). A. Indica os Processos Biológicos (BP) associados aos genes detectados. B. Indica o Componente Celular (CC) em que estes genes são localizados. C. Indica a Função Molecular (MF) dos genes. D. Indica os Processos Biológicos (BP) enriquecidos e alterados no tecido testicular.

Figura 29. Classificação hierárquica dos processos biológicos obtidos com os genes *downregulated* (A) e *upregulated* (B). No eixo horizontal estão indicados o número de genes associados e no eixo vertical os processos biológicos.

6.1.3.3 Expressão diferencial entre MA e OA: O padrão de expressão gênica em amostras com Parada na Maturação de Células Germinativas mostra a perda da função de genes essenciais para a espermatogênese

A análise de expressão gênica diferencial foi realizada em 4 amostras com o tecido patológico de Parada na Maturação de Células Germinativas e duas amostras de azoospermia obstrutiva e espermatogênese normal com a finalidade de identificar assinaturas de genes diretamente associados com a histologia de MA.

O grupo contendo as amostras com epitélio de MA, foi dividido pela análise de agrupamento (*clustering genetico*) em três subgrupos. Um subgrupo contendo amostras com etiologia idiopática para MA, um segundo subgrupo contendo amostras com etiologia genética para MA e um terceiro contendo amostras com azoospermia obstrutiva (Figura 30A).

O resultado de análise diferencial identificou 475 genes diferencialmente expressos entre os dois grupos analisados, 212 genes induzidos (upregulated) e 264 genes reprimidos (downregulated) e com valores de p ajustado menor de 0,05 (Figura 30B).

Realizamos uma análise mais detalhada com a finalidade de identificar genes apagados em MA e o resultado mostrado indica um cluster de 96 genes que não tiveram transcritos detectados em MA, porém com uma expressão alta na espermatogênese completa (Figura 31). A função e localização dos 20 genes diferencialmente expressos com valor de p ajustado $< 0,05$ estão indicadas na Tabela 10.

Todos os genes identificados foram utilizados para realizar anotação funcional por Gene Ontology. O resultado mostrou que vários genes estariam envolvidos nos processos de manutenção das células germinativas e alguns processos metabólicos (Figura 32). A maioria dos genes estariam localizados na membrana plasmática e a diferença das amostras com SCOS, foram identificados genes que participam da junção entre células, processo biológico importante para a manutenção das células germinativas nas células estruturais. Os genes identificados apresentam variedade de funções moleculares dentre as que destacaram são fator de transcrição, atividade transferase, atividade hidrolase e transportador transmembrana.

Assim, nossos resultados da análise de expressão gênica diferencial entre MA e OA e da análise de anotação funcional em conjunto sugerem a detecção de um cluster de 98 genes marcadores da patologia de parada na maturação das células germinativas que estariam envolvidos em uma série de processos biológicos importantes na manutenção e metabolismo das células germinativas e a progressão da espermatogênese.

Figura 30. Análise de expressão gênica diferencial entre a Parada na Maturação de Células Germinativas (MA) e amostras com azospermia obstrutiva (OA). A) Dendrograma mostrando a classificação hierárquica das amostras estudadas de acordo a expressão dos genes diferencialmente expressos. B) Gráfico de barras mostrando os genes upregulated/induzidos (azul claro) e downregulated/reprimidos (azul escuro) na Parada da maturação de células germinativas.

Figura 31. Genes diferencialmente expressos com ausência de transcritos detectados em MA. Mapa de calor mostrando a variação nos níveis de expressão de 95 genes *downregulated* e 1 *upregulated*. Em azul estão representados os valores que indicam repressão ou diminuição dos níveis de expressão gênica e em vermelho estão representados os valores que indicam indução ou aumento no nível de expressão gênica. OA: Azoospermia obstrutiva. MA: Parada na maturação das células germinativas.

Tabela 10. Top 20 dos genes diferencialmente expressos em MA.

Chr	Gene	log2FC	padj	Tecido	Descrição da função
4	KIT	-13.832	0.003	V	Formação dos gametas masculinos.
15	TMED3	-13.377	0.014	V	Trafego vesicular de proteínas.
17	DRG2	-13.162	0.016	V	Proliferação, diferenciação e morte celular.
2	CHRNA1	-13.118	0.017	M	Receptor colinérgico no tecido muscular.
14	FSCB	-13.083	0.011	T	Biogênese do flagelo.
12	ACRBP	-13.015	0.005	T	Formação do acrossomo.
14	IGHM	-12.816	0.021	V	Produção de IgM.
14	IFT43	-12.803	0.007	V	Transporte celular.
12	MYBPC1	-12.783	0.021	M	Modulação da contração muscular.
17	KRT12	-12.778	0.021	N	Função não descrita no testículo.
17	VPS25	-12.738	0.022	V	Complexo de endossomos.
7	GTF2IRD2B	-12.717	0.008	V	Glicosilação de fosfoproteínas
11	TPH1	-12.656	0.023	V	Biossíntese de serotonina.
2	ATOH8	-12.627	0.023	V	Diferenciação neuronal.
1	CCDC18	-12.516	0.009	V	Função não descrita no testículo.
19	RUVBL2	-12.469	0.010	T	Inibidor transcricional.
X	IL13RA2	-12.452	0.012	V	Internalização da IL13
9	FAM205BP	-12.356	0.012	N	
19	ACSBG2	-12.318	0.010	T	Espermatogênese.
11	SIRT3	-12.184	0.015	V	Regulação do metabolismo celular.

T: específico no testículo; V: expresso em vários tecidos; N: valores de expressão desconhecidos

Figura 32. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos em MA, utilizando Gene Ontology (GO). A. Indica os Processos Biológicos (BP) associados aos genes detectados. B. Indica o Componente Celular (CC) em que estes genes são localizados. C. Indica a Função Molecular (MF) dos genes no tecido.

Figura 33. Classificação hierárquica dos processos biológicos obtidos com os genes *downregulated* (A) e *upregulated* (B). No eixo horizontal estão indicados o numero de genes associados e no eixo vertical os processos biológicos.

6.1.3.4 Expressão diferencial em SCOS e MA: A parada na maturação das células germinativas manteve a função de genes importantes do processo meiótico da espermatogênese, porém a segregação cromossômica foi desregulada

Primeiro, observamos que as patologias de MA e SCOS apresentam assinaturas em comum e próprias da condição patológica. Por isto, com a finalidade de identificar os genes que mantem sua função nas células germinativas com falha no desenvolvimento, realizamos uma análise de expressão gênica diferencial entre os grupos MA e SCOS.

Foram detectados 509 genes diferencialmente expressos com valores de *fold change* maiores de 2 e menores de -2 e valores de *p* ajustado menores de 0,05 sendo que, 149 genes eram reprimidos e 360 eram induzidos em SCOS. A análise de agrupamento mostra a classificação das amostras de acordo com a patologia correspondente, porém mantendo a divisão das amostras de acordo a etiologia. Já os indivíduos com SCOS foram classificados em dois grupos, um contendo aos casos idiopáticos e outro contendo os casos com etiologia genética.

A busca detalhada de genes com redução da expressão gênica em SCOS, porém com expressão alta em MA resultou na identificação de uma assinatura de 10 genes reprimidos localizados em 8 cromossomos diferentes, mas que estavam coregulados na condição de MA (Figura 34 e Tabela 11).

O resultado da anotação funcional por Gene Ontology mostrou que os processos mantidos em MA estão diretamente associados com a geração e o desenvolvimento das células germinativas. Já os processos biológicos enriquecidos revelaram que o tecido com MA manteve os genes necessários para a divisão e proliferação celular (Figura 35).

Por isso tudo, o resultado da análise de expressão gênica diferencial entre SCOS e MA sugere que cada patologia apresenta uma assinatura de genes, porém quando estas duas patologias são comparadas entre elas (SCOS vs MA) podemos identificar os genes responsáveis pela progressão da primeira divisão meiótica, mas os genes encarregados pela segregação cromossômica estariam desregulados em amostras com MA.

Figura 34. Análise de expressão gênica diferencial entre a Parada na Maturação de Células Germinativas (MA) e amostras com síndrome de célula de Sertoli (SCOS). Mapa de calor mostrando a variação nos níveis de expressão 10 genes (mRNA) diferencialmente expressos. Em azul estão representados os valores que indicam repressão ou diminuição dos níveis de expressão gênica e em vermelho estão representados os valores que indicam indução ou aumento no nível de expressão gênica. O dendrograma superior indica a semelhança entre as amostras. *Pathology*: Indica que as amostras formam etiquetadas de acordo ao tipo de tecido. *Samples*: Indica a identificação das amostras. SCOS: aplasia de células germinativas. MA: parada na maturação de células germinativas

Tabela 11. Descrição dos 10 genes diferencialmente expressos em MA.

Chr	Gene	log2FC	padj	Tecido	L.C.	Descrição da função
10	ITGA8	-10.428	0.002	V	---	Recrutamento de células mesenquimais.
1	TCHH	-9.803	0.007	N	---	
9	WDR5	-9.577	0.000	V/T	Spc	Ativação transcricional epigenética.
22	MEI1	-9.572	0.009	T	Spg	Sinapse cromossômica no espermátócito.
5	FAXDC2	-9.219	0.001	T	SC	Função desconhecida no testículo.
16	PLEKHG4	-8.953	0.019	T	Spg	Dinâmica do citoesqueleto.
1	ATXN7L2	-8.930	0.024	V/T	Spg/Spc	Função desconhecida no testículo.
7	SPDYE5	-7.121	0.029	T	---	Função desconhecida no testículo.
9	CBWD6	-6.749	0.040	N	---	
19	REEP6	-6.334	0.039	T	SSC	Trafego de membrana.

T: específico no testículo; V: expresso em vários tecidos; V/T: Expressão em vários tecidos, com maior expressão no testículo; N: valores de expressão desconhecidos. SSC: Célula tronco de espermatogônia; Spg: Espermatogônia; Spc: Espermátócito; Spm: Espermátide; SC: Célula de Sertoli.

Figura 35. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos em MA, utilizando Gene Ontology (GO). Os genes diferencialmente expressos foram submetidos a ferramenta computacional *clusterprofiler*. A. Indica os Processos Biológicos (BP) associados aos genes detectados. B. Indica os Processos Biológicos (BP) enriquecidos e associados ao tecido testicular.

6.1.4 Análise do Transcriptoma por etiologia da infertilidade masculina primaria

6.1.4.1 Expressão diferencial entre SCOS-idiopáticos e OA: O tecido testicular na etiologia SCOS-idiopática perdeu a capacidade de entrar em meiose

Com a finalidade de observar assinaturas de expressão gênica próprias de amostras com etiologia idiopáticas, comparamos cinco amostras de SCOS idiopático contra as duas amostras de azoospermia obstrutiva. O resultado identificou 738 genes diferencialmente expressos entre estas duas condições com genes com *fold change* maior de 2, menor de 2 e valores de *p* ajustado menor de 0,05, sendo que 435 eram induzidos e 303 reprimidos em SCOS-idiopáticos (Figura 36A).

Assim, identificamos uma assinatura específica para esta etiologia que estaria associada a um grupo de 58 genes reprimidos e 2 induzidos em todas as amostras de SCOS-idiopático quando comparadas com amostras OA (Figura 36B).

Os 20 genes com o menor valor de *p* ($\leq 0,01$) (Tabela 12) estão localizados em diferentes tecidos além do testículo, porém 5 genes são expressos exclusivamente no testículo e só o gene *CMTM1* tem função no desenvolvimento do testículo com expressão nos espermatócitos.

A análise de anotação funcional revelou que os processos biológicos associados a meiose estão enriquecidos por um número significativo de genes associados (Figura 37) que se correlaciona com os dados da Tabela 12.

Assim, estes resultados sugerem que o tecido testicular com aplasia de células germinativas por etiologia idiopática perdeu a função de divisão celular pela desregulação de uma assinatura de genes importantes para o início do processo de espermatogênese.

Figura 36. Análise de expressão gênica diferencial entre a síndrome de célula de Sertoli com etiologia idiopática (SCOS) e azoospermia obstrutiva. A. MA plot mostrando os níveis de expressão gênica em função do logaritmo do *fold change* e a média da contagem normalizadas das sequências utilizando o método $\log_2$ (FPKM+1). B. Mapa de calor mostrando a variação nos níveis de expressão normalizados utilizando o método $\log_2$ (FPKM+1) de 58 genes (mRNA) diferencialmente expressos. Os níveis de expressão são mostrados em função da normalização ($\log_2$). Em azul estão representados os valores que indicam repressão dos níveis de expressão gênica e em vermelho estão representados os valores que indicam indução ou aumento no nível de expressão gênica.

Tabela 12. Top 20 dos genes diferencialmente expressos em SCOS-idiopáticos.

Gene	log2FC	padj	Tecido	L.C.	Descrição da função
CHRNA1	-13.197	0.002	N	N	
TCHH	-13.179	0.002	N	N	
FSCB	-13.175	0.002	T	SC	Função desconhecida nas células de Sertoli.
ATOH8	-12.702	0.004	V	N	
IL13RA2	-12.537	0.003	V/T	SC	Transporte de interleucina 13.
GVINP1	-12.502	0.004	N	N	
FAM205BP	-12.432	0.003	N	N	
SPATA31D5P	-12.206	0.003	N	N	
TTLL11	-11.968	0.005	V/T	CG	Formação dos microtubulos.
C20orf85	-11.807	0.008	T	CG	Função desconhecida no testículo.
CCDC121	-11.744	0.008	T	CG	Função desconhecida no testículo.
RAB32	-11.727	0.008	V	CG	Fissão mitocondrial.
C15orf41	-11.650	0.007	C	CG	Função desconhecida no testículo.
ACMSD	-11.532	0.008	F/R	N	Função desconhecida no testículo.
VOPP1	-11.517	0.008	V	CG	Apoptose celular.
TEX48	-11.479	0.010	T	---	Função desconhecida no testículo.
CMTM1	-11.417	0.010	T	Spc	Desenvolvimento do testículo.
DMRT3	-11.341	0.008	V/T	CG	Regulação da transcrição (gametogênese).
TRIM42	-11.330	0.012	T	CG	Função desconhecida no testículo.

T: específico no testículo; V: expresso em vários tecidos; F/R: Fígado/Rim; V/T: Expressão em vários tecidos, com maior expressão no testículo; N: valores de expressão desconhecidos; CG: marcador de células germinativas. SC: Célula de Sertoli.

Figura 37. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos em SCOS-idiopáticos, utilizando Gene Ontology (GO). Os genes diferencialmente expressos foram submetidos a ferramenta computacional *clusterprofiler*. O gráfico de pontos indica os Processos Biológicos (BP) enriquecidos em função do número de genes associados e o valor de p do nível de expressão gênica.

6.1.4.2 Expressão diferencial entre MA-idiopáticos e OA: O tecido testicular com Parada na Maturação de Células Germinativas com etiologia idiopática apresenta genes desregulados associados a regulação da morfogênese celular

Foram analisados 2 casos com etiologia idiopática para MA e comparados com os casos de azoospermia obstrutiva com a finalidade de identificar genes diferencialmente expressos entre estes dois grupos. A análise detectou uma variação significativa nos níveis de expressão de 2403 genes com *fold change* menor de -2 e maior de 2 e um valor de *p* ajustado menor de 0,05. 1188 genes estavam reprimidos e 1215 estavam induzidos no grupo de MA-idiopáticos (Figura 38).

Além disso, buscamos por assinaturas de genes que perderam a expressão no tecido com falha no desenvolvimento de células germinativas, então o resultado detectou uma pequena assinatura de 15 genes reprimidos com um valor de *p* menor ou igual de 0,01 localizados em diversos cromossomos (Tabela 13). Outrossim, observamos a perda da expressão do gene *PHF7* localizado nos espermatócitos, essencial para a progressão da espermatogênese.

A análise de anotação funcional GO para todos os genes revelou que a maioria destes genes estariam associados aos processos que mantem o desenvolvimento das células germinativas assim como a espermatogênese e a manutenção do tecido testicular. Já, a análise de enriquecimento de processos biológicos mostrou que estes genes regulam processos de morfogênese celular e adesão celular, importantes para a manutenção das células germinativas e o correto desenvolvimento no tecido testicular.

Finalmente, buscamos os processos biológicos perdidos nos indivíduos idiopáticos com MA quando comparados com indivíduos com espermatogênese completa. Assim, utilizamos a ferramenta GO nos genes reprimidos. O resultado mostrou que há uma variedade de processos perdidos, porém a análise detectou uma associação significativa com a segregação cromossômica e diferenciação da espermátide (Figura 39).

O conjunto de resultados sugere que os indivíduos estudados com MA-idiopático apresentam assinaturas de genes induzidos e reprimidos, porém os genes reprimidos poderiam ser diretamente associados as funções biológicas e vias gênicas perdidas nestes indivíduos. Assim, os processos biológicos e redes de regulação gênica estariam envolvidos a falha na segregação cromossômica dentro do tipo de células germinativas em que a espermatogênese se deteve.

Figura 38. Análise de expressão gênica diferencial entre a Parada na Maturação de Células Germinativas com etiologia idiopática (MAidio) e amostras com azoospermia obstrutiva (OA). Mapa de calor mostrando a variação nos níveis de de 2403 genes (mRNA) diferencialmente expressos. Os níveis de expressão são mostrados em função da normalização ($\log_2$). Em azul estão representados os valores que indicam repressão ou diminuição dos níveis de expressão gênica e em vermelho estão representados os valores que indicam indução ou aumento no nível de expressão gênica. O dendrograma superior indica a semelhança entre as amostras. *Etiology*: Indica que as amostras forma etiquetadas de acordo ao tipo de tecido. *Samples*: Indica a identificação de cada amostra.

Tabela 13. Genes perdidos na etiologia idiopática de MA.

Chr	Gene	log2FC	padj	Tecido	L.C.	Descrição da função
16	BBS2	-13.831	0.004	V/T	CG	Função desconhecida no testículo.
3	PHF7	-13.325	0.005	T	Spc	Espermatogênese.
11	SERPING1	-13.598	0.006	V	SC	Função desconhecida no testículo.
5	AGGF1	-13.345	0.008	V/T	CG	Proliferação celular.
12	CNOT2	-13.315	0.008	V	CG	Regulação da transcrição.
2	GMCL1	-13.111	0.008	V/T	CG	Espermatogênese.
7	KLHDC10	-13.011	0.008	V/T	Spc	Função desconhecida no testículo.
10	AGAP9	-13.155	0.008	N	Spm	GTPase.
17	SPAG5	-12.852	0.009	V/T	Spc	Segregação cromossômica.
8	RPL8	-12.791	0.009	V	SSC	Formação dos ribossomos.
1	LYST	-12.753	0.009	V	Spc	Estrutura dos microtubulos.
4	KIT	-13.061	0.009	V	Spg	Formação das gametas masculinas.
16	GLG1	-12.602	0.010	V	Spg	Adesão celular.
17	AP2B1	-12.533	0.010	V/T	Spc	Transporte de vesículas.
10	UPF2	-12.696	0.010	V/T	Spg	Formação da membrana nuclear.

T: específico no testículo; V: expresso em vários tecidos; V/T: Expressão em vários tecidos, com maior expressão no testículo; N: valores de expressão desconhecidos; CG: marcador de células germinativas. Spg: Espermatogônia; Spc: Espermatócito; Spm: Espermátide.

Figura 39. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos em MA-idiopáticos, utilizando Gene Ontology (GO). Os genes diferencialmente expressos foram submetidos a ferramenta computacional *clusterprofiler*. A. O gráfico de barras mostra os processos biológicos (BP) associados. B. O gráfico de pontos indica os Processos Biológicos (BP) enriquecidos em função do número de genes associados e o valor de p do nível de expressão gênica.

6.1.4.3 Expressão diferencial entre Klinefelter e OA: A Síndrome de Klinefelter pode apresenta desregulação de genes específicos das células de Sertoli e células de Leydig

Foram analisados 2 casos com SCOS-Klinefelter e 2 casos com azoospermia obstrutiva. Observamos que há uma variação significativa dos níveis de expressão de 738 genes com *fold change* menor de -2 e maior de 2 e um valor de *p* ajustado menor de 0,05. 303 genes apresentaram expressão reprimida e 435 apresentaram níveis de expressão induzida. Além disso 119 genes do cromossomo X estavam desregulados, a maioria deles com expressão induzida. No mesmo sentido os 3 genes da sub-região AZFa (*USP9Y*, *DDX3Y* e *UTY*) estavam induzidos.

A análise detalhada feita para obter os genes diferencialmente expressos com um valor de *p* menor ou igual de 0,01 detectou uma assinatura de 34 genes, 16 induzidos (Figura 40) e 18 reprimidos (Figura 41).

Figura 40. Análise de expressão gênica diferencial entre a Síndrome de célula de Sertoli com etiologia genética por Síndrome de Klinefelter (Klinefelter) e amostras com azoospermia obstrutiva (OA). Mapa de calor mostrando a variação nos níveis de expressão de 16 genes induzidos. Em azul estão representados os valores que indicam diminuição dos níveis de expressão gênica e em vermelho estão representados os valores que indicam indução ou aumento no nível de expressão gênica.

Figura 41. Análise de expressão gênica diferencial entre a Síndrome de célula de Sertoli com etiologia genética por Síndrome de Klinefelter (Klinefelter) e amostras com azoospermia obstrutiva (OA). Mapa de calor mostrando a variação nos níveis de expressão de 18 genes induzidos. Em azul estão representados os valores que indicam diminuição dos níveis de expressão gênica e em vermelho estão representados os valores que indicam indução ou aumento no nível de expressão gênica.

Dentre os genes diferencialmente expressos, buscamos a variação da expressão dos genes específicos das células de Sertoli (Figura 42) e das células de Leydig (Figura 43). O resultado mostrou que as células de Sertoli apresentam a alteração dos níveis de expressão de 11 genes e as células de Leydig tem 4 genes alterados.

A análise de anotação funcional por GO mostrou que todos os genes *downregulated* estão diretamente envolvidos nos processos biológicos da manutenção e meiose das células germinativas e observamos a desregulação na diferenciação dos gametas (Figura 44). Já os genes *upregulated* estão envolvidos com processos de proliferação celular e manutenção metabólica das células presentes no tecido testicular.

Figura 42. Análisis de expressão genica diferencial dos genes específicos das células de Sertoli em indivíduos com a síndrome de Klinefelter. Mapa de calor mostrando a variação nos níveis de expressão de 11 genes induzidos. Em azul estão representados os valores que indicam diminuição dos níveis de expressão gênica e em vermelho estão representados os valores que indicam indução ou aumento no nível de expressão gênica.

Figura 43. Análisis de expressão genica diferencial dos genes específicos das células de Leydig em indivíduos com a síndrome de Klinefelter. Mapa de calor mostrando a variação nos níveis de expressão de 4 genes induzidos. Em azul estão representados os valores que indicam diminuição dos níveis de expressão gênica e em vermelho estão representados os valores que indicam indução ou aumento no nível de expressão gênica.

Tabela 14. Genes diferencialmente expressos com valor de p menor de 0,01.

Chr	Gene	log2FC	padj	Tecido	L.C.	Descrição da função
8	CLU	-13.514	0.004	V	Spc	Desconhecida no testículo.
1	CSDE1	-13.385	0.005	V	Spc	Desconhecida no testículo.
9	SETX	-13.291	0.005	V/T	Spc	Desconhecida no testículo.
7	PPIA	-13.221	0.006	V	Spg	Desconhecida no testículo.
16	CNOT1DS	-13.071	0.007	V/T	Spc	Repressor transcricional.
19	FTL	-13.018	0.008	V	SC	Metabolismo do ferro.
4	FBXW7	-13.183	0.008	V	Spg	Controle pôs translacional.
2	TRIP12	-12.790	0.008	V/T	Spc	Regulação do reparo do DNA.
12	UBC	-12.733	0.009	V	Spt/Spc	Regulação do reparo do DNA.
2	ACSL3	-13.110	0.009	V	C.G.	Metabolismo de lipídeos.
14	HECTD1	-12.644	0.009	V	Spg	Metabolismo de lipídeos.
2	ALMS1	-12.505	0.010	T	C.G.	Formação do flagelo.
1	ZC3H11A	-12.634	0.010	V	C.G.	Desconhecida no testículo.
11	SERPING1	-12.947	0.010	V	SC	Inibição do complexo C1.
6	EEF1A1	-12.476	0.011	V	SC	Síntese de proteínas.
2	SNRNP200	-12.469	0.011	V	C.G.	RNA helicase.
1	NECTIN4	30.000	0.000	---	---	
1	CACNA1S	16.630	0.000	---	---	
14	SERPINA4	15.467	0.001	---	---	
4	GRXCR1	15.392	0.001	T	SC	Desconhecida no testículo.
16	CLDN6	14.635	0.001	V	SC	Desconhecida no testículo.
2	SPEG	14.398	0.002	V	Spc	Desconhecida no testículo.
1	FAM151A	14.350	0.002	---	SC	Desconhecida no testículo.
20	HCK	14.326	0.002	---	SC	Desconhecida no testículo.
17	OSBPL7	14.349	0.002	V	SC	Desconhecida no testículo.
10	SLC29A3	13.609	0.003	V	SC	Desconhecida no testículo.
11	ANO9	13.327	0.005	V	---	Desconhecida no testículo.
4	GABRA2	15.554	0.006	V	SC	Desconhecida no testículo.
17	OTOP2	13.895	0.010	V/T	SC	Desconhecida no testículo.
6	PNPLA1	13.933	0.010	V	---	Desconhecida no testículo.

T: específico no testículo; V: expresso em vários tecidos; V/T: Expressão em vários tecidos, com maior expressão no testículo; N: valores de expressão desconhecidos; CG: marcador de células germinativas. Spg: Espermatogônia; Spc: Espermatócito; SC: Célula de Sertoli.

Figura 44. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos na síndrome de Klinefelter, utilizando Gene Ontology (GO). O gráfico de pontos indica os Processos Biológicos (BP) enriquecidos em função do número de genes associados e o valor de p do nível de expressão gênica.

Os resultados sugerem que a síndrome de Klinefelter tem uma assinatura de genes diferencialmente expressos associados a manutenção do tecido testicular e a perda da função meiótica das células localizadas no tecido com níveis altos de expressão de genes dos cromossomos sexuais. Além disso, identificamos a desregulação de genes específicos localizados nas células de Sertoli e nas células de Leydig o que explicaria a alteração do fenótipo testicular.

6.1.4.4 Variação da expressão gênica entre microdeleções no AZF e OA: As microdeleções na região AZF desregulam genes necessários no ciclo celular e na diferenciação das células germinativas

Identificamos 4 amostras com etiologia de microdeleções na região AZF do cromossomo Y com distintos tamanhos. Para identificar genes corregulados utilizamos ferramentas de bioinformática e mineração de dados e encontramos que 1205 genes apresentam expressão variável quando comparadas com os indivíduos do grupo OA. 1127 genes identificados estavam reprimidos ou sem expressão e 78 estavam induzidos no tecido testicular do grupo AZF quando comparado com o grupo OA (Figura 45).

Figura 45. Análise de expressão gênica entre a etiologia de microdeleções na região AZF (AZF) e amostras com azoospermia obstrutiva (OA). Mapa de calor mostrando a variação nos níveis de expressão de 1205 genes. Em azul indica-se diminuição da expressão e em vermelho aumento da expressão.

Como a maioria de genes eram reprimidos, utilizamos a ferramenta de anotação por GO para identificar os processos biológicos enriquecidos que estariam alterados nos indivíduos com microdeleções na região AZF. O resultado mostrou que as vias gênicas do ciclo celular estão desreguladas, assim como processos de modificação pós-traducional envolvidos no desenvolvimento da espermatíde e diferenciação do espermátócito (Figura 46).

Figura 46. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos em AZF, utilizando Gene Ontology (GO). Classificação hierárquica dos Processos Biológicos (BP) enriquecidos em função do número de genes associados. Count: número de genes. P adjust: valor de p ajustado com o método de Benjamini-Hochberg.

Com a finalidade de entender melhor os processos biológicos associados as microdeleções no cromossomo Y, buscamos os processos biológicos alterados utilizando só os genes *downregulated*. O resultado mostrou que os genes com baixa expressão regulam os processos biológicos associados a manutenção das células germinativas assim como as células de Sertoli (Figura 47).

A característica mais importante dos indivíduos deste grupo é a presença de microdeleções no cromossomo Y pelo que foi necessária a busca de variações na expressão dos genes da região AZF. O resultado detectou variação em alguns genes da região AZF. Assim, na sub-região AZFa há uma queda nos níveis de expressão do gene *DDX3Y* nas amostras com microdeleção. Já o gene *USP9Y* teve baixa expressão em apenas as amostras com a condição de SCOS. Na região AZFb o gene *EIFY1A* apresentou baixa expressão nas amostras com microdeleção e o gene *KDM5D* teve expressão reduzida nas amostras da

condição SCOS quando comparadas com a amostra MA e uma das amostras com azoospermia obstrutiva.

Figura 47. Anotação funcional dos genes *downregulated* em AZF, utilizando Gene Ontology (GO). Classificação hierárquica dos Processos Biológicos (BP) enriquecidos em função do número de genes associados. Count: número de genes. P adjust: valor de p ajustado com o método de Benjamini-Hochberg.

6.1.4.5 Variação da expressão gênica entre a translocação robertsoniana e OA: A translocação robertsoniana apresenta genes do cromossomo 14 desregulados

A análise molecular do indivíduo com translocação robertsoniana mostrou que o tecido testicular apresentava um conjunto de genes com níveis de expressão diferentes aos níveis detectados nos indivíduos com azoospermia obstrutiva.

Na mineração de dados, foi detectada uma assinatura de 115 genes (Figura 48A), 54 genes com expressão baixa (Figura 48B) e 61 genes com expressão maior que nos indivíduos com espermatogênese normal.

Figura 48. Análise de expressão gênica entre a translocação robertsoniana e azoospermia obstrutiva. A. MA plot mostrando a distribuição dos genes diferencialmente expressos. B. Mapa de calor mostrando a variação nos níveis de expressão normalizados utilizando o método $\log_2(\text{FPKM}+1)$ de 54 genes (mRNA) com expressão diminuída ou ausente na translocação robertsoniana. Os níveis de expressão são mostrados em função da normalização ($\log_2$). Em azul estão representados os valores que indicam diminuição dos níveis de expressão gênica e em vermelho estão representados os valores que indicam aumento no nível de expressão gênica.

Os genes do cluster1 (Figura 48B) foram submetidos a análise de GO para identificar os processos biológicos perdidos no tecido que apresentava o rearranjo cromossômico. O resultado mostrou que o tecido testicular perdeu os processos de divisão meiótica necessários para a proliferação de celular germinativas (Figura 49).

Figura 49. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos em MA-idiopáticos, utilizando Gene Ontology (GO). O gráfico de barras mostra os processos biológicos (BP) desregulados.

Além disso, a translocação envolve os cromossomos 13 e 14, por tal buscamos por genes desregulados localizados nestes cromossomos. A busca detectou variação na expressão gênica de 5 genes do cromossomo 14, três genes (*MIPOL1*, *RNASE4* e *BRF1*) apresentaram uma redução na expressão gênica e 2 genes (*FOXA1* e *JPH4*) apresentaram aumento nos níveis de expressão gênica (Tabela 15 e Figura 50).

O conjunto de resultados de expressão gênica e anotação funcional, sugerem que o tecido testicular do indivíduo portador da translocação robertsoniana 45,XY rob(13,14) sofreu a desregulação dos genes importantes para o correto desenvolvimento da espermatogênese e proliferação das células germinativas e detectou-se desregulação de genes localizados no cromossomo afetado pelo rearranjo cromossômico.

Tabela 15. Genes desregulados do cromossomo 14.

Chr	Gene	G.E.	Tecido	L.C.	Descrição da função.
14	MIPOL1	▽	V	Spc/Spm	Controle da proliferação celular.
14	RNASE4	▽	---	SC	Função desconhecida no testículo.
14	BRF1	▽	V	SSC/Spg	Ativador da RNA polimerase.
14	FOXA1	▲	V	SC/SSC	Proliferação e diferenciação celular.
14	JPH4	▲	V	SC	Proteína transmembrana.

▲ : Expressão gênica aumentada; ▽ : Expressão gênica diminuída.

T: específico no testículo; V: expresso em vários tecidos. Spg: Espermatogônia; Spc: Espermatócito; Spm: Espermátide; SC: Célula de Sertoli.

Figura 50. Valores de expressão gênica dos genes do cromossomo 14 utilizando o método de TPM.

6.1.5 Comparação das assinaturas de expressão gênica

Nossa análise de expressão gênica foi dividida nos seguintes grupos: SCOS e OA, MA e OA, SCOS e MA, SCOS-idiopático e OA, MA-idiopático e OA, Klinefelter e OA, Microdeleções-AZF e OA, Translocação robertsoniana e OA. Assim, buscamos genes semelhantes entre as assinaturas obtidas e o resultado mostrou uma assinatura conservada de 50 genes desregulados em comum em todas as etiologias da infertilidade masculina primária (Figura 44A). Neste sentido, observamos assinaturas próprias de cada etiologia e histopatologia, o tecido com síndrome de célula de Sertoli apresenta um número maior de genes desregulados quando comparado com o tecido testicular com parada na maturação de células germinativas (Figura 51).

A comparação das etiologias dentro de um mesmo grupo mostra que na parada de maturação existe uma assinatura de genes maior na etiologia idiopática do que na translocação robertsoniana porém, identificamos uma assinatura de 132 genes que estariam desregulados em todas as etiologias desta condição patológica (Figura 52A).

A aplasia de células germinativas apresenta uma assinatura de genes desregulados maior na etiologia da síndrome de Klinefelter. Da mesma forma, identificamos uma assinatura de 97 genes que estariam desregulados em as etiologias deste fenótipo tecidual (Figura 52B).

A comparação entre as etiologias genéticas da infertilidade masculina primária, mostrou que existe uma assinatura de 117 genes desregulados na presença de um rearranjo cromossômico estrutural (microdeleções no cromossomo Y e translocação robersoniana) ou numérico (síndrome de Klinefelter). Sendo que a aneuploidia 47,XXY apresenta uma assinatura de genes desregulados maior que as outras etiologias genéticas. Como a maioria dos indivíduos estudados com microdeleções no cromossomo Y apresentaram um tecido testicular compatível com a síndrome de célula de Sertoli, a análise mostrou que existe uma semelhança de 615 genes entre a etiologia genética de AZF e a síndrome de Klinefelter. (Figura 52C).

Finalmente, os resultados confirmam nossa hipótese da presença de uma assinatura de genes diferencialmente expressos comum em todas as etiologias da infertilidade masculina. A desregulação desta assinatura leva a falha no desenvolvimento das células germinativas em diferentes estágios até a morte das mesmas para assim permitir a proliferação de células de Sertoli e do tecido conjuntivo estrutural no testículo. A tabela S2 – Apêndice detalha os 100 genes diferencialmente expressos com o melhor valor de p em cada comparação realizada.

Figura 51. Diagrama de Venn comparando as assinaturas de genes diferencialmente expressos nos grupos patológicos. A. Comparação dos grupos de Parada na Maturação de Células germinativas com etiologia idiopática (MAidio), o total de indivíduos Parada na Maturação de Células germinativas com etiologia idiopática (MAtotal), Síndrome de célula de Sertoli com etiologia idiopática (SCOSidio) o total de indivíduos com Síndrome de célula de Sertoli com etiologia idiopática (SCOStotal).

Figura 52. Diagrama de Venn comparando as assinaturas de genes diferencialmente expressos nas etiologias. A. Comparação entre as etiologias da Parada na Maturação de Células germinativas com etiologia (MAidio, MATotal e Translocação robertsoniana). B. Comparação entre as etiologias da Síndrome de célula de Sertoli (SCOSidio, SCStotal e Síndrome de Klinefelter). C. Comparação entre as etiologias genéticas da infertilidade masculina primária (Microdeleções na região AZF, Síndrome de Klinefelter e Translocação robertsoniana).

6.1.6 Análise de expressão e anotação funcional de microRNA

6.1.6.1 Expressão diferencial entre SCOS-idiopáticos e OA

O resultado mostrou a identificação de 37 microRNA com *fold change* maior de 2, menor de -2 e um valor de *p* menor de 0,05. Destes, 18 eram reprimidos e 19 eram induzidos na Síndrome de Célula de Sertoli.

Já que os microRNA reprimidos em esta patologia cumpririam uma função importante durante a espermatogênese ou seriam próprios das células germinativas, utilizamos as ferramentas de anotação funcional por GO (*Gene Ontology*), KEGG (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes*), REACTOME e Diana, que contém as bases de dados que com toda a informação funcional dos microRNAs humanos descritos, com a finalidade de determinar os Processos Biológicos, Vias gênicas e metabólicas, e as possíveis doenças em que estes microRNA estariam envolvidos. Buscamos por terminologias que se associem a uma quantidade significativa de genes alvos dos microRNA identificados neste estudo. O resultado mostrou que a anotação em KEGG revelou 40 principais processos associados a manutenção de células germinativas dentre eles o correto desenvolvimento da meiose das células germinativas e ciclo celular. Os resultados mostrados nas Figura 53 e Figura 54 detalham todos os processos identificados assim como a obtenção da provável rede de regulação na qual interagem os 18 microRNA reprimidos junto a seus genes alvo.

Assim, identificamos que na patologia de Síndrome de Célula de Sertoli, os processos associados com a proliferação celular estariam apagados. Isto sugere que células de Sertoli utilizam outros mecanismos moleculares para manutenção desta linhagem celular.

Utilizando a mesma metodologia de busca, analisamos os microRNA induzidos e o resultado está detalhado na Figura 54. O resultado sugere que a super expressão destes microRNA estaria regulando processos biológicos, e vias gênicas próprias do tecido testicular e não observamos anotações diretamente associadas com o desenvolvimento das células germinativas ou a espermatogênese.

Figura 53. Resultados de Histopatologia, expressão de microRNA e anotação funcional. A. Mostra o resultado histopatológico do tecido testicular dos indivíduos com síndrome de célula de Sertoli. Microfotografia com aumento de 40x mostrando os túbulos seminíferos, e o tecido conjuntivo próprio do testículo marcados com o método de Hematoxilina-Eosina (HE). Observa-se aplasia de células germinativas e aumento no número de células de Sertoli dentro dos túbulos seminíferos, fenótipo compatível com a síndrome de célula de Sertoli. B. Mapa de calor com os microRNA diferencialmente expressos ($fold\ change >2$, <-2 , $pval < 0,05$) entre as condições de azoospermia obstrutiva (OA) e a síndrome de célula de Sertoli (SCOS). B'. Processos biológicos, vias gênicas e vias metabólicas preditas ($pval < 0,05$) associadas aos genes alvo dos microRNA reprimidos (*downregulated*) na condição de SCOS e identificadas utilizando a ferramenta de KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes).

Figura 54. Processos biológicos, vias metabólicas, doenças e rede de interação preditos para os microRNA reprimidos na condição de SCOS. A. enrichGOBP são os processos biológicos enriquecidos e preditos utilizando a ferramenta de anotação GO (Gene Ontology). B. enrichREACTOME são as vias metabólicas enriquecidas e preditas utilizando a ferramenta REACTOME. C. enrichDisease são as prováveis doenças associadas aos microRNA. D. Rede de interação dos microRNA reprimidos utilizando os genes (nodos vermelhos) alvo em comum entre estas moléculas. Todas as anotações preditas foram submetidas a análise estatística e aquelas que apresentaram um valor de $p < 0.05$ foram utilizadas na elaboração da figura.

Finalmente, buscamos por Processos Biologicos anotados a para cada micro RNA reprimido em 5 bases de dados “Pictar”, “Miranda”, “Diana”, “TargetScan” e “mirDB”, e os resultados estão detalhados na Tabela 16

Figura 55. Processos biológicos, vias metabólicas, doenças e rede de interação preditos para os microRNA induzidos na condição de SCOS. A. Rede de interação dos microRNA reprimidos utilizando os genes alvo. B. enrichGOBP são os processos biológicos enriquecidos e preditos utilizando a ferramenta de anotação GO (Gene Ontology). C. enrichKEGG são as vias gênicas preditas utilizando a ferramenta de KEGG. D. enrichREACTOME são as vias metabólicas enriquecidas e preditas utilizando a ferramenta REACTOME. E. enrichDisease são as prováveis doenças associadas aos microRNA. .

Tabela 16. Anotação funcional dos microRNA reprimidos

miRNA	GO.ID	Term	Anno	KSpval
miR-335-5p	GO:0048513	animal organ development	23	0.035
	GO:0000003	reproduction	11	0.041
	GO:0022414	reproductive process	11	0.041
	GO:0009719	response to endogenous stimulus	31	0.041
miR-372-3p	GO:0071495	cellular response to endogenous stimulus	25	0.049
	GO:0030111	regulation of Wnt signaling pathway	10	0.05
	GO:0008219	cell death	11	0.03
miR-378c	GO:0006357	regulation of transcription by RNA polym...	10	0.047
	GO:0006366	transcription by RNA polymerase II	10	0.047
	GO:0006807	nitrogen compound metabolic process	105	0.0077
miR-512-3p	GO:0043170	macromolecule metabolic process	97	0.0115
	GO:0044238	primary metabolic process	109	0.0253
	GO:0071704	organic substance metabolic process	110	0.0403
	GO:0012501	programmed cell death	16	0.05
miR-516a-5p	GO:0060429	epithelium development	15	0.033
miR-520d-3p	GO:0050794	regulation of cellular process	197	0.041
	GO:0001501	skeletal system development	12	0.044
	GO:0051301	cell division	10	0.05
	GO:0019219	regulation of nucleobase-containing comp...	29	0.0036
miR-7154-5p	GO:0034645	cellular macromolecule biosynthetic proc...	32	0.0042
	GO:0010467	gene expression	33	0.0067
	GO:0097659	nucleic acid-templated transcription	25	0.0071
	GO:0051252	regulation of RNA metabolic process	26	0.0118

miRNA	GO.ID	Term	Anno	KSpval
	GO:2000112	regulation of cellular macromolecule bio...	26	0.0118
	GO:0009889	regulation of biosynthetic process	31	0.0128
	GO:0031326	regulation of cellular biosynthetic proc...	31	0.0128
	GO:0070887	cellular response to chemical stimulus	30	0.0143
	GO:0042221	response to chemical	37	0.0155
	GO:0006351	transcription, DNA-templated	24	0.0162
	GO:1903506	regulation of nucleic acid-templated tra...	24	0.0162
	GO:2001141	regulation of RNA biosynthetic process	24	0.0162
	GO:0010556	regulation of macromolecule biosynthetic...	27	0.0188
	GO:0010033	response to organic substance	31	0.0241
	GO:0010468	regulation of gene expression	28	0.0288
	GO:0071310	cellular response to organic substance	27	0.0307
	GO:0044260	cellular macromolecule metabolic process	62	0.0312
	GO:0032879	regulation of localization	21	0.0344
	GO:0042592	homeostatic process	13	0.0348
	GO:0006355	regulation of transcription, DNA-templat...	23	0.0351
	GO:0009891	positive regulation of biosynthetic proc...	13	0.042
	GO:0031328	positive regulation of cellular biosynth...	13	0.042
	GO:0072359	circulatory system development	11	0.0435
	GO:0006366	transcription by RNA polymerase II	21	0.0471

6.1.6.2 Reconstrução de redes de regulação microRNA-mRNA no tecido testicular com SCOS-idiopáticos

Com a finalidade de visualizar possíveis interações entre microRNA e mRNA, realizamos a análise de reconstrução de redes de regulação utilizando os valores obtidos dos genes e microRNA diferencialmente expressos, assim como dados disponíveis na base de dados TargetScan que contém a predição e validação dos genes alvo de vários microRNA humanos.

Primeiro calculamos novamente os genes diferencialmente expressos para a condição de SCOS quando comparado com OA. Depois calculamos os microRNA diferencialmente expressos entre SCOS e OA (Figura 56). Estes dados foram enriquecidos com a adição dos seguintes valores: correlação de Pearson entre cada par de mRNA-miRNA, valor de p menor de 0,05, concordância com TargetScan, e o score atribuído a interação positiva ou negativa.

A construção da rede de regulação mostrou que 5 microRNA, 1 reprimido (hsa-miR-4800-3p) e 4 induzidos (hsa-miR-512-3p, hsa-miR-516a-5p, hsa-miR-516b-5p e hsa-miR-519a-5p) apresentaram os melhores valores de correlação, valor de p , concordância com TargetScan e Score positivo.

O conjunto de resultados mostra que a assinatura de 5 microRNA poderia estar diretamente associada com a patologia de síndrome de célula de Sertoli, desde que 4 destes RNA controlam a expressão gênica de genes desregulados e o microRNA com expressão diminuída teria uma função importante no tecido testicular, provavelmente na regulação do desenvolvimento das células germinativas.

Figura 56. Identificação dos microRNA e genes alvo no tecido com síndrome de célula de Sertoli. Do lado esquerdo estão os genes diferencialmente expressos observados no tecido com SCOS. Do lado direito estão os microRNA diferencialmente expressos detectados nos indivíduos com SCOS. A assinatura de microRNA induzidos tem como genes alvo os mRNA do mapa de calor da esquerda. Em verde estão indicados os genes ou microRNA com expressão reprimida e em vermelho estão indicados os genes ou microRNA com expressão induzida. “D” indica os indivíduos com síndrome de célula de Sertoli. “N” indica os indivíduos com azoospermia obstrutiva.

Figura 57. Predição da rede de interação entre microRNA e RNA mensageiro. A rede mostra os microRNA em quadrados azuis e os genes em círculos vermelhos. Observamos a interação dos 32 microRNA diferencialmente expressos e todos os genes diferencialmente expressos detectados na etiologia de SCOS idiopática.

6.2 Estudo genético y molecular em biópsias frescas

6.2.1 Avaliação clínica e citogenética somática

Foram incluídos no estudo 21 homens atendidos no ambulatório de Infertilidade do HCFMRP foram convidados a participar da pesquisa seguindo as normas do Comitê de ética em Pesquisa. Todos os participantes assinaram o Termo de Livre Consentido Esclarecimento (TLCE) e aceitaram participar da pesquisa.

Os dados clínicos e laboratoriais foram obtidos do prontuário médico de cada paciente sob a supervisão do médico geneticista Professor Doutor João Monteiro de Pina Neto. Os dados como idade, assim como os resultados do espermograma e resultados hormonais estão na tabela 13. Os dados de histopatologia foram utilizados para agrupar os indivíduos de acordo com o tipo de histologia observada. Os participantes foram divididos em três grupos 1) Azoospermia Obstrutiva, porém com espermatogênese completa; 2) Parada na Maturação de Células Germinativas (PMCG); 3) Síndrome de célula única de Sertoli (SCOS).

O cariótipo confirmou o resultado citogenético somático dos participantes do estudo. Os resultados mostraram que os participantes I01, I06 e I21 apresentaram um cariótipo 47,XXY compatível com a Síndrome de Klinefelter. O participante I02 apresentou uma translocação robertsoniana 45,XY,t(13;14)(q10;q10). Os demais participantes apresentaram um cariótipo 46,XY (Tabela 4).

6.2.2 Detecção de microdeleções na região AZF do cromossomo Y

A análise molecular de detecção de microdeleções na região AZF foram feitas com a finalidade de confirmar o diagnóstico clínico e classificar as amostras dentro dos grupos etiológicos.

A maioria de participantes não apresentaram rearranjos submicroscópicos na região AZF do cromossomo Y (Figura 58). Os resultados mostraram que os participantes I05, I07 e I16 apresentam microdeleções na região AZF. Dois participantes apresentaram deleções de diferentes tamanhos na sub-região AZFc envolvendo os genes *BPY*, *CDY*, *DAZ2* e *CDY1B* (Figura 59 e Figura 60) e o terceiro participante uma microdeleção localizada na sub-região AZFb envolvendo o gene *EIF1AY* (Figura 61).

As amostras dos participantes com detecção positiva de rearranjos crípticos no cromossomo Y foram reavaliadas utilizando a metodologia de PCR em tempo real (qPCR) com a finalidade de validar os resultados obtidos nos experimentos de MLPA. Os resultados confirmaram a ausência do STS sY254 nos participantes I05 (Figura 62A) e I07 (Figura 62B).

Finalmente, os resultados do PCR-multiplex, inicialmente realizados para a triagem dos pacientes estão descritos na figura S5 - Apêndice.

Figura 58. Resultado de MLPA (P360-B1) do participante I11. Gráfico de caixa mostrando os valores do número de cópias em função do número de vezes que foi detectada a hibridação das sondas de um participante quando comparado com o controle (Ratio). Os círculos pretos indicam que não há variação. Os círculos vermelhos indicam microdeleção.

Figura 59. Resultado de MLPA (P360-B1) do participante I05. Gráfico de caixa mostrando os valores do número de cópias em função do número de vezes que foi detectada a hibridação das sondas de um participante quando comparado com o controle (Ratio). Os círculos pretos indicam que não há variação. Os círculos vermelhos indicam microdeleção.

Figura 60. Resultado de MLPA (P360-B1) do participante I07. Gráfico de caixa mostrando os valores do número de cópias em função do número de vezes que foi detectada a hibridação das sondas de um participante quando comparado com o controle (Ratio). Os círculos pretos indicam que não há variação. Os círculos vermelhos indicam microdeleção.

Figura 61. Resultado de MLPA (P360-B1) do participante I16. Gráfico de caixa mostrando os valores do número de cópias em função do número de vezes que foi detectada a hibridação das sondas de um participante quando comparado com o controle (Ratio). Os círculos pretos indicam que não há variação. Os círculos vermelhos indicam microdeleção.

Figura 62. Resultado de qPCR dos participantes I05 e I07. Curva de Melting resultado da análise dos STS sY127, sY254 e sY255 nos participantes I05 (A) e I07 (B).

6.2.3 Análise do Transcriptoma envolvendo a expressão de mRNA, miRNA e lincRNA

6.2.3.1 Expressão diferencial entre MA-idiopáticos e AO

Para a análise do transcriptoma foram selecionadas um total de 6 amostras, três delas com etiologia conhecida de Azoospermia obstrutiva (I10/OA1, I11/OA2 e I12/OA3) e as outras três com etiologia conhecida de Parada na Maturação de Células Germinativas (I13/MA1, I14/MA2 e I15/MA3).

A análise do transcriptoma detectou 67480 transcritos detectados entre as condições de MA e OA. O mapa de calor não supervisionado mostrou que as amostras estão agrupadas de acordo aos resultados histológicos. O grupo menor de transcritos detectados correspondem a aqueles que estão com maior expressão nas amostras de MA e uma expressão reduzida nas amostras OA. O grupo maior corresponde a transcritos com expressão reduzida em MA porém com expressão significativa nas amostras OA (Figura 63). Os resultados da expressão diferencial dos transcritos detectados foram divididos em expressão detectada do RNA mensageiro (mRNA) (Figura 64), microRNA (miRNA) (Figura 65) e RNA longo não codificador intergênico (lincRNA) (Figura 66).

A correção de falsos positivos mostrou que existem 2624 RNA mensageiros diferencialmente expressos com valor de *fold change* menor a -2 e maior a 2 e um valor de *p*

ajustado (*fdr*) menor a 0,05. Observamos que 2099 eram reprimidos e 525 eram muito expressos no tecido das amostras que apresentavam o tecido de MA. Só 31 genes reprimidos apresentaram um valor de *p* menor de 0,01 (Figura 64). O cromossomo Y não apresentou genes com valores de *p* ajustados significativos, porém observamos a variação dos níveis de expressão de 32 genes (Figura S5 - Apêndice).

Em relação aos RNAs não codificadores de proteína, foram detectados só dois microRNA reprimidos com valor ajustado de *p* menor de 0,05. Além disso, foram detectados 100 lincRNAs com valor de *p* menor de 0,05. Noventa e oito lincRNA eram reprimidos e 2 eram induzidos em MA.

Figura 63. Mapa de calor não supervisionado mostrando 67480 transcritos diferencialmente expressos. Os valores detectados estão indicados em função do log2 do valor normalizado da intensidade. Em Azul estão indicados os transcritos com expressão diminuída e em vermelho estão indicados os transcritos com expressão aumentada.

Figura 64. Mapa de calor mostrando os RNA mensageiros diferencialmente expressos com valor de p ajustado menor de 0,01. Os valores detectados estão indicados em função do log2 do valor normalizado da intensidade. Em Azul estão indicados os transcritos com expressão diminuída e em vermelho estão indicados os transcritos com expressão aumentada.

Figura 65. Mapa de calor mostrando os microRNA diferencialmente expressos com valor de p menor de 0,05. Os valores detectados estão indicados em função do log2 do valor normalizado da intensidade. Em Azul estão indicados os transcritos com expressão diminuída e em vermelho estão indicados os transcritos com expressão aumentada.

Figura 66. Mapa de calor mostrando os RNA longos intergênicos diferencialmente expressos com valor de p ajustado menor de 0,05. Os valores detectados estão indicados em função do log2 do valor normalizado da intensidade. Em Azul estão indicados os transcritos com expressão diminuída e em vermelho estão indicados os transcritos com expressão aumentada.

6.2.3.2 Classificação funcional por GO e KEEG

6.2.3.2.1 Classificação de RNA mensageiros

Os resultados obtidos na análise de expressão gênica diferencial foram sometidos a análise de anotação funcional utilizando as bases de dados Gene Ontology (GO) e Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEEG). Desta forma, todos os genes com expressão menor a -2 e maior a 2 e um valor de p ajustado menor a 0,05 foram classificados de acordo aos Processos Biológicos (BP), Funções Moleculares (MF) e Componente Celular (CC) (Figura S6 – Apêndice).

Após análise, os processos biológicos (BP) mais enriquecidos foram Reprodução sexual (*Sexual Reproduction*) e Processo reprodutivo (*Reproductive Process*). A grande maioria de genes foram associados a funções moleculares (MF) de ligação a proteína (*Protein binding*) e ligação iônica (*Ion binding*). Todos os genes diferencialmente expressos foram classificados dentro de diversos componentes celulares (CC) (Figura S6 - Apêndice).

Com a finalidade de identificar genes diretamente associados com a patologia das amostras estudadas, obtivemos a lista dos 100 genes diferencialmente expressos com valores de *fold change* < -2, >2 e um valor de p ajustado menor de 0,01. A anotação por GO revelou que a maioria de genes estão classificados dentro dos processos biológicos de espermatogênese (*Spermatogenesis*), geração de gametas masculinas (*Male Gamete Generation*), desenvolvimento de células germinativas (*Germ Cell Development*), desenvolvimento da espermátide (*Spermatid development*) e diferenciação da espermátide (*Spermatid differentiation*). Todos os 100 genes analisados apresentaram repressão de expressão gênica em MA o que correlaciona com os resultados da anotação por GO (Figura 67). Bem assim, interrogamos os genes do cromossomo Y para identificar os processos biológicos nos quais estão envolvidos. O resultado mostrou que a maioria deles estão associados a espermatogênese (*Spermatogenesis*) (Figura S7 - Apêndice).

6.2.3.2.2 Classificação de RNA não codificadores de proteína

Para a análise de anotação de transcritos não codificadores de proteína, foram utilizados métodos indiretos de classificação de forma que eram associados aos processos biológicos nos que estavam classificados os RNA mensageiros alvo.

No caso dos microRNA, o resultado mostrou que 17 miRNA estão associados com processos biológicos conhecidos. Além disso, identificamos 6 miRNA maduros com expressão reprimida associados a regulação do ciclo celular, assim como proliferação e diferenciação celular (Tabela 17).

Figura 67. Processos Biológicos desregulados e especificidade celular dos genes alterado em MA. Gráfico de pontos indicado os processos biológicos desregulados de acordo a base de dados Gene Ontology. No eixo vertical estão indicados os processos biológicos e no eixo horizontal está indicado o GeneRatio calculado. Em Azul e vermelho indica-se o valor de p ajustado correspondente. A) Processos Biológicos (BP). B) Componente Celular (CC).

Tabela 17. Expressão diferencial e anotação funcional dos miRNA

miRNA	GO term	Cromossomo	Adj-FDR
<i>Upregulated</i>			
hsa-miR-7153-5p	Cell cycle (GO:0007049)	18	0.005
hsa-miR-7159-5p	Regulation of apoptotic process (GO:0042981)	6	ns
hsa-miR-6736-3p	Cellular response to xenobiotic stimulus (GO:0071466)	1	ns
hsa-mir-7154	Gene expression (GO:0010467)	11	0.005
hsa-miR-6735-3p	Cell motility (GO:0048870), Neuron development (GO:0048666)	1	ns
hsa-mir-7153	Cell cycle (GO:0007049)	18	0.02
hsa-miR-5585-3p	Biological process (GO:0008150)	1	0.02
hsa-miR-6875-5p	Cell cycle process (GO:0022402)	7	ns
hsa-miR-6860	Negative regulation of cell proliferation (GO:0008285)	11	ns
hsa-miR-4322	Metabolic process (GO:0008152)	19	ns
hsa-miR-4327	Cell differentiation (GO:0030154)	21	ns
<i>Downregulated</i>			
hsa-miR-485-3p	Chromatin organization (GO:0006325)	14	ns
hsa-miR-1913	Transcription by RNA polymerase II (GO:0006366)	6	ns
hsa-miR-299-5p	Mitotic cell cycle process (GO:1903047)	14	ns
hsa-miR-6511a-3p	Regulation of protein modification process (GO:0031399)	16	ns
hsa-miR-6084	Enough targets for GO enrichment	1	ns
hsa-miR-3613-5p	Neurogenesis (GO:0022008), Cell differentiation (GO:0030154)	13	ns

ns: $\geq 0,051$

Os miRNA que passaram o método de correção de BH foram interrogados para determinar os genes alvos e se estes genes estariam associados a espermatogênese. Em consequência, o hsa-miR-5585-3p tem como genes alvo os RNA mensageiros da família *RBM*Y localizados no cromossomo Y e genes autossômicos associados a espermatogênese como *SPATA3*, *SMAD9*, entre outros. O segundo miRNA hsa-miR-7153-5p tem 4 genes autossômicos alvo com expressão no testículo. A análise global mostrou que este miRNA está envolvido no ciclo celular (*Cell cycle*) (Tabela 18).

Tabela 18. Genes alvo dos microRNA diferencialmente expressos com valor de $p < 0,05$

miRNA	FDR	Genes alvo
hsa-miR-5585-3p	0,0275	AADAC; AKAP11; AKR7A2; ALDH7A1; ARMCX6; ARSK; ATP8B4; BMPR1A; BRIX1; C17orf58; C6orf120; CACNG8; CFHR3; CNOT6L; CTC1; DHTKD1; DNTTIP2; DOCK7; DPY19L1; ERGIC2; EXOC8; FAM102B; FAM153B; FAM169A; FBXL18; FER; FIGN; FOXJ3; FZD6; GALNT1; HMGCLL1; HOXA5; IFNE; JRKL; KANSL1; KDELR1; LIN52; LONRF1; LUZP2; MAP3K1; MAP3K2; MARCKS; MED13; MTAP; NRAS; NUDT21; PAFAH1B2; PAGR1; PCDHB16; PDCD10; PHF14; PPARGC1A; PRLR; PRPF4B; PTMA; PUS3; <u>RBM1A1</u> ; <u>RBM1B</u> ; <u>RBM1D</u> ; <u>RBM1E</u> ; <u>RBM1F</u> ; <u>RBM1J</u> ; RBPJ; RCOR3; RDH13; RNF38; SCN2B; SEP15; SHOX2; SLC4A4; SLC7A14; <u>SMAD9</u> ; <u>SMYD1</u> ; <u>SPATA3</u> ; SULF2; SUMO1; SUV420H1; TAOK1; TBX18; TSC22D2; VSNL1; ZC3H12C; ZNF460; ZNF548; ZNF91; ZSCAN21
		ACTBL2; AKAP8; ALG10B; ARL8A; ATG9A; ATP13A3; AVL9; BCL7B; BTN2A2; C16orf52; CCDC83; CD300LB; CDC73; COPA; CYBRD1; CYTIP; DECR1; DGCR6L; EDEM3; ELP2; ENTPD5; ESD; FANCF; GPM6B; GRAP2; GXYLT2; HAAO; HORMAD2; KCTD15; LBR; LIMD2; LSM4; MBD4; MDN1; METTL7A; MFSD6; MICAL2; MKRN2; MRPL10; MRPS30; MYLK; NACC1; PACS2; PARD6B; PLEKHG5; PMAIP1; POU3F1; PPP1R11; PPWD1; PTGS1; RAB2B; RGS9BP; RHOBTB3; RUFY2; SERBP1; SERPINA4; SERTAD2; SFRP1; SHCBP1; SQSTM1; SRPRB; ST6GAL2; TLL1; TMEM101; TMEM136; TMEM167A; TMEM214; TMPRSS5; UMPS; USP48; UTP15; ZNF260; ZNF292; ZNF629; ZNF738

*Genes associados com a espermatogênese foram sublinhados

6.2.3.3 Reconstrução de redes de regulação gênica no tecido germinativo

Na reconstrução de redes de regulação utilizamos o método Hipergemométrico (*Hypergeometric test*) para identificar os nós (genes) e arestas (miRNA) das redes utilizando a base de dados de Gene Ontology. Inicialmente interrogamos os 100 genes diferencialmente expressos e obtivemos como resultado a interação predita de 15 genes os quais interagem entre eles para formar redes de regulação diretamente envolvidas no desenvolvimento da espermatíde, fertilização e motilidade do espermatozoide. Observamos que no desenvolvimento dos gametas, o gene *PRM2* tem uma função primordial, junto aos genes *GLNTL5*, *PTCHD3*, *CAPZA3* e *SLC26A8* (Figura 68).

Figura 68. Genes associados aos processos biológicos desregulados em MA. Rede de interação entre os genes enriquecidos e detectados nos experimentos de expressão gênica.

O resultado da interação entre os genes desregulados mostrou que 28 genes interagiam em uma rede conservada junto a microRNAs. Todos estes genes apresentam expressão gênica alta no tecido testicular com espermatogênese completa (Figura 69).

Figura 69. Rede de interação entre os genes desregulados em MA. Rede de interação entre os genes enriquecidos e detectados nos experimentos de expressão gênica. Em vermelho estão indicados os genes e em azul estão indicados os miRNA preditos.

Por outro lado, utilizamos a mesma metodologia para reconstruir a rede de regulação dos miRNA e LincRNA. No caso dos miRNA utilizamos os miRNA que apresentaram um valor de p menor de 0,05: hsa-miR-5585-3p e hsa-miR-7153-5p. Observamos que entre os genes alvo existiam genes diretamente associados a reprodução e a falha do ciclo celular e que os microRNA interagem indiretamente entre eles mediante o controle de um grupo de genes (Figura 70).

Outrossim, interrogamos a possível rede de regulação utilizando os 99 LincRNA diferencialmente expressos. A análise mostrou que existe uma rede composta por 22 RNA que apresentaram miRNA alvos em comum e alguns destes microRNA estão expressos no testículo e na próstata (Figura 70).

Figura 70. Rede de interação entre os microRNA desregulados em MA. Rede de interação entre os miRNA enriquecidos e detectados nos experimentos de expressão gênica. Em vermelho estão indicados os genes e em azul estão indicados os miRNA preditos e em amarelo estão indicados os genes expressos no testículo. A) Rede de regulação do microRNA hsa-miR-5585-3p. B) Rede de regulação do microRNA hsa-miR-7153-5p. C) Rede de interação predita entre os microRNA reprimidos.

Figura 71. Rede de interação entre os lincRNA desregulados em MA. Rede de interação entre os lincRNA enriquecidos e detectados nos experimentos de expressão gênica. Em verde estão indicados os lincRNA e em azul estão indicados os miRNA preditos e em amarelo estão indicados os microRNA expressos no testículo.

6.2.3.4 Identificação de vias de regulação gênica da infertilidade masculina

Atualmente existem oito vias gênicas envolvidas na falha da espermatogênese relatadas na literatura. Só uma delas tem como fatores principais os genes da família *DAZ* e nas outras vias observam-se genes que participam da regulação o ciclo celular assim como fatores de transcrição importantes para ativar genes de proliferação celular e totipotencia. Por outro lado, identificamos vias de genes encarregados da modificação e remodelação da cromatina. Em outro grupo observamos genes encarregados do controle na sinapse cromossômica e reguladores de elementos transponíveis.

Identificamos que os genes reprimidos *PRM1* e *PRM2* estão envolvidos em duas vias da infertilidade masculina associadas a modificação da cromatina e como consequência evitando a interação de fatores de transcrição e proteínas importantes na espermatogênese. Da mesma maneira, a queda na expressão dos genes *BRDT* e *CCNA1* pode levar à Butirilação da histona 4 (H4) promovido pelas proteínas EP300 e CREBBP, isto faz com que genes específicos do esperma não sejam transcritos (Figura 72).

Figura 72. Vias gênicas identificadas na infertilidade masculina primária. O gráfico mostra os genes envolvidos nas vias que regulam a infertilidade em homens. Em verde estão indicados os genes reprimidos e em vermelho os genes com expressão aumentada.

Discussão

7 DISCUSSÃO

7.1 A importância dos genes do cromossomo Y na infertilidade masculina primária

As alterações genéticas observadas em indivíduos com infertilidade primária são comumente as alterações cromossômicas estruturais ou numéricas, variação no número de cópias (CNVs), mutações de ponto em um único gene ou polimorfismos de um nucleotídeo (SNP) e as deleções na região AZF do braço longo do cromossomo Y. As microdeleções junto as alterações observadas no cariótipo de homens inférteis constituem as causas genéticas com maior frequência na infertilidade masculina primária. Na nossa amostra de 55 homens com infertilidade primária identificamos uma frequência de 7,3% de homens com microdeleções na região AZF com diferentes tamanhos. Isto levou a pergunta se os níveis de expressão dos genes do cromossomo Y estariam realmente afetados em indivíduos com microdeleções e também nas outras etiologias.

O resultado da análise por RT-qPCR indica que os genes *UTY* (AZFa), *KMD5D* e *RBMV* (AZFb) e *CDY1* (AZFc) estão reprimidos em indivíduos com microdeleções independentemente do tamanho ou do fenótipo tecidual. Em concordância com nossos resultados, a primeira sugestão feita sob a correlação entre as microdeleções e a expressão gênica no cromossomo Y indicou que uma deleção na sub-região AZFc resulta na ausência dos níveis de expressão do gene *DAZ* (A. Ferlin et al., 1999). Assim, foi sugerido também que gene *DBY* perde os níveis de expressão no tecido testicular de homens com deleções na sub-região AZFa (Foresta et al., 2000). Já a queda na expressão de genes como *DDX3Y* e *CDY2* estariam diretamente associadas com o tipo de fenótipo patológico observado no tecido testicular (P.J., A., P.N., & D.A., 2010) que corresponde com nosso resultado.

As novas tecnologias de análise de expressão gênica como *microarrays* e sequenciamento de segunda geração utilizadas em pesquisas sobre a infertilidade masculina revelaram que os genes do cromossomo Y apresentam variações significativas no tecido germinativo de indivíduos com microdeleções na região AZF ou com outra etiologia (Gatta et al., 2010; X. G. Liu, Hu, Guo, & Sun, 2016; Malcher et al., 2013; P.J. et al., 2010; Paduch et al., 2019; Perez et al., 2013). Nossos resultados do transcriptoma mostra que os genes *USP9Y*, *KDM5D* e *EIF1AY* são reprimidos na presença do maior número de microdeleções. Inesperadamente, detectamos níveis de expressão do gene *CD99* localizado na região pseudoautossômica do cromossomo Y. Além disso, detectamos a expressão de 12 dos 29 genes codificadores do cromossomo Y em todos os indivíduos estudados, sugerindo a

participação destes genes em funções importantes no desenvolvimento das células germinativas e do tecido testicular.

Por conseguinte, no nosso modelo de estudo de microdeleções o tecido com espermatogênese normalmente apresenta níveis de expressão de todos os genes do cromossomo Y, porém se o indivíduo tem 1 microdeleção na sub-região AZFc o tecido continua com a transcrição unicamente dos genes *USP9Y*, *KDM5D*, *DDX3Y* e *TSPY1* resultando na falha no desenvolvimento das células germinativas. Já se os tecidos contêm de 2 microdeleções na região AZFc acontece unicamente a transcrição do gene *USP9Y* e finalmente, se apresentar 8 a 13 microdeleções, a expressão gênica de todos os genes do cromossomo Y é reprimida resultando em fenótipos teciduais de síndrome de célula de Sertoli-only.

A importância das microdeleções no cromossomo Y na infertilidade masculina primária é diretamente associado como um fator genético estrutural devido a possibilidade da interferência no correto funcionamento no tecido testicular dos genes localizados na região AZF. Embora a maioria destes genes sejam específicos do testículo, alguns tem funções importantes em outros tecidos e órgãos humanos por exemplo o fato que o gene *DDX3Y* é utilizado como biomarcador da doença de Parkinson (Colaco & Modi, 2019). Isto implica uma possibilidade de alteração fenotípica em outros tecidos que não são atendidos nos pacientes com esta condição genética.

Possivelmente, a correlação entre os genes do cromossomo Y e a infertilidade é identificada em indivíduos com síndrome de Klinefelter porque nós observamos que os genes da região AZF estão significativamente reprimidos no tecido testicular destes indivíduos e não apresenta um padrão específico de acordo com o tipo de tecido. Embora o transcriptoma desta síndrome seja muito complexo pela interação de múltiplos genes autossômicos e sexuais, nosso resultado aponta que a expressão dos genes AZF participariam na progressão desta doença genética.

7.2 As patologias testiculares como a Síndrome de célula de Sertoli e a Parada na maturação de células germinativas apresentam assinaturas de genes diferencialmente expressos associados ao ciclo celular

A histologia testicular de indivíduos com alteração na produção de espermatozoides, conhecida também como azoospermia não obstrutiva, pode ser dividida em dois grandes grupos: tecido testicular com Síndrome de célula de Sertoli-only e tecido testicular com

parada na maturação de células germinativas (SCHOOR et al., 2002). Esta classificação é muito útil para identificar genes que possam atuar em tecidos com presença ou aplasia de células germinativas e de fato existem trabalhos na literatura mostrando o poder de identificação e quantificação de genes associados aos tipos de tecidos (Larriba & Bassas, 2018), assim como as linhagens celulares que residem no testículo (M. Wang et al., 2018).

Nosso trabalho explorou duas metodologias de análise do transcriptoma do testículo com a finalidade de identificar novos processos biológicos ou vias gênicas que não foram descritas antes nos trabalhos publicados na literatura. Os resultados obtidos com blocos de parafina mostraram que a falha no desenvolvimento da espermatogênese pela parada na maturação de células germinativas poderia estar associada a falha na correta transcrição de genes pouco estudados da espermatogênese como *ACSBG2*, ativado na transição de espermatócito para espermatíde não alongada porém com expressão basal na espermatogônia e no espermatócito (Guo et al., 2018). Embora a função deste gene não está descrita *in vivo* nossos resultados mostram que este gene está dentre os 20 genes mais significativos e possíveis candidatos a biomarcador da infertilidade masculina primária pelo tipo celular previamente descrito.

Por outro lado, a histologia de SCOS apresenta uma pequena assinatura constante em todos os indivíduos portadores deste tipo de tecido independente da etiologia: *HIST1H2BA*, *FSCB*, *SPATA31*, *BRDT*, *KCTD19*, *SLCO6A1*, *TBL2*. Estes genes estão comumente expressos na espermatogônia e nos espermatócitos pelo que a falha na transcrição poderia desencadear a morte celular das células germinativas, deixando o tecido testicular com proliferação das células de Sertoli e células de Leydig. Esta assinatura de genes detectados no nosso trabalho complementa a alteração da funcionalidade das células de Sertoli pela modificação na expressão de genes da via de proliferação celular e dos genes encarregados pela adesão celular entre as células de Sertoli, levando a morte programada das células germinativas. (Paduch et al., 2019).

Nosso trabalho realizado em biópsias parafinizadas assim como em biópsias frescas revelam que a desregulação dos níveis de expressão de genes associados ao ciclo celular poderia levar a apoptose de células germinativas, isto se correlaciona com o descrito por vários autores sobre as causas moleculares da infertilidade masculina primária (Larriba & Bassas, 2018).

7.3 A translocação robertsoniana envolvendo os cromossomos 13 e 14 pode gerar a perda de um gene importante nas espermatogônias e seus predecessores celulares

A translocação robertsoniana envolvendo os cromossomos 13 e 14, é o rearranjo cromossômico com maior frequência em homens com falha na produção de espermatozoides devido à inibição da diferenciação da espermatíde, gerando um fenótipo de olzoospermia grave e tipo de tecido testicular compatível com a parada na maturação de células germinativas (Luciani, Guichaoua, Mattei, & Morazzani, 1984). Além disso, as translocações robertsonianas apresentam uma frequência de 0,7% no total de indivíduos com infertilidade masculina (Dong et al., 2012). Nossos resultados da busca de indivíduos com infertilidade masculina associada a translocação robertsoniana mostrou que só 2 casos das 55 amostras parafinizadas e dois casos dentre as amostras de biópsia fresca apresentavam esta alteração cromossômica.

Os mecanismos moleculares associados a estes rearranjos cromossômicos são pouco estudados, atualmente não existem estudos de correlação de expressão gênica no tecido testicular de portadores de translocações robertsonianas. A causa principal da falha na espermatogênese é associada ao erro na sinapse cromossômica no momento da separação do trivalente na recombinação homóloga que ocorre nas células germinativas do testículo (Luciani et al., 1984), porém ainda não foram identificados os genes alterados estruturalmente ou na expressão gênica.

Os resultados descritos neste trabalho trazem a novidade sob a desregulação de genes localizados no cromossomo 14 envolvido na translocação. Desta forma observamos que os genes *MPOL1*, *RNASE1* e *BRF1* do cromossomo 14 apresentaram ausência na detecção de transcritos quando comparados com indivíduos com espermatogênese completa. Estes genes estão normalmente expressos nos espermatócitos, células de Sertoli e espermatogônias. Contudo, os resultados sugerem que o evento de translocação cromossômica pode resultar na alteração estrutural da sequência genômica dos genes alterados devido a que estes genes estão localizados na mesma região cromossômica sub centromérica. Para confirmar a nossa hipótese é necessário realizar um estudo estrutural utilizando metodologias de array-CGH e sequenciamento de segunda geração como o exoma ou sequenciamento do genoma para determinar a possibilidade de pontos de quebra cromossômica derivada do evento de translocação.

7.4 O transcriptoma testicular na síndrome de Klinefelter

A síndrome de Klinefelter é a causa genética com maior frequência na infertilidade masculina ao redor do mundo com uma prevalência de 1:600 a 1:1000 dos homens com infertilidade primária. O genótipo desta síndrome comumente é 47,XXY, expressando um fenótipo testicular caracterizado pela ausência de células germinativas e hialinização dos túbulos seminíferos. No entanto, alguns indivíduos apresentam um genótipo em mosaico 47,XXY/46,XY que confere um fenótipo de hipoespermatogênese (Garcia-Quevedo et al., 2011).

O transcriptoma testicular foi inicialmente estudado pelo grupo de pesquisa da Universidade Vai Dei Vestini na Itália, demonstrando que o tecido apresenta uma desregulação transcricional envolvendo vários genes presentes nas células de Sertoli e células de Leydig (D'Aurora et al., 2015). Além disso, o mesmo grupo de pesquisa determinou que os indivíduos com S. de Klinefelter porém com fenótipo de hipoespermatogênese, apresentam uma assinatura de genes diferencialmente expressos associados a perda de função das poucas células germinativas presentes no tecido testicular dos indivíduos portadores. Entretanto, a assinatura é diferente com a assinatura detectada em indivíduos com fibrose e hialinização dos túbulos seminíferos (D'Aurora et al., 2017). Nossos resultados mostraram uma assinatura de 2391 genes diferencialmente expressos entre *up-regulated* e *down-regulated*. A maioria de genes eram reprimidos e associados a processos de controle de regulação transcricional dos genes encarregados da modulação do RNA mensageiro sugerindo uma desregulação da maquinaria de transcrição de forma geral nas células de Sertoli, Leydig, mióides e macrófagos.

Dentre os genes com maior importância, ressaltam o *CMTM1* reprimido em indivíduos com síndrome de Klinefelter. O gene está localizado no cromossomo 16 e está envolvido no desenvolvimento do testículo com expressão específica nas células de Sertoli. Assim mesmo os genes *ACRBP*, *PDXK* e *PRMI*, expressos nas células de Sertoli foram detectados como *down-regulated*. Nossos resultados se complementam ao estudo previamente descrito sob o transcriptoma de tecido testicular parafinizado de indivíduos com síndrome de Klinefelter, mostrando a detecção de genes desregulados nas células de Sertoli e Leydig (Winge et al., 2018). De fato, o início da modificação do tecido testicular nos indivíduos portadores da alteração cromossômica 47,XXY começa durante a puberdade (Van Saen et al., 2018) e no adulto, o homem apresenta uma modulação transcricional do tecido degenerado e influenciado pela alteração hormonal e a morte das células germinativas (Winge et al., 2018).

Nosso estudo traz a identificação de novos genes alvos e as vias moleculares em que participam que poderiam ser utilizados no tratamento mediante terapia genica com a finalidade de reverter o fenótipo testicular ou compensar o distúrbio hormonal.

7.5 O papel dos microRNA na infertilidade masculina idiopática com aplasia de células germinativas

Os microRNA são pequenas moléculas de RNA não codificadores de proteína, são sintetizados pela célula numa via de biossíntese alternativa aos RNA mensageiros e regulam a expressão génica eficientemente ao nível de tecido específico (Ambros, 2001). Já foi demonstrado que vários microRNA podem regular a expressão de um único gene mediante um mecanismo de controle post-transcricional, impedindo a tradução do RNAm alvo utilizando o silenciamento do gene ou mediando o transporte da molécula de RNA para a via de degradação (Shivdasani, 2006). No tecido testicular foram identificadas as assinaturas de microRNA associadas aos tipos celulares responsáveis da espermatogénese e da manutenção do tecido celular (Salas-Huetos et al., 2020). No entanto, ainda é possível identificar novos microRNA expressos no tecido testicular que poderiam participar da espermatogénese ou da manutenção do tecido.

Nosso estudo de expressão de microRNAs em indivíduos com infertilidade idiopática detectou um miRNA não descrito previamente como associados ao tecido testicular: hsa-miR-516b-5p, localizado no cromossomo 19. Este microRNA tem como genes alvo *TEX15* e *TEX2* expressos exclusivamente no testículo (Guo et al., 2018). A ausência de expressão deste microRNA no tecido testicular está diretamente associada a ausência da expressão dos genes acima citados porque estes são expressos na transição de espermatogónia-espermatócito, tipos celulares que não estão presentes nos indivíduos com o fenótipo de SCOS idiopático. Porém, os nossos resultados sugerem que este microRNA participaria ativamente na regulação destes genes durante a espermatogénese.

Os resultados obtidos do sequenciamento de pequenos RNA se correlacionam com os dados publicados na tese de doutorado de aluna Camila Dias (Dias, 2018) como demonstrado na Figura 73.

Dentre os microRNA com expressão induzida detectamos a expressão do hsa-miR-122-5p no tecido testicular de homens com infertilidade idiopática. Ainda que este microRNA é normalmente detectado em espermátides (Munoz et al., 2015) de indivíduos com espermatogénese completa ou com hipoespermatogénese, observamos um aumento da

expressão deste miRNA em tecido testicular com o fenótipo de SCOS. O padrão de expressão corrobora os dados obtidos em outro estudo sobre expressão diferencial de miRNA no tecido testicular utilizando a metodologia de small-RNA-seq (Fang et al., 2019) e sugere que este miRNA participaria da regulação post-transcricional do fenótipo alterado.

Figura 73. Correlação linear dos resultados obtidos no trabalho de Dias, 2018 e no presente estudo. Os valores dos eixos horizontal e vertical indicam o fold change obtidos nos dois estudos.

7.6 Análise integrada de detecção de alterações genéticas e moleculares em indivíduos com infertilidade masculina primária

A detecção da infertilidade masculina primária é feita inicialmente pelo resultado do exame de espermograma de acordo aos parâmetros estabelecidos pela OMS (Cooper et al., 2010). O fenótipo é confirmado mediante à análise histológica do tecido testicular utilizando uma biópsia de um dos testículos ou dos dois dependendo da avaliação clínica e morfológica do aparelho urogenital do indivíduo (Gert R Dohle et al., 2012; SCHOOR et al., 2002).

Paralelamente, como parte da rotina da avaliação de casais com problemas de infertilidade, é feita uma avaliação genética das possíveis causas de infertilidade. Em homens

é necessário obter o cariotipo (Van Assche et al., 1996) e o perfil de microdeleções na região AZF do cromossomo Y (P. H. Vogt et al., 1996). Parte do nosso estudo visou a detecção das principais causas genéticas da infertilidade masculina primária, obtendo como resultado a detecção da alteração cromossômica com maior frequência no mundo, a síndrome de Klinefelter assim como a detecção de microdeleções no cromossomo Y. Além disso foi detectada uma translocação robertsoniana envolvendo os cromossomos 13 e 14. Os resultados foram correspondentes com os dados obtidos em uma amostra de indivíduos atendidos nos ambulatórios da Reprodução do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (Pina-Neto et al., 2006).

Nosso estudo traz o uso da metodologia de MLPA para a detecção de microdeleções no cromossomo Y (Dutta et al., 2020), tanto do braço curto (p) como do braço longo (q) com a finalidade de estender a detecção dos rearranjos submicroscópicos neste cromossomo. O método resultou eficiente na detecção de microdeleções como mostra a validação feita pela metodologia convencional de PCR-multiplex (Peter H. Vogt, 2004) e por PCR quantitativo em tempo real (qPCR) (Weksberg et al., 2005).

O maior desafio no estudo da infertilidade masculina primária é a detecção dos possíveis eventos moleculares envolvidos nos casos idiopáticos. Estudos do transcriptoma testicular de indivíduos idiopáticos revelaram a alteração dos padrões de expressão de múltiplos genes nos tecidos testiculares de indivíduos com os fenótipos teciduais de parada na maturação de células germinativas e síndrome de célula de Sertoli (Gatta et al., 2010; Malcher et al., 2013; Paduch et al., 2019; Zhu et al., 2016). Só o estudo de Jan et al., 2017 usou uma metodologia nova para a análise da dinâmica transcripcional no testículo de homens com parada na maturação de células germinativas identificou assinaturas de genes perdidos pelas células germinativas o que causaria a incapacidade de se manter funcionalmente no tecido testicular. Nosso trabalho mostra uma assinatura de genes, microRNA e RNAs longos intergênicos não codificadores, interagindo em uma rede de regulação que leva a suspeita da participação de moduladores post transcripcionais na falha da espermatogênese o que direcionaria os futuros estudos para a análise da estrutura e função de todos os elementos reguladores da transcrição com a finalidade de entender a perda da funcionalidade das células germinativas.

7.6.1 Expressão diferencial de RNA mensageiro no tecido testicular com linhagens de células germinativas com falha no desenvolvimento

Dentre os genes diferencialmente expressos, encontram-se genes autossômicos e dos cromossomos sexuais. A comparação feita entre os níveis de expressão dos genes antes da correção com o método de BH e depois mostrou a eficácia do método para detectar falsos positivos. Um exemplo foram os genes do cromossomo Y dos quais oito (21%) deles eram falsos positivos. No entanto identificamos que os 30 restantes correspondem a assinatura de expressão gênica diferencial para a histologia de PMCG. Já foi demonstrado que os experimentos de expressão gênica mediante microarrays são de muita utilidade na identificação de novos genes envolvidos nas patologias testiculares (Gatta et al., 2010; Larriba & Bassas, 2018).

A busca de genes autossômicos associados a espermatogênese resultou na identificação de 19 genes da família gênica SPATA assim como genes da família SPAT e da família GMCL, todos eles com expressão reduzida em PMCG. Além disto, observamos baixa expressão dos genes MAK e GSG1 associados as células germinativas. Os dados são correspondentes com os experimentos de Malcher et al., 2013 na detecção de genes com expressão específica no tecido testicular.

Outrossim, identificamos 44 genes com expressão específica nos testículos dos quais 10 que apresentaram expressão induzida eram do cromossomo Y. E, quatro genes autossômicos eram associados a câncer de testículo. O resto corresponde a genes autossômicos essenciais para manter a estrutura do tecido testicular assim como o desenvolvimento das células germinativas. Os resultados se correlacionam com os dados publicados sob o transcriptoma do testículo por experimentos de RNA-seq de célula única (Guo et al., 2018).

Por outro lado, buscamos genes reguladores do ciclo celular e identificamos 13 genes com esta característica dos quais um só apresentou expressão gênica acima de um valor de *fold change* igual a dois. Idem, identificamos cinco genes associados com a divisão celular dos quais um deles chamou a nossa atenção pelo valor de *fold change* igual a -496,05 e um valor de p ajustado igual a 0,04 correspondente ao gene *BODIL2* (Biorientation of chromosomes in cell division 1-like 2) localizado no cromossomo 4. O gene é regulado de forma post-transcricional pelos RNAs longos não codificadores próximos à região genômica específicos no tecido testicular e a diminuição da expressão pode estar associado a patologias testiculares (Hadziselimovic, Verkauskas, Vincel, & Stadler, 2019).

7.6.2 Expressão de RNA não codificadores de proteínas na falha do desenvolvimento da espermatogênese

Nos experimentos de expressão gênica para a detecção de miRNA foram interrogadas 36205 sondas para todos os miRNA humanos anotados na base de dados miRbase v2.0. Inicialmente observamos que existe um padrão para cada amostra. Assim, realizamos a análise de expressão gênica diferencial com a finalidade de identificar microRNA maduros diferencialmente expressos entre as condições de OA e MA que se corresponde com trabalhos publicados anteriormente sob o estudo dos microRNA no tecido (Y. Liu et al., 2015; Zhang et al., 2020; Zhuang et al., 2015).

O resultado mostrou que na condição de MA há 22 miRNA; 15 deles com expressão induzida e 7 com expressão reprimida em MA. Destes miRNA, identificamos só quatro miRNA maduros reprimidos em MA que passaram a correção de BH. Estes miRNA foram hsa-miR-7153-5p, hsa-miR-7153, hsa-miR-7154 e hsa-miR-5585-3p, localizados nos cromossomos 18, 11 e 1. Estes últimos não foram reportados previamente no tecido testicular pelo que os resultados sugerem a importância na espermatogênese.

Além disso, interrogamos a expressão de LincRNA em MA quando comparado com OA. Observamos que existem 99 transcritos detectados com uma expressão menor a -2 e maior a 2 e um valor de p ajustado menor de 0,05. Nos resultados identificamos 2 LincRNA induzidos e 97 com expressão reprimida em MA. Um dos LincRNA induzido é LINC01278 localizado no cromossomo X a montante do gene *ARHGEF9* (Xq11.2). O segundo transcrito detectado foi LINC01420 localizado na região intergênica do gene *NBDY* (Negative Regulator Of P-Body Association) localizado no cromossomo X (Xp11.21). Nas células germinativas, os RNA longos intergênicos tem variedade de funções como a regulação da proliferação celular e a regulação post transcricional (Wilhelm & Bernard, 2016) e na espermatogênese participam regulando a expressão de genes e microRNAs, porém ainda são objeto de estudo contante para determinar a modulação durante a produção das gametas. .

7.6.3 Correlação das vias genicas alteradas e o fenotipo clínico da infertilidade masculina primaria

O fenótipo tecidual de aplasia de células germinativas, conhecido como SCOS, mostrou que a alteração nos níveis de expressão de genes e microRNAs poderiam explicar as diversas etiologias associadas ao tipo de tecido. No entanto no tecido adulto é difícil associar

as vias gênicas da infertilidade primária porque elas atuam principalmente nas células germinativas e esta linhagem celular não está presente nos indivíduos com SCOS. Assim, de acordo com nossos resultados e a informação disponível na literatura científica, os indivíduos com SCOS não podem ser estudados desde uma abordagem de desregulação gênica. Por exemplo o resultado da alteração dos genes no tecido adulto poderia ser a consequência de eventos moleculares que acontecem na puberdade ou juventude como explica o trabalho desenvolvido em indivíduos com a síndrome de Klinefelter (Van Saen et al., 2018).

A falha no desenvolvimento da espermatogênese, que gera um fenotipo de parada na maturação de células germinativas é um evento complexo com a participação de múltiplos genes. Pode ser desencadeada por um disparador genético conhecido como uma alteração cromossômica ou alterações no DNA. Entretanto, o tecido testicular ainda apresenta células germinativas que mantem certas funções moleculares observadas normalmente em indivíduos com espermatogênese completa.

O número de genes com expressão genética alterada varia de acordo com a etiologia da parada na maturação das células germinativas, nós observamos que nos idiopáticos, estão comprometidas até 4 vias gênicas da manutenção da espermatogênese. Isto faz com que seja acessível o entendimento da modulação destas vias gênicas na diminuição da expressão de genes importantes. A literatura científica mostra que há muitos genes alterados nesta etiologia e que é a mais estudada pela complexidade (Larriba & Bassas, 2018). Nosso trabalho propõe comparar esta etiologia com as outras etiologias do mesmo fenótipo tecidual com a finalidade de entender o comportamento do RNA mensageiro nas células germinativas nas diferentes etiologias genéticas e idiopáticas.

Conclusões

8 CONCLUSÕES

Em Ribeirão Preto, as etiologias da infertilidade masculina primária mantem a prevalência observada em anos anteriores e ao redor do mundo, o que torna esta condição um elemento importante para a saúde pública que precisa de maiores cuidados e políticas de detecção molecular e atendimento primário.

Nossos resultados concluíram que a detecção do RNA mensageiro, micro RNA, RNA intergênico-longo não codificador e piwi-RNA pode ser realizada em amostras de biópsia testicular fresca assim como em amostras parafinizadas e armazenadas por longos períodos. A qualidade dos resultados evidenciaram que atualmente é possível trabalhar com este tipo de amostras obtendo dados genômicos a grande escala confiáveis e fidedignos que mostram a modulação molecular do tecido analisado.

O transcriptoma da etiologia idiopática da síndrome de célula de Sertoli com aplasia de células germinativas é uma ferramenta molecular precisa e confiável para detectar processos moleculares perdidos ou alterados. Os processos moleculares perdidos estariam diretamente associados a espermatogênese, que corresponde pelo fato de não ter células germinativas no tecido testicular destes pacientes. Além disso observamos que não existe alteração nos níveis de genes específicos das células de Leydig o que corresponde com os níveis hormonais. Por isto tudo, o trabalho mostra que a etiologia idiopática junta alterações de expressão de genes específicos e encarregados da manutenção das células de Sertoli, e revela funções importantes para os microRNA na manutenção do tecido disfuncional.

A síndrome de Klinefelter ao contrário dos idiopáticos apresenta alterações nos padrões de expressão genica nas células de Sertoli e células de Leydig provavelmente como o resultado da desregulação hormonal própria da síndrome. Além disso, observamos a alteração de genes do cromossomo X correlacionada com a descompensação de dose devido a presença de um cromossomo X a mais no genótipo destes pacientes.

A segunda causa cromossômica com maior relevância na infertilidade masculina, as microdeleções no AZF apresentam padrões complexos de interação gênica, porque os resultados identificaram genes autossômicos y do cromossomo X coregulados e provavelmente sob o controle das microdeleções. De forma importante, concluímos que as microdeleções no Y controlam a expressão de genes do próprio cromossomo.

Uma das etiologias da infertilidade masculina primária com pouca prevalência é a translocação robertsoniana envolvendo os cromossomos 13 e 14. Nossos resultados concluíram que o rearranjo estrutural poderia ser a causa da diminuição nos níveis de

expressão dos genes localizados na vizinhança dos pontos de quebra no centrômero. Estes genes são importantes para a proliferação das células germinativas especificamente no espermatócito I, estágio no qual nossa amostra apresentou falha no desenvolvimento.

Finalmente, a etiologia com maior complexidade é a etiologia idiopática na parada na maturação das células germinativas. Existe até hoje uma grande quantidade de genes detectados como *upregulated* e *downregulated* quando comparada com a espermatogênese normal. Nosso trabalho mostra que tanto em amostras de bloco de parafina como amostras de biópsia fresca são detectados vários processos biológicos, moleculares, vias de sinalização e vias metabólicas que explicam o fenótipo observado. Além disso foi estendida a busca de novos genes responsáveis pela infertilidade primária o que resultou na identificação dos genes alterados das vias gênicas da infertilidade masculina. Dentre as vias gênicas que ocorrem nas linhagens celulares precursoras das espermátides temos a via do gene *DAZZ* importante na manutenção das espermatogônias na qual participam em conjunto genes do cromossomo Y e autossômicos regulando a correta expressão de fatores de transcrição assim como a regulação epigenética da linhagem celular. A regulação não depende unicamente da atividade genica, observamos que no tecido testicular adulto com falha na espermatogênese idiopática existe uma modulação e participação ativa de RNAs não codificadores de proteína como microRNA, lincRNA e piwiRNA orquestrando redes de regulação que poderiam estar alteradas nesta patologia.

Com tudo, nos concluímos no presente trabalho que as etiologias genéticas e idiopáticas da infertilidade masculina primária apresentam mecanismos de regulação molecular próprios que são independentes do tipo de patologia tecidual (fenótipo testicular) observado nos indivíduos inférteis.

Sugestões para Trabalhos Futuros

9 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

O presente trabalho será complementado com o estudo de um número maior de amostras com a finalidade de confirmar os padrões de expressão genica e de RNAs não codificadores relatados.

O estudo deveria ser complementado com um trabalho transversal em diferentes localidades dos Brasil e levantar os dados moleculares no nível populacional e assim utilizar os dados nas políticas de saúde publica associadas a infertilidade masculina.

Referências Bibliográficas

10 REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- A. Jungwirth, T. Diemer, G.R. Dohle, Z. Kopa, C. Krausz, H. T. (2016). Guidelines on Male Infertility. *European Association of Urology*, (March), 1–24. <https://doi.org/10.1007/978-1-60761-193-6>
- Abu-Halima, M., Backes, C., Leidinger, P., Keller, A., Lubbad, A. M., Hammadeh, M., & Meese, E. (2014). MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. *Fertility and Sterility*, 101(1). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.09.009>
- Agarwal, A., Gupta, S., & Sharma, R. (2016). Andrological evaluation of male infertility. *Switzerland: Springer International Publishing*.
- Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 13(1), 37. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>
- Aksglaede, L., Wikström, A. M., Meyts, E. R.-D., Dunkel, L., Skakkebaek, N. E., & Juul, A. (2006). Natural history of seminiferous tubule degeneration in Klinefelter syndrome. *Human Reproduction Update*, 12(1), 39–48.
- Alechine, E., & Corach, D. (2014). High-throughput screening for spermatogenesis candidate genes in the AZFc region of the Y chromosome by multiplex real time PCR followed by high resolution melting analysis. *PLoS ONE*, 9(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0097227>
- Alvarez-Garcia, I., & Miska, E. A. (2005). MicroRNA functions in animal development and human disease. *Development*, 132(21), 4653–4662.
- Ambros, V. (2001). microRNAs: tiny regulators with great potential. *Cell*, 107(7), 823–826.
- Ambulkar, P. S., Sigh, R., Reddy, M. V. R., Varma, P. S., Gupta, D. O., Shende, M. R., & Pal, A. K. (2014). Genetic risk of azoospermia factor (AZF) microdeletions in idiopathic cases of azoospermia and oligozoospermia in central Indian population. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(3), 88–91. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2014/7680.4200>
- Anders, S., Pyl, P. T., & Huber, W. (2015). HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 31(2), 166–169. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu638>

- Baazeem, A., Belzile, E., Ciampi, A., Dohle, G., Jarvi, K., Salonia, A., ... Zini, A. (2011). Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. *Eur Urol.*, 60(4), 796–808. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2011.06.018>
- Backman, T. W. H., & Girke, T. (2016). systemPipeR: NGS workflow and report generation environment. *BMC Bioinformatics*, 17(1), 388.
- Bahrami Zadegan, S., Dabbagh Bagheri, S., Joudaki, A., Samiee Aref, M. H., Saeidian, A. H., Abiri, M., & Zeinali, S. (2018). Development and implementation of a novel panel consisting 20 markers for the detection of genetic causes of male infertility. *Andrologia*, 50(4), e12946.
- Balkan, M., Tekes, S., & Gedik, A. (2008). Cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening studies in infertile males with Oligozoospermia and Azoospermia in Southeast Turkey. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 25(11–12), 559–565. <https://doi.org/10.1007/s10815-008-9272-8>
- Barad, O., Meiri, E., Avniel, A., Aharonov, R., Barzilai, A., Bentwich, I., ... Karov, Y. (2004). MicroRNA expression detected by oligonucleotide microarrays: system establishment and expression profiling in human tissues. *Genome Research*, 14(12), 2486–2494.
- Becherel, O. J., Fogel, B. L., Zeitlin, S. I., Samaratunga, H., Greaney, J., Homer, H., & Lavin, M. F. (2019). Disruption of spermatogenesis and infertility in ataxia with oculomotor apraxia type 2 (AOA2). *The Cerebellum*, 18(3), 448–456.
- Behulova, R., Strhakova, L., Boronova, I., Cibulkova, A., Konecny, M., Danisovic, L., & Repiska, V. (2011). DNA analysis of Y chromosomal AZF region in Slovak population with fertility disorders. *Bratislava Medical Journal*, 112(4), 183–187.
- Belleannée, C., Calvo, E., Thimon, V., Cyr, D. G., Légaré, C., Garneau, L., & Sullivan, R. (2012). Role of microRNAs in controlling gene expression in different segments of the human epididymis. *PloS One*, 7(4), e34996.
- Ben Khelifa, M., Ghieh, F., Boudjenah, R., Hue, C., Fauvert, D., Dard, R., ... Vialard, F. (2018). A MEI1 homozygous missense mutation associated with meiotic arrest in a consanguineous family. *Human Reproduction*, 33(6), 1034–1037.
- Berglund, A., Viuff, M. H., Skakkebak, A., Chang, S., Stochholm, K., & Gravholt, C. H. (2019). Changes in the cohort composition of turner syndrome and severe non-diagnosis of Klinefelter, 47, XXX and 47, XYY syndrome: a nationwide cohort study. *Orphanet Journal of Rare Diseases*, 14(1), 1–9.

- Bioinformatics, B. (2011). FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data. *Cambridge, UK: Babraham Institute*.
- Bolger, A. M., Lohse, M., & Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 30(15), 2114–2120. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btu170>
- Bornstein, C., Brosh, R., Molchadsky, A., Madar, S., Kogan-Sakin, I., Goldstein, I., ... Rotter, V. (2011). SPATA18, a spermatogenesis-associated gene, is a novel transcriptional target of p53 and p63. *Molecular and Cellular Biology*, 31(8), 1679–1689. <https://doi.org/10.1128/MCB.01072-10>
- Bouhallier, F., Allioli, N., Lavial, F., Chalmel, F., Perrard, M.-H., Durand, P., ... Rouault, J.-P. (2010). Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. *Rna*, 16(4), 720–731.
- Bracke, A., Peeters, K., Punjabi, U., Hoogewijs, D., & Dewilde, S. (2018). A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. *Reproductive Biomedicine Online*, 36(3), 327–339.
- Browne, J. A., Leir, S.-H., Eggener, S. E., & Harris, A. (2018). Region-specific microRNA signatures in the human epididymis. *Asian Journal of Andrology*, 20(6), 539.
- Cao, C., Wen, Y., Wang, X., Fang, N., Yuan, S., & Huang, X. (2018). Testicular piRNA profile comparison between successful and unsuccessful micro-TESE retrieval in NOA patients. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 35(5), 801–808.
- Carrara, R. D. C. V. (2000). Estudo citogenético e molecular da esterilidade masculina humana.
- Carrara, R. de C. V., Yamasaki, R., Llorach Velludo, M. A. S., Martins, A. C. P., Ferriani, R. A., & Pina Neto, J. M. de. (1998). Avaliação clínica e citogenética da esterilidade e infertilidade masculina humana. *Jornal Brasileiro de Urologia PP - Rio de Janeiro*, 24(2), 64–70.
- Carrara, R. de C. V., Yamasaki, R., Mazucatto, L. F., Veludo, M. A. L., Sartorato, E. L., & Pina-Neto, J. M. (2004). Somatic and germ cell cytogenetic studies and AZF microdeletion screening in infertile men. *Genetics and Molecular Biology*, 27(4), 477–482.
- Catford, S. R., O'Bryan, M. K., McLachlan, R. I., Delatycki, M. B., & Rombauts, L. (2019). Germ cell arrest associated with aSETX mutation in ataxia oculomotor apraxia type 2. *Reproductive Biomedicine Online*, 38(6), 961–965.

- Cerilli, L. A., Kuang, W., & Rogers, D. (2010). A Practical Approach to Testicular Biopsy Interpretation for Male Infertility. *Archives of Pathology & Laboratory Medicine*, 134(8), 1197–1204. <https://doi.org/10.1043/2009-0379-RA.1>
- Chen, Haiqi, Mruk, D., Xiao, X., & Cheng, C. Y. (2017). Human Spermatogenesis and Its Regulation BT - Male Hypogonadism: Basic, Clinical and Therapeutic Principles. In S. J. Winters & I. T. Huhtaniemi (Eds.) (pp. 49–72). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-53298-1_3
- Chen, Hengling, Yi, M., Sheng, Y., Cheng, H., & Zhou, R. (2013). A Novel Testis-Enriched Gene Spata33 Is Expressed during Spermatogenesis. *PLoS ONE*, 8(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067882>
- Chen, J., Cai, T., Zheng, C., Lin, X., Wang, G., Liao, S., ... Hu, X. (2017). MicroRNA-202 maintains spermatogonial stem cells by inhibiting cell cycle regulators and RNA binding proteins. *Nucleic Acids Research*, 45(7), 4142–4157.
- Chen, X., Li, X., Guo, J., Zhang, P., & Zeng, W. (2017). The roles of microRNAs in regulation of mammalian spermatogenesis. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, 8(1), 35.
- Cioppi, F., Rosta, V., & Krausz, C. (2021). Genetics of Azoospermia. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(6), 3264.
- Colaco, S., & Modi, D. (2018). Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 14.
- Colaco, S., & Modi, D. (2019). Consequences of Y chromosome microdeletions beyond male infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1–9.
- Colombo, R., Pontoglio, A., & Bini, M. (2017). Two novel TEX15 mutations in a family with nonobstructive azoospermia. *Gynecologic and Obstetric Investigation*, 82(3), 283–286.
- Cooper, T. G., Noonan, E., Von Eckardstein, S., Auger, J., Baker, H. W., Behre, H. M., ... Mbizvo, M. T. (2010). World Health Organization reference values for human semen characteristics. *Human Reproduction Update*, 16(3), 231–245.
- Cousineau, T. M., & Domar, A. D. (2007). Psychological impact of infertility. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*, 21(2), 293–308. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2006.12.003>

- Coutton, C., Fissore, R. A., Palermo, G. D., Stouffs, K., & Touré, A. (2016). Male Infertility: Genetics, Mechanism, and Therapies. *BioMed Research International*, 2016. <https://doi.org/10.1155/2016/7372362>
- Croce, C. M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature Reviews Genetics*, 10(10), 704–714.
- D'Aurora, M., Ferlin, A., Di Nicola, M., Garolla, A., De Toni, L., Franchi, S., ... Gatta, V. (2015). Deregulation of sertoli and leydig cells function in patients with klinefelter syndrome as evidenced by testis transcriptome analysis. *BMC Genomics*, 16, 156. <https://doi.org/10.1186/s12864-015-1356-0>
- D'Aurora, M., Ferlin, A., Garolla, A., Franchi, S., D'Onofrio, L., Trubiani, O., ... Gatta, V. (2017). Testis Transcriptome Modulation in Klinefelter Patients with Hypospermatogenesis. *Scientific Reports*, 7.
- Daneshmandpour, Y., Bahmanpour, Z., Hamzeiy, H., Moghaddam, M. M., Moghaddam, M. M., Khademi, B., & Sakhinia, E. (2020). MicroRNAs association with azoospermia, oligospermia, asthenozoospermia, and teratozoospermia: a systematic review. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1–13.
- DE ROOIJ, D. G., & RUSSELL, L. D. (2000). All you wanted to know about spermatogonia but were afraid to ask. *Journal of Andrology*, 21(6), 776–798.
- Demirbilek, H., Ozbek, M. N., Demir, K., Kotan, L. D., Cesur, Y., Dogan, M., ... Yuksel, B. (2015). Normosmic idiopathic hypogonadotropic hypogonadism due to a novel homozygous nonsense c. C969A (p. Y323X) mutation in the KISS 1R gene in three unrelated families. *Clinical Endocrinology*, 82(3), 429–438.
- Dias, C. C. M. (2018). *Estudos de variação genômica em homens azoospermicos e sua correlação com a expressão de microRNAs em tecido testicular*. Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto. <https://doi.org/10.11606/T.17.2018.tde-25052018-142646>
- Dobin, A., Davis, C. A., Schlesinger, F., Drenkow, J., Zaleski, C., Jha, S., ... Gingeras, T. R. (2013). STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, 29(1), 15–21.
- Dohle, G R, Halley, D. J. J., Van Hemel, J. O., van den Ouwel, a M. W., Pieters, M. H. E. C., Weber, R. F. a, & Govaerts, L. C. P. (2002). Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 17(1), 13–16. <https://doi.org/10.1093/humrep/17.1.13>
- Dohle, Gert R, Elzanaty, S., & van Casteren, N. J. (2012). Testicular biopsy: clinical practice and interpretation. *Asian Journal of Andrology*, 14(1), 88–93. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.57>

- Dong, Y., Du, R. C., Jiang, Y. T., Wu, J., Li, L. L., & Liu, R. Z. (2012). Impact of chromosomal translocations on male infertility, semen quality, testicular volume and reproductive hormone levels. *Journal of International Medical Research*, 40(6), 2274–2283.
- Dutta, U. R., Suttur, M. S., Venugopal, V. S., Posanapally, L. P., Gopalasetty, S., Talwar, S., ... Dalal, A. (2020). Cytogenetic and molecular study of 370 infertile men in South India highlighting the importance of copy number variations by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Andrologia*, 52(10), e13761.
- Elkarhat, Z., Belkady, B., Charoute, H., Zarouf, L., Razoki, L., Aboulfaraj, J., ... Barakat, A. (2019). Cytogenetic profile of patients with clinical spectrum of ambiguous genitalia, amenorrhea, and Turner phenotype: A 21-year single-center experience. *American Journal of Medical Genetics Part A*, 179(8), 1516–1524.
- Ellis, P. J. I., Furlong, R. A., Conner, S. J., Kirkman-Brown, J., Afnan, M., Barratt, C., ... Affara, N. A. (2007). Coordinated transcriptional regulation patterns associated with infertility phenotypes in men. *Journal of Medical Genetics*, 44(8), 498–508.
- Ewels, P., Magnusson, M., Lundin, S., & Käller, M. (2016). MultiQC: summarize analysis results for multiple tools and samples in a single report. *Bioinformatics (Oxford, England)*, 32(19), 3047–3048. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btw354>
- Fang, N., Cao, C., Wen, Y., Wang, X., Yuan, S., & Huang, X. (2019). MicroRNA profile comparison of testicular tissues derived from successful and unsuccessful microdissection testicular sperm extraction retrieval in non-obstructive azoospermia patients. *Reproduction, Fertility and Development*, 31(4), 671–682. Retrieved from <https://doi.org/10.1071/RD17423>
- Feig, C., Kirchhoff, C., Ivell, R., Naether, O., Schulze, W., & Spiess, A. N. (2007). A new paradigm for profiling testicular gene expression during normal and disturbed human spermatogenesis. *Molecular Human Reproduction*, 13(1), 33–43. <https://doi.org/10.1093/molehr/gal097>
- Ferlin, A., Moro, E., Garolia, A., & Foresta, C. (1999). Human male infertility and Y chromosome deletions: Role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY. *Human Reproduction*, 14(7), 1710–1716. <https://doi.org/10.1093/humrep/14.7.1710>
- Ferlin, A., Tessari, A., Ganz, F., Marchina, E., Barlati, S., Garolla, A., ... Foresta, C. (2005). Association of partial AZFc region deletions with spermatogenic impairment and male infertility. *Journal of Medical Genetics*, 42(3), 209–213. <https://doi.org/10.1136/jmg.2004.025833>
- Ferlin, Alberto, Santa Rocca, M., Vinanzi, C., Ghezzi, M., Di Nisio, A., & Foresta, C. (2015). Mutational screening of NR5A1 gene encoding steroidogenic factor 1 in cryptorchidism and male factor infertility and functional analysis of seven undescribed mutations. *Fertility and Sterility*, 104(1), 163–169.

- Fesai, O. A., Pampukha, V. M., Solovyov, O. O., & Livshits, L. A. (2008). Molecular-genetic analysis of AZF gene defects located on Y-chromosome, and CFTR gene in male infertility. *Biopolymers and Cell*, 24(3), 231–237. <https://doi.org/10.7124/bc.0007A5>
- Foresta, C., Ferlin, A., & Moro, E. (2000). Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Human Molecular Genetics*, 9(8), 1161–1169. <https://doi.org/10.1093/hmg/9.8.1161>
- Fox, M. S., Ares, V. X., Turek, P. J., Haqq, C., & Reijo Pera, R. A. (2003). Feasibility of Global Gene Expression Analysis in Testicular Biopsies From Infertile Men. *Molecular Reproduction and Development*, 66(4), 403–421. <https://doi.org/10.1002/mrd.10364>
- Friedländer, M. R., Mackowiak, S. D., Li, N., Chen, W., & Rajewsky, N. (2012). miRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Research*, 40(1), 37–52. <https://doi.org/10.1093/nar/gkr688>
- Frydman, N., Romana, S., Le Lorc'h, M., Vekemans, M., Frydman, R., & Tachdjian, G. (2001). Assisting reproduction of infertile men carrying a Robertsonian translocation. *Human Reproduction*, 16(11), 2274–2277.
- Garcia-Quevedo, L., Blanco, J., Sarrate, Z., Català, V., Bassas, L., & Vidal, F. (2011). Hidden mosaicism in patients with Klinefelter's syndrome: implications for genetic reproductive counselling. *Human Reproduction*, 26(12), 3486–3493.
- Gatta, V., Raicu, F., Ferlin, A., Antonucci, I., Scioletti, A. P., Garolla, A., ... Stuppia, L. (2010). Testis transcriptome analysis in male infertility: new insight on the pathogenesis of oligo-azoospermia in cases with and without AZFc microdeletion. *BMC Genomics*, 11, 401. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-401>
- Gershoni, M., Hauser, R., Barda, S., Lehavi, O., Arama, E., Pietrokovski, S., & Kleiman, S. E. (2019). A new MEIOB mutation is a recurrent cause for azoospermia and testicular meiotic arrest. *Human Reproduction*, 34(4), 666–671.
- Gershoni, M., Hauser, R., Yogev, L., Lehavi, O., Azem, F., Yavetz, H., ... Kleiman, S. E. (2017). A familial study of azoospermic men identifies three novel causative mutations in three new human azoospermia genes. *Genetics in Medicine*, 19(9), 998–1006.
- Govindkumar, B., Kavyashree, B., Bajpai, A. K., Davuluri, S., Shruthi, K., Vasan, S. S., ... Vashishtkumar, B. (2019). Listing candidate diagnostic markers and transcriptomic exploration of the molecular basis of a type of male infertility (Non-Obstructive Azoospermia), via next generation sequencing methods. *BioRxiv*, 778670.

- Guo, J., Grow, E. J., Mlcochova, H., Maher, G. J., Lindskog, C., Nie, X., ... Cai, L. (2018). The adult human testis transcriptional cell atlas. *Cell Research*, 28(12), 1141–1157.
- Hadziselimovic, F., Verkauskas, G., Vincel, B., & Stadler, M. B. (2019). Testicular expression of long non-coding RNAs is affected by curative GnRHa treatment of cryptorchidism. *Basic and Clinical Andrology*, 29(1), 1–13.
- Harchegani, A. B., Shafaghatian, H., Tahmasbpour, E., & Shahriary, A. (2018). Regulatory Functions of MicroRNAs in Male Reproductive Health: A New Approach to Understanding Male Infertility. *Reproductive Sciences*, 1933719118765972.
- He, Z., Jiang, J., Kokkinaki, M., Tang, L., Zeng, W., Gallicano, I., ... Dym, M. (2013). MiRNA-20 and mirna-106a regulate spermatogonial stem cell renewal at the post-transcriptional level via targeting STAT3 and Ccnd1. *Stem Cells*, 31(10), 2205–2217.
- Hermann, B. P., Cheng, K., Singh, A., Roa-De La Cruz, L., Mutoji, K. N., Chen, I.-C., ... Westernströer, B. (2018). The mammalian spermatogenesis single-cell transcriptome, from spermatogonial stem cells to spermatids. *Cell Reports*, 25(6), 1650–1667.
- Holstein, A. F., Schütte, B., Becker, H., & Hartmann, M. (1987). Morphology of normal and malignant germ cells. *International Journal of Andrology*, 10(1), 1–18.
- Imken, L., El Houate, B., Chafik, A., Nahili, H., Boulouiz, R., Abidi, O., ... Rouba, H. (2007). AZF microdeletions and partial deletions of AZFc region on the Y chromosome in Moroccan men. *Asian Journal of Andrology*, 9(5), 674–678. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7262.2007.00290.x>
- Irvine, D. S. (1998). Epidemiology and aetiology of male infertility. *Human Reproduction*, 13(suppl_1), 33–44. Retrieved from http://dx.doi.org/10.1093/humrep/13.suppl_1.33
- Jan, S. Z., Jongejan, A., Korver, C. M., van Daalen, S. K. M., van Pelt, A. M. M., Repping, S., & Hamer, G. (2018). Distinct prophase arrest mechanisms in human male meiosis. *Development*, 145(16), dev160614.
- Jan, S. Z., Vormer, T. L., Jongejan, A., Röling, M. D., Silber, S. J., de Rooij, D. G., ... van Pelt, A. M. M. (2017). Unraveling transcriptome dynamics in human spermatogenesis. *Development*, 144(20), 3659–3673.
- Jegou, B., Stephan, J. P., Cudicini, C., Gomez, E., Bauche, F., Piquet-Pellorce, C., & Touzalin, A. M. (2000). The Sertoli Cell-Germ Cell Interactions and the Seminiferous Tubule Interleukin-1 and Interleukin-6 System. In *The Genetic Basis of Male Infertility* (pp. 53–68). Springer.

- Johannisson, R., Schwinger, E., Wolff, H. H., Vom Ende, V., & Löhrs, U. (1993). The effect of 13; 14 Robertsonian translocations on germ-cell differentiation in infertile males. *Cytogenetic and Genome Research*, 63(3), 151–155.
- Kasak, L., & Laan, M. (2020). Monogenic causes of non-obstructive azoospermia: challenges, established knowledge, limitations and perspectives. *Human Genetics*, 1–20.
- Kasak, L., Punab, M., Nagirnaja, L., Grigorova, M., Minajeva, A., Lopes, A. M., ... Laasik, E. (2018). Bi-allelic recessive loss-of-function variants in FANCM cause non-obstructive azoospermia. *The American Journal of Human Genetics*, 103(2), 200–212.
- Khabour, O. F., Fararjeh, A. F. S., & Alfaouri, A. A. (2014). Genetic screening for AZF Y chromosome microdeletions in Jordanian azoospermic infertile men. *International Journal of Molecular Epidemiology and Genetics*, 5(1), 47–50.
- Klinefelter Jr, H. F., Reifenstein Jr, E. C., & Albright Jr, F. (1942). Syndrome characterized by gynecomastia, aspermatogenesis without A-Leydigism, and increased excretion of follicle-stimulating hormone. *The Journal of Clinical Endocrinology*, 2(11), 615–627.
- Krausz, C., Quintana-Murci, L., Barboux, S., Siffroi, J. P., Rouba, H., Delafontaine, D., ... McElreavey, K. (1999). A high frequency of Y chromosome deletions in males with nonidiopathic infertility. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 84(10), 3606–3612. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.10.6040>
- Krausz, C., & Casamonti, E. (2017). Spermatogenic failure and the Y chromosome. *Human Genetics*, 136(5), 637–655.
- Krausz, Csilla, & Forti, G. (2000). Clinical Aspects of Male Infertility BT - The Genetic Basis of Male Infertility. In K. McElreavey (Ed.) (pp. 1–21). Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg. https://doi.org/10.1007/978-3-540-48461-5_1
- Krausz, Csilla, & Riera-Escamilla, A. (2018). Genetics of male infertility. *Nature Reviews Urology*, 1.
- Kumar, R. (2008). Reproductive tract tuberculosis and male infertility. *Indian Journal of Urology: IJU: Journal of the Urological Society of India*, 24(3), 392–395. <https://doi.org/10.4103/0970-1591.42624>
- Larriba, S., & Bassas, L. (2018). Chapter 8 - Altered Transcriptomic Profiles Associated With Male Infertility. In J. A. Horcajadas & J. B. T.-R. Gosálvez (Eds.) (pp. 125–145). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-0-12-812571-7.00009-5>

- Lenkala, D., LaCroix, B., Gamazon, E. R., Geleher, P., Im, H. K., & Huang, R. S. (2014). The impact of microRNA expression on cellular proliferation. *Human Genetics*, 133(7), 931–938.
- Levin, H. S. (1979). Testicular biopsy in the study of male infertility: Its current usefulness, histologic techniques, and prospects for the future. *Human Pathology*, 10(5), 569–584. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0046-8177\(79\)80100-8](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0046-8177(79)80100-8)
- Li, C., & Zhou, X. (2012). Gene transcripts in spermatozoa: markers of male infertility. *Clinica Chimica Acta*, 413(13–14), 1035–1038.
- Li, Y., Wang, H.-Y., Wan, F.-C., Liu, F.-J., Liu, J., Zhang, N., ... Li, J.-Y. (2012). Deep sequencing analysis of small non-coding RNAs reveals the diversity of microRNAs and piRNAs in the human epididymis. *Gene*, 497(2), 330–335.
- Lian, J., Tian, H., Liu, L., Zhang, X. S., Li, W. Q., Deng, Y. M., ... Sun, F. (2010). Downregulation of microRNA-383 is associated with male infertility and promotes testicular embryonal carcinoma cell proliferation by targeting IRF1. *Cell Death & Disease*, 1(11), e94–e94.
- Lian, Jie, Zhang, X., Tian, H., Liang, N., Wang, Y., Liang, C., ... Sun, F. (2009). Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 7(1), 13.
- Liang, Y., Ridzon, D., Wong, L., & Chen, C. (2007). Characterization of microRNA expression profiles in normal human tissues. *BMC Genomics*, 8(1), 166.
- Liu, X. G., Hu, H. Y., Guo, Y. H., & Sun, Y. P. (2016). Correlation between Y chromosome microdeletion and male infertility. *Genetics and Molecular Research*, 15(2). <https://doi.org/10.4238/gmr.15028426>
- Liu, Y., Niu, M., Yao, C., Hai, Y., Yuan, Q., Liu, Y., ... He, Z. (2015). Fractionation of human spermatogenic cells using STA-PUT gravity sedimentation and their miRNA profiling. *Scientific Reports*, 5(1), 1–11.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and. *Methods*, 25, 402–408. <https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262>
- Love, M. I., Huber, W., & Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biology*, 15(12), 550. <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>

- Luciani, J. M., Guichaoua, M. R., Mattei, A., & Morazzani, M. R. (1984). Pachytene analysis of a man with a 13q; 14q translocation and infertility. *Cytogenetic and Genome Research*, 38(1), 14–22.
- Maiburg, M., Repping, S., & Giltay, J. (2012). The genetic origin of Klinefelter syndrome and its effect on spermatogenesis. *Fertility and Sterility*. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.06.019>
- Malcher, A., Rozwadowska, N., Stokowy, T., Kolanowski, T., Jedrzejczak, P., Zietkowiak, W., & Kurpisz, M. (2013). Potential biomarkers of nonobstructive azoospermia identified in microarray gene expression analysis. *Fertility and Sterility*, 100(6), 1686–1694.
- Miyamoto, T., Hasuike, S., Yorgev, L., Maduro, M. R., Ishikawa, M., Westphal, H., & Lamb, D. J. (2003). Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. *The Lancet*, 362(9397), 1714–1719. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(03\)14845-3](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0140-6736(03)14845-3)
- Muciaccia, B., Boitani, C., Berloco, B. P., Nudo, F., Spadetta, G., Stefanini, M., ... Vicini, E. (2013). Novel stage classification of human spermatogenesis based on acrosome development. *Biology of Reproduction*, 89(3), 60–61.
- Munoz, X., Mata, A., Bassas, L. L., Larriba, S., Muñoz, X., Mata, A., ... Larriba, S. (2015). Altered miRNA Signature of Developing Germ-cells in Infertile Patients Relates to the Severity of Spermatogenic Failure and Persists in Spermatozoa. *Scientific Reports*, 5(November), 17991. <https://doi.org/10.1038/srep17991>
- Nakamura, S., Miyado, M., Saito, K., Katsumi, M., Nakamura, A., Kobori, Y., ... Okada, H. (2017). Next-generation sequencing for patients with non-obstructive azoospermia: implications for significant roles of monogenic/oligogenic mutations. *Andrology*, 5(4), 824–831.
- Nickkholgh, B., Korver, C. M., van Daalen, S. K. M., van Pelt, A. M. M., & Repping, S. (2015). AZFc deletions do not affect the function of human spermatogonia in vitro. *Mhr: Basic Science of Reproductive Medicine*, 21(7), 553–562.
- Niu, Z., Goodyear, S. M., Rao, S., Wu, X., Tobias, J. W., Avarbock, M. R., & Brinster, R. L. (2011). MicroRNA-21 regulates the self-renewal of mouse spermatogonial stem cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 108(31), 12740–12745.
- Noordam, M. J., Westerveld, G. H., Hovingh, S. E., van Daalen, S. K. M., Korver, C. M., van der Veen, F., ... Repping, S. (2011). Gene copy number reduction in the azoospermia factor c (AZFc) region and its effect on total motile sperm count. *Human Molecular Genetics*, 20(12), 2457–2463. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddr119>

- Noveski, P., Popovska-Jankovic, K., Kubelka-Sabit, K., Filipovski, V., Lazarevski, S., Plaseski, T., & Plaseska-Karanfilska, D. (2016). MicroRNA expression profiles in testicular biopsies of patients with impaired spermatogenesis. *Andrology*. <https://doi.org/10.1111/andr.12246>
- Okada, H., Tajima, A., Shichiri, K., Tanaka, A., Tanaka, K., & Inoue, I. (2008). Genome-wide expression of azoospermia testes demonstrates a specific profile and implicates ART3 in genetic susceptibility. *PLoS Genetics*, 4(2), e26.
- Okutman, O., Muller, J., Baert, Y., Serdarogullari, M., Gultomruk, M., Piton, A., ... Skory, V. (2015). Exome sequencing reveals a nonsense mutation in TEX15 causing spermatogenic failure in a Turkish family. *Human Molecular Genetics*, 24(19), 5581–5588.
- Oliver-Bonet, M., Benet, J., Sun, F., Navarro, J., Abad, C., Liehr, T., ... Martin, R. H. (2005). Meiotic studies in two human reciprocal translocations and their association with spermatogenic failure. *Human Reproduction*, 20(3), 683–688.
- Omrani, M. D., Samadzade, S., Bagheri, M., & Attar, K. (2006). Y chromosome microdeletions in idiopathic infertile men from West Azarbaijan. *Urology Journal*, 3(1), 38–43. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17590851>
- Oud, M. S., Volozonoka, L., Smits, R. M., Vissers, L. E. L. M., Ramos, L., & Veltman, J. A. (2019). A systematic review and standardized clinical validity assessment of male infertility genes. *Human Reproduction*, 34(5), 932–941.
- P.J., S., A., M., P.N., S., & D.A., P. (2010). Testicular expression analysis of the AZF genes in azoospermic men suggests essentiality and specific function for DDX3Y, RPS4Y2, CDY2, and HSFY. *Fertility and Sterility*, 94(4), S232. Retrieved from <http://www.embase.com/search/results?subaction=viewrecord&from=export&id=L70267821%5Cnhttp://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.07.901%5Cnhttp://sfx.library.uu.nl/utrecht?sid=EMBASE&issn=00150282&id=doi:10.1016%2Fj.fertnstert.2010.07.901&atitle=Testicul>
- Paduch, D. A., Hilz, S., Grimson, A., Schlegel, P. N., Jedlicka, A. E., & Wright, W. W. (2019). Aberrant gene expression by Sertoli cells in infertile men with Sertoli cell-only syndrome. *PloS One*, 14(5), e0216586–e0216586. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0216586>
- Park, M. J., Shin, K. J., Kim, N. Y., Yang, W. I., Cho, S. H., & Lee, H. Y. (2008). Characterization of deletions in the DYS385 flanking region and null alleles associated with AZFc microdeletions in Koreans. *Journal of Forensic Sciences*, 53(2), 331–334. <https://doi.org/10.1111/j.1556-4029.2008.00660.x>

- Pereza, N., Črnjar, K., Buretić-Tomljanović, A., Volk, M., Kapović, M., Peterlin, B., & Ostojić, S. (2013). Y chromosome azoospermia factor region microdeletions are not associated with idiopathic recurrent spontaneous abortion in a Slovenian population: Association study and literature review. *Fertility and Sterility*, 99(6), 1663–1667. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.01.101>
- Pina-Neto, J. M., Carrara, R. C. V, Bisinella, R., Mazzucato, L. F., Martins, M. D., Sartoratto, E., & Yamasaki, R. (2006). Somatic cytogenetic and azoospermia factor gene microdeletion studies in infertile men. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 39(4), 555–561. <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2006000400017>
- Pointud, J.-C., Mengus, G., Brancorsini, S., Monaco, L., Parvinen, M., Sassone-Corsi, P., & Davidson, I. (2003). The intracellular localisation of TAF7L, a paralogue of transcription factor TFIID subunit TAF7, is developmentally regulated during male germ-cell differentiation. *Journal of Cell Science*, 116(9), 1847 LP – 1858. Retrieved from <http://jcs.biologists.org/content/116/9/1847.abstract>
- Pritchard, C. C., Cheng, H. H., & Tewari, M. (2012). MicroRNA profiling: approaches and considerations. *Nature Reviews Genetics*, 13(5), 358–369. <https://doi.org/10.1038/nrg3198>
- Reijo, R., Lee, T.-Y., Salo, P., Alagappan, R., Brown, L. G., Rosenberg, M., ... Page, D. C. (1995). Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genetics*, 10(4), 383–393. <https://doi.org/10.1038/ng0895-383>
- Riera-Escamilla, A., Enguita-Marruedo, A., Moreno-Mendoza, D., Chianese, C., Sleddens-Linkels, E., Contini, E., ... Ruiz-Castañé, E. (2019). Sequencing of a ‘mouse azoospermia’ gene panel in azoospermic men: identification of RNF212 and STAG3 mutations as novel genetic causes of meiotic arrest. *Human Reproduction*, 34(6), 978–988.
- Rockett, J. C., Patrizio, P., Schmid, J. E., Hecht, N. B., & Dix, D. J. (2004). Gene expression patterns associated with infertility in humans and rodent models. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 549(1–2), 225–240.
- Rolf, C., Gromoll, J., Simoni, M., & Nieschlag, E. (2002). Natural transmission of a partial AZFb deletion of the Y chromosome over three generations: case report. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 17(9), 2267–2271.
- Rowley, M. J., Berlin, J. D., & Heller, C. G. (1971). The ultrastructure of four types of human spermatogonia. *Zeitschrift Für Zellforschung Und Mikroskopische Anatomie*, 112(2), 139–157.

- Sadeghi-Nejad, H., & Farrokhi, F. (2006). Genetics of azoospermia: current knowledge, clinical implications, and future directions. Part I. *Urology Journal*, 3(4), 193–203.
- Salas-Huetos, A., James, E. R., Aston, K. I., Carrell, D. T., Jenkins, T. G., & Yeste, M. (2020). The role of miRNAs in male human reproduction: A systematic review. *Andrology*, 8(1), 7–26.
- Sarkar, R., & Marimuthu, K. M. (1983). Association between the degree of mosaicism and the severity of syndrome in Turner mosaics and Klinefelter mosaics. *Clinical Genetics*, 24(6), 420–428.
- Sato, H., Miyamoto, T., Yogev, L., Namiki, M., Koh, E., Hayashi, H., ... Sengoku, K. (2006). Polymorphic alleles of the human MEI1 gene are associated with human azoospermia by meiotic arrest. *J Hum Genet*, 51(6), 533–540. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1007/s10038-006-0394-5>
- SCHOOR, R. A., ELHANBLY, S., NIEDERBERGER, C. S., & ROSS, L. S. (2002). THE ROLE OF TESTICULAR BIOPSY IN THE MODERN MANAGEMENT OF MALE INFERTILITY. *The Journal of Urology*, 167(1), 197–200. [https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(05\)65411-0](https://doi.org/https://doi.org/10.1016/S0022-5347(05)65411-0)
- Sha, Y., Zheng, L., Ji, Z., Mei, L., Ding, L., Lin, S., ... Li, P. (2018). A novel TEX11 mutation induces azoospermia: a case report of infertile brothers and literature review. *BMC Medical Genetics*, 19(1), 1–7.
- Shivdasani, R. A. (2006). MicroRNAs: regulators of gene expression and cell differentiation. *Blood*, 108(12), 3646–3653.
- Silber, S. (2018). *Fundamentals of male infertility*. Springer.
- Smyth, C. M., & Bremner, W. J. (1998). Klinefelter syndrome. *Archives of Internal Medicine*, 158(12), 1309–1314.
- Sohni, A., Tan, K., Song, H.-W., Burow, D., de Rooij, D. G., Laurent, L., ... Vicini, E. (2019). The neonatal and adult human testis defined at the single-cell level. *Cell Reports*, 26(6), 1501–1517.
- Sole-Balcells, F., Jimenez-Cruz, F., de Cabezon, J. S., & Rosello, A. S. (1977). Tuberculosis and infertility in men. *Eur Urol*, 3(3), 129–131. Retrieved from http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=560301

- Soraggi, S., Riera, M., Rajpert-De Meyts, E., Schierup, M. H., & Almstrup, K. (2020). Evaluating genetic causes of azoospermia: What can we learn from a complex cellular structure and single-cell transcriptomics of the human testis? *Human Genetics*, 1–19.
- Spiess, A.-N., Feig, C., Schulze, W., Chalmel, F., Cappallo-Obermann, H., Primig, M., & Kirchhoff, C. (2007). Cross-platform gene expression signature of human spermatogenic failure reveals inflammatory-like response. *Human Reproduction*, 22(11), 2936–2946.
- Stahl, P., Barbieri, C., Mielnik, A., Hsiao, W., Schlegel, P., & Paduch, D. (2010). Expression analysis of candidate genes for spermiogenesis in men with idiopathic nonobstructive azoospermia. *Journal of Urology*, 183(4 SUPPL. 1), e731–e732.
- Stahl, P. J., & Schlegel, P. N. (2012). Genetic evaluation of the azoospermic or severely oligozoospermic male. *Current Opinion in Obstetrics & Gynecology*, 24(4), 221–228. <https://doi.org/10.1097/GCO.0b013e3283558560>
- Stamou, M. I., & Georgopoulos, N. A. (2018). Kallmann syndrome: phenotype and genotype of hypogonadotropic hypogonadism. *Metabolism*, 86, 124–134.
- Starega-Roslan, J., Koscińska, E., Kozłowski, P., & Krzyżosiak, W. J. (2011). The role of the precursor structure in the biogenesis of microRNA. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 68(17), 2859.
- Stouffs, K., Vloeberghs, V., Gheldof, A., Tournaye, H., & Seneca, S. (2017). Are AZF b deletions always incompatible with sperm production? *Andrology*, 5(4), 691–694.
- Stuppia, L., Gatta, V., Calabrese, G., Franchi, P. G., Morizio, E., Bombieri, C., ... Tenaglia, R. (1998). A quarter of men with idiopathic oligo-azoospermia display chromosomal abnormalities and microdeletions of different types in interval 6 of Yq11. *Human Genetics*, 102(5), 566–570.
- Tang, D., Huang, Y., Liu, W., & Zhang, X. (2016). Up-regulation of microRNA-210 is associated with spermatogenesis by targeting IGF2 in male infertility. *Medical Science Monitor: International Medical Journal of Experimental and Clinical Research*, 22, 2905.
- Tang, D., Huang, Z., He, X., Wu, H., Peng, D., Zhang, L., & Zhang, X. (2018). Altered miRNA profile in testis of post-cryptorchidopexy patients with non-obstructive azoospermia. *Reproductive Biology and Endocrinology*, 16(1), 78.
- Tian, H., Cao, Y. X., Zhang, X. S., Liao, W. P., Yi, Y. H., Lian, J., ... Yin, M. M. (2013). The targeting and functions of miRNA-383 are mediated by FMRP during spermatogenesis. *Cell Death & Disease*, 4(5), e617–e617.

- Van Assche, E., Bonduelle, M., Tournaye, H., Joris, H., Verheyen, G., Devroey, P., ... Liebaers, I. (1996). Cytogenetics of infertile men. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 11 Suppl 4, 1–24; discussion 25–26. https://doi.org/10.1093/humrep/11.suppl_4.1
- Van Saen, D., Vloeberghs, V., Gies, I., Mateizel, I., Sermon, K., De Schepper, J., ... Goossens, E. (2018). When does germ cell loss and fibrosis occur in patients with Klinefelter syndrome? *Human Reproduction*, 33(6), 1009–1022.
- VanWert, J. M., Wolfe, S. A., & Grimes, S. R. (2008). Binding of RFX2 and NF-Y to the testis-specific histone H1t promoter may be required for transcriptional activation in primary spermatocytes. *Journal of Cellular Biochemistry*, 104(3), 1087–1101. <https://doi.org/10.1002/jcb.21694>
- Vogt, P. H., Edelmann, A., Kirsch, S., Henegariu, O., Hirschmann, P., Kiesewetter, F., ... Haidl, G. (1996). Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Human Molecular Genetics*, 5(7), 933–943. <https://doi.org/10.1093/hmg/5.7.933>
- Vogt, P. H. (1998). Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Molecular Human Reproduction*, 4(8), 739–744. <https://doi.org/10.1093/molehr/4.8.739>
- Vogt, Peter H. (2004). Genomic heterogeneity and instability of the AZF locus on the human Y chromosome. *Molecular and Cellular Endocrinology*. <https://doi.org/10.1016/j.mce.2004.06.008>
- Vogt, Peter H., Bender, U., Zimmer, J., & Strowitzki, T. (2017). Human y Chromosome and Male Infertility: Forward and Back from Azoospermia Factor Chromatin Structure to Azoospermia Factor Gene Function. *Monographs in Human Genetics*, 21, 57–73. <https://doi.org/10.1159/000477278>
- Waclawska, A., & Kurpisz, M. (2012). Key functional genes of spermatogenesis identified by microarray analysis. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 58(5), 229–235. <https://doi.org/10.3109/19396368.2012.693148>
- Wang, C., Yang, C., Chen, X., Yao, B., Yang, C., Zhu, C., ... Shao, Y. (2011). Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clinical Chemistry*, 57(12), 1722–1731.
- Wang, M., Liu, X., Chang, G., Chen, Y., An, G., Yan, L., ... Dong, J. (2018). Single-cell RNA sequencing analysis reveals sequential cell fate transition during human spermatogenesis. *Cell Stem Cell*, 23(4), 599–614.

- Wang, R. X., Fu, C., Yang, Y. P., Han, R. R., Dong, Y., Dai, R. L., & Liu, R. Z. (2010). Male infertility in China: Laboratory finding for AZF microdeletions and chromosomal abnormalities in infertile men from Northeastern China. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27(7), 391–396. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9420-9>
- Weksberg, R., Hughes, S., Moldovan, L., Bassett, A. S., Chow, E. W., & Squire, J. A. (2005). A method for accurate detection of genomic microdeletions using real-time quantitative PCR. *BMC Genomics*, 6, 180. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-6-180> [pii]
- Wikström, A. M., & Dunkel, L. (2011). Klinefelter syndrome. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(2), 239–250. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2010.09.006>
- Wilhelm, D., & Bernard, P. (2016). *Non-coding RNA and the Reproductive System*. Springer.
- Winge, S. B., Dalgaard, M. D., Belling, K. G., Jensen, J. M., Nielsen, J. E., Aksglaede, L., ... Juul, A. (2018). Transcriptome analysis of the adult human Klinefelter testis and cellularity-matched controls reveals disturbed differentiation of Sertoli-and Leydig cells. *Cell Death & Disease*, 9(6), 586.
- Wu, X., Luo, C., Hu, L., Chen, X., Chen, Y., Fan, J., ... Sun, F. (2020). Unraveling epigenomic abnormality in azoospermic human males by WGBS, RNA-Seq, and transcriptome profiling analyses. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 1–14.
- Yamada, K., Fujita, K., Quan, J., Sekine, M., Kashima, K., Yahata, T., & Tanaka, K. (2010). Increased apoptosis of germ cells in patients with AZFc deletions. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 27(6), 293–297. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9400-0>
- Yang, F., Silber, S., Leu, N. A., Oates, R. D., Marszalek, J. D., Skaletsky, H., ... Wang, P. J. (2015). TEX 11 is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse. *EMBO Molecular Medicine*, 7(9), 1198–1210.
- Yang, Q., Hua, J., Wang, L., Xu, B., Zhang, H., Ye, N., ... Zhang, Y. (2013). MicroRNA and piRNA profiles in normal human testis detected by next generation sequencing. *PloS One*, 8(6), e66809.
- Yang, Y., Zhang, S. Z., Peng, L. M., Ding, X. P., Lin, L., & Wang, J. (2003). Studies on molecular epidemiology of Y chromosome azoospermia factor microdeletions in Chinese patients with idiopathic azoospermia or severe oligozoospermia. *Chinese Journal of Medical Genetics*, 20(5), 385–389. <https://doi.org/10.1007/s10815-010-9400-0> [pii]

- Yao, C., Yuan, Q., Niu, M., Fu, H., Zhou, F., Zhang, W., ... Li, Z. (2017). Distinct expression profiles and novel targets of microRNAs in human spermatogonia, pachytene spermatocytes, and round spermatids between OA patients and NOA patients. *Molecular Therapy-Nucleic Acids*, 9, 182–194.
- Yatsenko, A. N., Georgiadis, A. P., Röpke, A., Berman, A. J., Jaffe, T., Olszewska, M., ... Rajkovic, A. (2015). X-linked TEX11 mutations, meiotic arrest, and azoospermia in infertile men. *New England Journal of Medicine*, 372(22), 2097–2107.
- Yin, H., Ma, H., Hussain, S., Zhang, H., Xie, X., Jiang, L., ... Jiang, H. (2019). A homozygous FANCM frameshift pathogenic variant causes male infertility. *Genetics in Medicine*, 21(1), 62–70.
- Yu, Z., Raabe, T., & Hecht, N. B. (2005). MicroRNA Mirn122a Reduces Expression of the Posttranscriptionally Regulated Germ Cell Transition Protein 2 (Tnp2) Messenger RNA (mRNA) by mRNA Cleavage1. *Biology of Reproduction*, 73(3), 427–433. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.105.040998>
- Yuen, R. K. C., Merkoullovitch, A., Macdonald, J. R., Vlasschaert, M., Lo, K., Grober, E., ... Scherer, S. W. (2014). Development of a high-resolution Y-chromosome microarray for improved male infertility diagnosis. *Fertility and Sterility*, 101(4). <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.12.027>
- Zare-Abdollahi, D., Safari, S., Mirfakhraie, R., Movafagh, A., Bastami, M., Azimzadeh, P., ... Omrani, M. D. (2015). Mutational screening of the NR5A1 in azoospermia. *Andrologia*, 47(4), 395–401.
- Zhang, H.-T., Zhang, Z., Hong, K., Tang, W.-H., Liu, D.-F., Mao, J.-M., ... Jiang, H. (2020). Altered microRNA profiles of testicular biopsies from patients with nonobstructive azoospermia. *Asian Journal of Andrology*, 22(1), 100.
- Zhu, Z., Li, C., Yang, S., Tian, R., Wang, J., Yuan, Q., ... Li, Z. (2016). Dynamics of the Transcriptome during Human Spermatogenesis: Predicting the Potential Key Genes Regulating Male Gametes Generation. *Scientific Reports*, 6(August 2015), 19069. <https://doi.org/10.1038/srep19069>
- Zhuang, X., Li, Z., Lin, H., Gu, L., Lin, Q., Lu, Z., & Tzeng, C.-M. (2015). Integrated miRNA and mRNA expression profiling to identify mRNA targets of dysregulated miRNAs in non-obstructive azoospermia. *Scientific Reports*, 5, 7922.
- Zorrilla, M., & Yatsenko, A. N. (2013). The Genetics of Infertility: Current Status of the Field. *Current Genetic Medicine Reports*, 1(4), 247–260. <https://doi.org/10.1007/s40142-013-0027-1>

Apêndice

APÊNDICE

APÊNDICE 1

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Identificação e caracterização molecular de pequenos RNA não codificadores de proteínas em biópsia testicular de homens com azoospermia ou oligospermia severa.

Pesquisador: Jorge Victor Wilfredo Cachay Wester

Área Temática: Genética Humana:

(Haverá armazenamento de material biológico ou dados genéticos humanos no exterior e no País, quando de forma conveniada com instituições estrangeiras ou em instituições comerciais);

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

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

(Reprodução assistida);

Versão: 2

CAAE: 93832518.5.0000.5440

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.847.621

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto incluído na Área de Genética Humana e Reprodução Humana, a ser desenvolvido pelo pesquisador JOÃO VICTOR WILFREDO CACHAY WESTER, sob a orientação do Professor Doutor João Monteiro de Pina Neto. A infertilidade masculina é uma condição que pode apresentar causas genéticas, ambientais, multifatoriais e com etiologia desconhecida. Dentre as causas genéticas mais frequentes temos as cromossomopatias como a Síndrome de Klinefelter ou as microdeleções no cromossomo Y (Yq11). Tem sido identificada a alteração na expressão de genes importantes na espermatogênese e ciclo celular associada diretamente com a infertilidade em homens; além disso a variação na expressão de genes localizados no cromossomo Y resulta no mau desenvolvimento do órgão reprodutor masculino. Recentemente tem sido estudada a participação de pequenos RNA não codificadores de proteínas chamados de microRNA (miRNA) no

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@icp.usp.br

APÊNDICE 2

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO MOLECULAR DO TRANSCRIPTOMA EM AMOSTRAS PARAFINADAS DE TECIDO TESTICULAR DE HOMENS COM AZOOSPERMIA

Pesquisador: Jorge Victor Wilfredo Cachay Wester

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 1

CAAE: 35888720.3.0000.5440

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.191.253

Apresentação do Projeto:

A infertilidade masculina é uma condição que pode apresentar causas genéticas, ambientais, multifatoriais e de etiologia desconhecida. Dentre as causas genéticas mais frequentes temos as cromossomopatias como a Síndrome de Klinefelter ou as microdeleções que podem ocorrer no cromossomo Y (Yq11). Estudos identificaram alterações na expressão de genes importantes envolvidos na espermatogênese e ciclo celular, associadas diretamente com a infertilidade em homens. Além disso, a variação na expressão de genes localizados no cromossomo Y resulta no desenvolvimento incompleto do órgão reprodutor masculino. Estudos recentes de células germinativas demonstraram a presença de pequenos RNAs não codificadores de proteínas chamados de microRNAs (miRNA) envolvidos no ciclo celular; entretanto ainda sabe-se pouco sobre a função destas moléculas no tecido germinativo masculino. No estudo em questão pretende-se identificar e caracterizar miRNAs e RNAm (RNA mensageiro). Para tal serão estudadas amostras parafinadas de tecido testicular antigas de homens com diagnóstico de infertilidade masculina e azoospermia armazenadas no laboratório de Patologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. O material genético será extraído e submetido a Sequenciamento de Nova Geração para obtenção do transcriptoma. A análise bioinformática dos dados obtidos será realizada utilizando a plataforma de R e os algoritmos disponíveis na base computacional de

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-500
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

APÊNDICE 3 - TABELAS

Tabela S1. Características das amostras de biópsia de testículo parafinizada e fresca utilizadas no estudo molecular do transcriptoma.

Grupo	Histopatologia	Etiologia: Amostra selecionada
Biópsias parafinizadas		
OA	Espermatogênese normal	Obstrutiva: J9OA, J13OA, J16OA Idiopática: J6MA, J7MA
MA	Parada na maturação de células germinativas	Translocação robertsoniana: J2MA Deleção na região AZF: J4MA Idiopática: J10SCOS, J11SCOS, J14SCOS, J15SCOS
SCOS	Síndrome de célula de Sertoli- <i>only</i>	Síndrome de Klinefelter: J3SCOS, J8SCOS Deleção na região AZF: J1SCOS, J5SCOS, J12SCOS
Grupo	Histopatologia	Etiologia: Amostra coletada
Biópsia fresca		
OA	Espermatogênese normal	Obstrutiva: I03, I04, I10, I11, I12, I17 Idiopática: I13, I14, I15
MA	Parada na maturação de células germinativas	Translocação robertsoniana: I02 Deleção na região AZF: I07 Idiopática: I09
SCOS	Síndrome de célula de Sertoli- <i>only</i>	Síndrome de Klinefelter: I01, I06 Deleção na região AZF: I05, I16

Tabela S2. 100 genes diferencialmente expressos em nas comparações realizadas.

Nº	SCOS vs OA	MA vs OA	MA vs SCOS	Klinef. vs OA	AZF vs OA
1	ALB	GBGT1	OSBPL7	ADA	OR10H4
2	DACH2	PCDH11Y	IL31RA	ANK1	PCDH11Y
3	MC4R	SLC17A3	KCNN2	APOBEC3H	PEX5L
4	PCDH11Y	CDH18	SLC35F1	BFSP1	PPP1R3A
5	PDE6C	CSF2RB	TOPAZ1	DSG4	SLC12A3
6	PRAMEF8	DLL1	VASH2	FADS6	SLC26A5
7	PRF1	MC4R	PKD2L1	FCGR1A	ACP6
8	RTL8B	PCDHB8	FCRL5	IGHD	CLCA1
9	SLC17A3	PRAMEF8	AVPR1A	IGKV3-20	FPR1
10	TDRD9	ST18	C5orf17	IL33	S100A9
13	SYTL5	TAS2R5	BRF2	NECTIN4	SLC17A3
12	MIR548A3	TRAJ16	DAPP1	ORAI1	TNNT2
11	ARSJ	SPDYE16	LYZL6	SLC12A3	APOB
14	OR2AJ1	OTOF	SYTL5	ARHGAP27	PSTPIP1
15	FKBP6	ARL14	ZNF280A	BAIAP2-DT	RIMKLA
17	NEK2	CACNA1S	ZSCAN4	CETP	PRF1
16	GRM6	CD36	PFKFB1	CHCHD1	ST18
20	PTH2R	CDH13	CDC25C	CLCA1	PTPRZ1
21	SLC24A2	CENPX	COL23A1	DEFB115	ALB
19	ECSCR	CRPPA	BCL2L12	EFCAB9	PRAMEF8
18	CXCR3	CXCR3	MIR335	ERVFRD-1	FZD5
22	TUBA3C	CYP24A1	CA5A	FMO3	MC4R
26	DHRS4L1	CYP26C1	CNDP1	GAGE13	SLC22A9
36	TSGA13	DACH2	GDPD2	GOLGA8H	DACH2
27	E2F8	DYNC1I1	LCN1	IGHJ5	GRHL2
29	GLIPR1L2	E2F8	LOC105370616	KCNA7	PDE6C
28	FAM83C	ECSCR	NLRP4	KCNJ5	RTL8B
31	HBEGF	ERP27	OR2A25	KCNQ3	TNS4
23	ARL14	ESAM	AMBP	KLRG2	XIRP2
24	CENPX	FAM83C	HASPIN	LILRB3	AFP
32	MEIOB	GATA2	HIST1H3H	LINC02125	ARHGAP24
37	ZNF534	GCNT2	PCGF6	MPZL2	ARSJ
33	NRAP	GPA33	NRBF2	NOD1	CRPPA
25	CYP26C1	IGKC	DAO	OR2M5	LINC01531

Nº	SCOS vs OA	MA vs OA	MA vs SCOS	Klinef. vs OA	AZF vs OA
35	TDGF1	KCNN2	CEP55	PEX5L	MIR548A3
30	GPA33	L1CAM	UNC5D	SLAMF7	MMP20
34	RNFT2	LHFPL4	OR7A17	SQOR	PCDHGA7
38	GRIN1	MELTF	GCM2	UGT1A10	PDZD7
39	ERP27	MFSD10	GPR31	ZNF720	SH2D4A
40	TMEM151B	MIR548A3	ZBTB42	CXCR2	SYTL5
41	GK2	PARVB	MAD2L1	IL1R2	ZNF542P
42	REG3A	PCDHGA7	CD8B	SCGB2B2	ZNF720
43	SLC25A45	PRAG1	KCNS2	ADGRG5	ZFAND4
44	TCERG1L	PSG7	MRPS22	MIR101-2	CYP2C9
45	LOC100996419	RTL8B	CCM2	SMIM13	PCBP1-AS1
46	U2AF1L5	SALL2	ALPK1	ACSM2B	DGKG
48	PDHA2	STEAP2	RIPK1	ADCYAP1R1	TBX1
47	HYAL4	TAF4A1	CCDC81	ADGRF1	UMODL1
49	OXER1	TDGF1	NPC1L1	ALDH3A1	LINGO1
50	B9D2	TSGA13	CLEC4F	APOB	MGAM2
51	SPATS1	HYAL4	EPHA2	ARL10	PTH2R
53	SYCP1	ICMT	OAS2	ATP13A5	CCDC144CP
52	PET100	IL5RA	HDAC3	C8B	CHRD
56	RASL11B	SLC25A45	BCKDHB	CD5L	CXCR3
54	BAAT	CCDC166	GRID2IP	CDH17	ECSCR
57	TRIM49B	RGS20	CREB3L3	CHRM1	PRAMEF12
55	KIF11	CCDC125	ARSD	CXCR4	RGS1
58	EFCAB11	PGBD5	MSL3	FLJ33534	SLC24A2
59	ERICH2	LRFN1	VIPR2	GLYATL2	STK31
63	SLC44A5	ENO3	AURKA	IL24	TSGA13
60	ASRGL1	SCARA3	LDHAL6A	KLHL38	TNR
62	REC114	ZMAT4	SLC17A5	MCOLN3	KCNIP1
61	EME1	B9D2	PRSS53	MOSPD2	SPP1
64	IGSF23	LOC728392	PHB	MPP1	DSG3
65	PSMA8	SLC14A2	KIT	PCDHGA5	FAM189A1
67	SLC19A3	CBFA2T3	EPHA8	PSTPIP1	HBEGF
66	CFAP300	ZSCAN4	CHRNA2	PTPRO	NPR1
69	SPIN3	SPSB3	IL21R	RIMKLA	PI4K2A
68	SNRNP40	RASL11B	FGFR2	RTP3	UBE2A

Nº	SCOS vs OA	MA vs OA	MA vs SCOS	Klinef. vs OA	AZF vs OA
70	GIPR	TRAF3IP2	WNT9A	SAGE1	ARL14
72	SKOR1	IGKV2-30	GRXCR1	SH3D21	CENPX
71	NDUFA5	LYZL6	ZNF283	SLC34A2	NRAP
73	SUN3	BCRP3	ARHGAP27	SMPX	ZNF534
81	SPIB	C5orf17	ZNF613	SNORD116-10	CYP26C1
77	HVCN1	FCRL5	GRIK3	TBC1D24	TDGF1
80	L2HGDH	RTKN	NARF	TMEM26	ESAM
83	TFF3	GRIN3A	ADAMTS10	ANKRD2	GPA33
78	KIF24	IGSF23	PQLC1	ATP2B3	GRIN1
75	CDKN3	FAM129A	RIPK4	DUOX2	RNFT2
79	KRBOX1	OR2A7	ADCY4	EMB	CDH13
74	ARMC3	OR2L1P	SLC6A7	IL25	ERP27
76	EPHA10	SLC8A3	MME	LRRTM1	CPLX4
82	TDRD5	SPIN3	AFP	MRGPRF	OSBPL7
84	TTC25	ZNF280A	LOXHD1	NOBOX	HYAL4
85	HSF2BP	CDH16	SLC27A6	NTSR2	REG3A
86	LIAS	LILRB2	SLIT1	PRLR	C7orf31
87	DGKK	RP1L1	IL24	PTER	CDC25B
88	DPEP3	UAP1L1	VWA3A	RGS8	NPHS1
91	TEX50	CNTN6	URGCP	SNORD45A	PLEKHA4
89	HBA1	PCDHGC5	PEX5L	TAS2R50	CUL2
92	UFC1	TFF3	RPS26	TET1	UBA7
90	SNX30	TRHR	CXCL12	SLC16A5	U2AF1L5
93	ZDHHC19	CYP46A1	CCDC159	VSIG4	EVA1C
94	CCDC42	PCYT2	LPL	CACNG3	ARHGAP45
101	TRIP13	TMC6	MTA1	MVB12B	AHI1
100	TRAV12-3	TPO	RIMKLA	CLCN1	PSMA2

*Em vermelho estão indicados os genes detectados em comum entre as comparações.

Tabela S3. Potenciais marcadores moleculares das patologias testicular de MA e SCOS.

Nº	SCOS vs OA	Log2FC	MA vs OA	Log2FC
1	IGHD	27.900332	TAS2R5	30
2	SLC12A3	27.8204665	CSF2RB	29.9130998
3	TLR5	27.5481735	CDH18	29.6903236
4	OTOF	27.416268	PCDHB8	29.6643114
5	CYP11B2	27.3793927	SPDYE16	29.5362257
6	KLHL38	27.3169607	OTOF	29.2951134
7	PNPLA1	26.73823	PARVB	29.2403978
8	APOB	26.6371691	TAFA1	29.1399141
9	NPC1L1	26.6094425	L1CAM	29.1270399
10	TERT	26.5906536	MELTF	29.0853408
11	SRGN	26.559263	LHFPL4	28.9401387
12	GRID2IP	26.4797056	DLL1	28.9401006
13	IGKV3-20	26.3408515	PRAG1	28.8438132
14	RSPO2	26.2663891	DYNC1I1	28.7969003
15	KCNQ4	26.2593998	GCNT2	28.7365761
16	MYH14	26.2271991	CACNA1S	28.7152765
17	GRM4	26.2136365	PSG7	28.7145658
18	ABCA7	26.1585728	KCNN2	28.7130037
19	C8orf34	26.1236557	SALL2	28.6270216
20	ZNF720	26.0485381	IL5RA	28.533918
21	TNR	25.9857921	CCDC166	28.4530586
22	CACNA1S	25.9692737	CCDC125	28.416723
23	WNT9A	25.9018675	PGBD5	28.3950834
24	IL21R	25.838846	LRFN1	28.3786156
25	DUXB	25.7906762	ENO3	28.3405399
26	PDZD7	25.7297458	SLC14A2	28.2831782
27	PTPRZ1	25.6800137	ZSCAN4	28.2405071
28	CLEC1A	25.6015852	IGKV2-30	28.1925502
29	FZD5	25.5748032	LYZL6	28.1838684
30	RP1L1	25.4604413	FCRL5	28.1694195
31	FAM189A1	25.4502046	C5orf17	28.1547752
32	TMEM26	25.432638	GRIN3A	28.1124009
33	PPARGC1B	25.430281	SLC8A3	28.0388261
34	EPHA8	25.4058022	ZNF280A	27.9584882
35	ABCB5	25.3949356	UAP1L1	27.9084538

Nº	SCOS vs OA	Log2FC	MA vs OA	Log2FC
36	ARHGAP27	25.385322	LILRB2	27.9081888
37	PRDM16	25.3457582	RP1L1	27.9036936
38	GRIK3	25.2984165	CNTN6	27.8963634
39	COL22A1	25.2408257	TRHR	27.826044
40	RIPK4	25.123153	TMC6	27.7994278
41	CLDN6	25.0915828	CYP46A1	27.7979452
42	AFP	25.0138245	TSPAN18	27.7976679
43	SLC26A5	24.884712	TPO	27.7953694
44	S100A9	24.8211767	NEK8	27.7352729
45	PEX5L	24.8200637	COL13A1	27.7099419
46	RIMKLA	24.8026769	CD8B	27.6943233
47	ADCY4	24.7699814	FAM129A	27.6772528
48	SNF8	24.7657613	TNS4	27.6710882
49	SCN8A	24.7224762	COL9A2	27.6608137
50	CCDC198	24.6926073	PRIMA1	27.6529591
51	FAM151A	24.6843851	SLC22A17	27.643324
52	SLC4A1	24.6584619	SLC25A25	27.6287355
53	URGCP	24.6016123	CA5A	27.6225191
54	OR9A4	24.5898581	COL23A1	27.616338
55	SLIT1	24.5530582	DAPP1	27.6115269
56	IL24	24.4090819	EBPL	27.5764098
57	SERPINA4	24.3468832	CNDP1	27.5582415
58	GRXCR1	24.2967267	MAP4K2	27.5474162
59	HCK	24.2722802	PROM2	27.4745153
60	IFI30	24.2399238	PSG6	27.39735
61	C12orf65	24.1783629	PPFIA4	27.3886823
62	PTPN2	24.0952558	LOC105370616	27.3864919
63	IL3RA	24.0918996	COL20A1	27.3588006
64	MME	24.0901198	ETHE1	27.3165979
65	MSR1	24.0323043	MIR335	27.2220283
66	C4A	24.0013125	GSTM1	27.1991183
67	PCDHGA5	23.9824061	EVC2	27.1889713
68	CDH1	23.9417288	PSTPIP1	27.1679538
69	LILRB3	23.9143633	GDPD2	27.1183722
70	LYN	23.8753092	PTPRR	27.0408806
71	SLC29A3	23.8708076	TRIM10	26.9977226

Nº	SCOS vs OA	Log2FC	MA vs OA	Log2FC
72	MGAM2	23.8607067	UBA7	26.9866026
73	BMP1	23.8505177	PCGF1	26.9720442
74	CASP4	23.800805	QTRT1	26.8482275
75	TAS2R30	23.7562277	PCDHGA11	26.8350202
76	ZNF564	23.7293154	JPH1	26.8089441
77	FER1L4	23.6933516	RAD51B	26.7183426
78	ZNF616	23.6684518	ATAD3A	26.6497097
79	GNRHR	23.6002785	SPINK5	26.6191252
80	ZNF883	23.5818455	SH2D4A	26.604504
81	LHFPL3	23.5671618	SFMBT2	26.5556652
82	ZFP62	23.5454865	CCT6P3	26.5317544
83	CTSH	23.4822886	ANO9	26.5097353
84	CYP3A4	23.4772672	FHDC1	26.460448
85	ZNF443	23.4479599	ZNF503-AS2	26.4433569
86	TMEM117	23.4194958	LINC00893	26.418985
87	SLC38A11	23.3935394	NTRK1	26.3350529
88	PCDHGB7	23.3903089	OR7A17	26.2998311
89	TMEM106A	23.3893991	DAO	26.2873678
90	SNORD114-1	23.3893974	PROX2	26.2647685
91	FAIM	23.3822453	HOXD8	26.2600896
92	MCOLN3	23.3684984	ISM2	26.2515458
93	PRLR	23.3683234	MTERF1	26.2124233
94	GTF2H2B	23.3601068	APIP	26.1562786
95	KCNQ3	23.3564751	LINGO1	26.1514393
96	CTPS2	23.3557946	CAPN13	26.1498959
97	GPR22	23.3553057	NAALADL1	26.1489808
98	PTPRE	23.3459689	CARD14	26.0940268
99	RAVER2	23.3268837	GRK5	26.081386

Tabela S4. Potenciais marcadores moleculares em AZF - SCOS.

Gene	log2FC	<i>p</i> adj	J13OA	J16OA	J5SCOS	J12SCOS	J15SCOS
CACNA1S	25.969	6.64E-09	0	0	384.890	152.614	21570.182
SNF8	24.765	7.14E-09	0	0	2040.259	107.395	881.860

Tabela S5. Potenciais marcadores moleculares em SCOS - idiopáticos.

Gene	log2FC	<i>p</i> adj	J13OA	J16OA	J10SCOS	J11SCOS	J14SCOS	J15SCOS
SRGN	26	2.60E-09	0	0	1.738	35955.917	80.349	79.880
ZNF720	26	1.17E-09	0	0	26.012	2.597	92.392	0.036
ITGB4	13	0.000590	0	0	82.073	6528.940	66.364	53.315
DZIP1L	11	0.038430	0	0	137.202	4066.953	0.064	203.720
TBRG1	11	0.038430	0	0	598.849	31.164	216.381	91.879
HCLS1	9	0.007478	0	0	37.560	8198.832	0.064	439.657

Tabela S6. Potenciais marcadores moleculares em Klinefelter.

Gene	log2FC	<i>p</i> adj	J13OA	J16OA	J8SCOS	J3SCOS
IGHD	27.900	2.71E-10	0	0	43960.001	10204.112
RSPO2	26.266	4.19E-09	0	0	14895.076	3.339
CLEC1A	25.601	1.18E-08	0	0	8479.594	2090.240
TMEM26	25.432	1.52E-08	0	0	13556.193	2878.254
RIPK4	25.123	2.42E-08	0	0	20269.205	1369.007
SCN8A	24.722	4.40E-08	0	0	7494.027	1145.291
PCDHGA5	23.982	1.30E-07	0	0	167.360	2681.250
SPEG	15.290	0.00026381	0	0	10394.941	1515.925
OSBPL7	14.101	0.00169638	0	0	130.169	1963.356
TBX15	12.576	0.03160291	0	0	46600.576	3.339
SSPO	10.511	0.04213227	0	0	632.250	1412.414
LOC101929601	9.740	0.04485657	0	0	3644.737	968.322

Tabela S7. Potenciais marcadores moleculares em MA

Gene	log2FC	<i>p</i>adj	J13OA	J16OA	J2MA	J4MA	J7MA	J6MA
ITGA2	15.576	0.0001	0	0	121.594	2012.32	11347.768	3.479
SLC22A5	15.170	0.0001	0	0	72.176	12.620	3889.814	6128.136
PIK3R5	14.355	0.0001	0	0	47.467	1060.081	2254.416	2268.906
ADGRB2	13.707	0.0009	0	0	21.024	29.829	794.722	2801.334
MYRFL	13.474	0.0005	0	0	31.970	839.805	586.580	1597.282
TBRG1	13.205	0.0021	0	0	52.018	388.926	2140.884	3.479
APOB	13.150	0.0004	0	0	182.825	697.543	792.019	741.222

APÊNDICE 4 – FIGURAS

Figura S1. Normalização dos dados utilizando o método de RMA. A) Gráfico de caixa mostrando a normalização dos dados em função do log2 da intensidade da fluorescência. **B)** Análise dos componentes principais (PCA) mostrando a similaridade das amostras estudadas.

Figura S2. Níveis hormonais de FSH e LH em indivíduos com síndrome de Klinefelter. Controle: indivíduos com azoospermia obstrutiva.

Figura S3. Níveis hormonais de prolactina e testosterona em indivíduos incluídos no estudo. Controle: indivíduos com azoospermia obstrutiva. PMCG: Parada na maturação de células germinativas. SCOS: Síndrome de célula de Sertoli.

Figura S4. Quantificação dos níveis de expressão relativa dos genes da região AZF por RT-qPCR. Níveis de expressão relativa em azoospermia obstrutiva (J22), Parada na maturação de células germinativas (A) e Síndrome de Klinefelter (B).

Figura S5. Análise multidimensional (MDS) dos grupos de amostras. A) SCOS vs OA. B) MA vs OA. C) SCOS-idiopáticos vs OA. D) MA-idiopáticos vs OA. OA: grupo com azoospermia obstrutiva. MA: grupo com parada na maturação de células germinativas. SCOS: grupo com síndrome de célula de Sertoli.

Figura S6. Triagem inicial de microdeleções no cromossomo Y por PCR-multiplex.

Figura S7. Variação da expressão gênica em 32 genes do cromossomo Y entre MA e OA. Mapa de calor supervisionado mostrando a variação dos níveis de expressão dos genes do cromossomo Y nas amostras estudadas. Dentre os transcritos detectados estão pequenos RNA como os PIWI-RNA (piRNA), RNA não codificadores de proteína (NonCoding) e RNA codificadores de proteínas (Coding). Em azul está indicado os níveis diminuídos e em vermelho estão indicados os níveis induzidos. Observamos que 18 genes localizados na região AZF apresentam variação nos níveis de expressão gênica.

Figura S8. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos entre MA e OA utilizando a base de dados Gene Ontology (GO). A) Gráfico de barras mostrando no eixo horizontal a identificação dos processos biológicos (BP), componentes celulares (CC) e função molecular (MF) e no eixo vertical o valor de p ajustado obtido da análise de anotação. B) Gráfico de burbuja mostrando os processos biológicos mais significativos na análise de anotação.

Figura S9. Anotação funcional dos genes diferencialmente expressos entre MA e OA utilizando a base de dados Gene Ontology (GO) em *clusterprofiler*. A) Gráfico de pontos mostrando no eixo vertical a identificação dos processos biológicos (BP) e no eixo horizontal o valor de GeneRatio obtido da análise de anotação em todos os RNAs mensageiros. B) Gráfico de pontos mostrando no eixo vertical a identificação dos processos biológicos (BP) e no eixo horizontal o valor de GeneRatio obtido da análise de anotação nos RNAs mensageiros do cromossomo Y.