UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

THAÍS FENZ ARAUJO

Análise de genes candidatos associados à infertilidade em pacientes portadores de azoospermia não obstrutiva

Ribeirão Preto

2019

THAÍS FENZ ARAUJO

Análise de genes candidatos associados à infertilidade em pacientes portadores de azoospermia não obstrutiva

Versão original

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Genética

Orientador: Prof. Dr. Aguinaldo Luiz Simões

Ribeirão Preto

2019

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Serviço de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Araujo, Thaís Fenz
Análise de genes candidatos associados à infertilidade em pacientes portadores de azoospermia não obstrutiva. Ribeirão Preto, 2019.
102 p.: il.; 30 cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / Universidade de São Paulo. Área de concentração: Genética
Orientador: Simões, Aguinaldo Luiz.

1. Azoospermia não obstrutiva. 2. Sequenciamento completo do exoma. 3. Genes candidatos. 4. Ensaio da luciferase

APOIO INSTITUCIONAL E SUPORTE FINANCEIRO

Este trabalho foi realizado com apoio e suporte financeiro das seguintes instituições:

1) Programa de Excelência Acadêmica (Proex) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) - cota institucional (demanda social)
2) Programa de Doutorado Sanduíche no Exterior (PDSE) da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) Processo:88881.186971/2018-01
3) Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (HCFMRP-USP)
4) Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo
5) Instituto de Genética Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Münster (Universität Klinikum Münster- UKM)

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: ARAUJO, Thaís Fenz

Título: Análise de genes candidatos associados à infertilidade em pacientes portadores de azoospermia não obstrutiva

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, como parte dos pré-requisitos para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em: __/__/__

Banca Examinadora

Prof. Dr._____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr._____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr._____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Prof. Dr._____

Instituição: _____

Julgamento: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho primeiramente a Deus, por ser essencial em minha vida, autor do meu destino, meu guia e socorro presente na hora da angústia. Dedico também esta conquista, aos meus amados pais, Glauco e Cecília, aos meus irmãos, Thiago e Thomas e ao meu marido, Vagner Ramon.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao professor Dr. Aguinaldo Luíz Simões por ter me aceitado como sua aluna e acreditado na minha capacidade como pesquisadora. Obrigada por ter me apoiado e não ter medido esforços para que eu pudessse desenvolver esse trabalho no exterior. Também agradeço imensamente a todos os integrantes do laboratório de Genética Bioquímica, Maria, Cláudia, Ana, Edna, Marcela, Fernanda, Sabrina, Aline, Vanessa, Igor, Maria Luisa e Juliet, pela linda amizade, apoio, companhia e auxílio profissional nesse período.

Agradeço imensamente ao Prof. Dr. Frank Tüttelmann pela bela co-orientação, que, juntamente com Dr. Albrech Röpke e Dra. Corinna Friedrich tornaram possível realizar um bom trabalho em um período curto de tempo. Também agradeço todo apoio profissional e pessoal fornecido pelos membros do Instituto de Genética Humana de Münster, em especial, Jana, Alice, Margot, Gesa, Nils, Steffi, Christina, Mandy, Christian e Carolin.

Agradeço aos colaboradores do projeto, Profa. Lúcia Regina Martelli e Dr. Carlos Henrique Paiva Grangeiro pela cuidadosa seleção dos pacientes, essenciais ao desenvolvimento do projeto.

Agradeço à querida Susie por todo o auxílio referente às documentações e processos burocráticos e também por ter me recebido tão bem desde o meu primeiro dia!

Agradeço à CAPES por ter me amparado financeiramente (dentro e fora do país) e a todos os funcionários da Universidade de São Paulo, em especial os do dpto. de Genética da FMRP, pela colaboração na conclusão deste trabalho.

Minha eterna gratidão aos meus pais e irmãos por todo suporte e motivação durante essa longa jornada, vocês são minha fonte de energia!

Agradeço ao meu namorado, noivo e agora marido, Vagner Ramon, por me inspirar a ser uma cientista cada vez melhor! Obrigada pelo seu incentivo de explorarmos o mundo e por se fazer sempre presente em minha vida, mesmo estando longe.

RESUMO

ARAUJO, T.F. Análise de genes candidatos associados à infertilidade em pacientes portadores de azoospermia não obstrutiva. 2019. 102 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preo, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

A rotina de exames para o diagnóstico de infertilidade masculina não sofreu alterações nos últimos vinte anos e os atuais testes genéticos disponíveis são capazes de determinar a etiologia de apenas 4% dos pacientes inférteis não selecionados, portanto, para criar novos testes diagnósticos é necessária a melhor compreensão dos mecanismos moleculares e genéticos da infertilidade masculina. Embora o sequenciamente de nova geração tenha permitido a análise simultânea de centenas de genes, poucos genes candidatos possuem evidência suficiente para serem definitivamente associados à infertilidade masculina. Esse trabalho teve como objetivo realizar o sequenciamento completo do exoma de 16 pacientes brasileiros portadores de azoospermia não obstrutiva e analisar um conjunto de genes previamente associados à infertilidade masculina, em busca de variantes causais. Foram selecionados 37 genes associados aos fenótipos apresentandos de azoospermia não obstrutiva, aplasia de células germinativas e parada de maturação de células germinativas. As variantes encontradas foram confirmadas pelo sequenciamento direto de Sanger e a sua patogenicidade foi prevista por programas de análise *in silico*. A seleção racional de genes permitiu a detecção de variantes raras e potencialmente patogênicas em seis pacientes. Duas variantes, c.671A> G em *DMRT1* e c.91C> T no gene *REC8*, foram previamente descritas em pacientes azoospérmicos. Também encontramos novas variantes em genes com evidência moderada de associação a defeitos na espermatogênese (*TEX15, KLHL10*); em genes com evidência limitada (*DNMT3B, TEX14*) e em um gene ainda sem evidência de associação à infertilidade (*SYCE1L*). Adicionalmente este trabalho visou estabelecer um protocolo para realização do estudo funcional de variantes identificadas nos genes *NR5A1* e *DMRT1*. Demonstramos que o ensaio da luciferase, tal como descrito para o gene *NR5A1*, pode ser aplicado para análise do gene *DMRT1* humano, apesar de ainda não ser possível tirar conclusões sobre o efeito das variantes selecionados sobre a expressão dos genes analisados.

Palavras-chave: Azoospermia não obstrutiva, sequenciamento completo do exoma, genes candidatos, ensaio da luciferase.

ABSTRACT

ARAUJO, T.F. Analysis of candidate genes related to infertility in patients with non-obstructive azoospermia. 2019. 102 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2019.

Understanding molecular and genetic mechanisms of male infertility is urgent, in order to create new diagnostic assays, once the routine diagnostic work-up have not changed over the last twenty years and the current available genetic tests are able to determine the etiology of only 4% of unselected infertile patients. The aim of this study was to perform the whole exome sequencing of 16 Brazilian patients with non-obstructive azoospermia searching for causal variants in a set of genes previously associated with male infertility. We selected 37 genes associated with non-obstructive azoospermia, germ cell aplasia and maturation arrest of germ cells. The variants we found were confirmed by Sanger sequencing and their pathogenicity was predicted by *in silico* programs. The rational selection of genes allowed the detection of rare and potentially pathogenic variants is six patients. Two variants, c.671A> G in *DMRT1* and c.91C> T in the *REC8* gene, were previously described in azoospermic patients. We also found new variants in genes with moderate evidence of association with defects in spermatogenesis (*TEX15, KLHL10*); in genes with limited evidence (*DNMT3B, TEX14*) and in a gene without evidence so far (*SYCE1L*). In addition, this work aimed to establish a protocol to perform the functional study of variants identified in the *NR5A1* and *DMRT1* genes. We demonstrated that the luciferase assay, as it is described for the *NR5A1* gene, can be applied for analysis of the human *DMRT1* gene, although it was not possible to draw conclusions about the effect of the selected variants on the expression of the genes analysed.

Keywords: Non-obstructive azoospermia, whole exome sequencing, candidate genes, luciferase assay.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Análises atualmente empregadas durante a rotina clínica de investigação da infertilidade masculina..... 18

Figura 2. Estrutura do cromossomo Y, evidenciando as regiões PAR1 e PAR2 em laranja e região MSY, composta em grande parte de heterocromatina (cinza) 20

Figura 3. Biblioteca pronta, contendo o fragmento de interesse ligado a adaptadores (P1 e P2) e sequencia referência (ID5 e ID7) complexado aos oligonucleotídeos (P5 ou P7), que se ligam à flow-cell 34

Figura 4. Amplificação por ponte, clusterização e linearização da biblioteca.....35

Figura 5. Sequenciamento por síntese 36

Figura 6. Fluxograma evidenciando as etapas do estudo do exoma e análise das variantes encontradas nos genes candidatos..... 41

Figura 7. Esquema ilustrativo evidenciando as etapas de mutagênese, transfecção e quantificação da expressão gênica pelo ensaio da luciferase. 45

Figura 8. Análise básica AZF. 49

Figura 9. Análise estendida (AZF gr/gr). 50

Figura 10. Variantes potencialmente patogênicas identificadas neste estudo. 53

Figura 11. Expressão das variantes no gene *NR5A1*. 57

Figura 12. Expressão das variantes do gene *DMRT1*..... 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Fatores genéticos e anormalidades intrínsecas que ocasionam ausência de espermatozoides no sêmen. 14

Tabela 2. Caracterização clínica dos pacientes NOA selecionados..... 31

Tabela 3. Conjunto de genes selecionados para análise 38

Tabela 4. Lista de primers utilizados para confirmação das variantes encontradas 40

Tabela 5. Variantes dos genes *NR5A1* e *DMRT1* selecionadas para estudo funcional..... 43

Tabela 6. Variantes encontradas nos pacientes NOA 54

Tabela 7. Variantes selecionadas para análise funcional e status do experimento 56

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 13

1.1. ETIOLOGIA DA INFERTILIDADE MASCULINA 13
1.2. DIAGNÓSTICO DA INFERTILIDADE MASCULINA 15
1.2.1. Diagnóstico clínico 15
1.2.2. Diagnóstico genético 16
1.3. ESTUDOS GENÉTICOS EM INFERTILIDADE MASCULINA 19
1.4. VALIDAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À INFERTILIDADE MASCULINA 24
1.5. ESTUDOS FUNCIONAIS 25

2. JUSTIFICATIVA 26

3. HIPÓTESE 27

4. OBJETIVOS 28

4.1. GERAL 28
4.2. ESPECÍFICOS 28

5. MATERIAL E MÉTODOS 29

5.1. AMOSTRAS BIOLÓGICAS 29
5.2. ASPECTOS ÉTICOS 31
5.3. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS 31
5.3.1. Extração de DNA genômico 31
5.3.2. Análise de microdeleções AZF no cromossomo Y 32
5.3.3. Sequenciamento completo do exoma (*Whole Exome Sequencing* - WES). 33
5.3.4. Processamento de dados 36
5.3.5. Seleção de genes candidatos para análise de sequenciamento 37
5.3.6. Seleção de variantes 39
5.3.7. Confirmação das variantes encontradas por sequenciamento de Sanger39
5.3.8. Análise Funcional *in vitro* 41

6. RESULTADOS 49

6.1. ANÁLISE DE MICRODELEÇÕES AZF NO CROMOSSOMO Y 49
6.2. VARIANTES IDENTIFICADAS NOS GENES CANDIDATOS SELECIONADOS 50
6.3. ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE VARIANTES *NR5A1* E *DMRT1* 55

7. DISCUSSÃO 59

7.1. DESAFIOS NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE MICRODELEÇÕES AZF ... 59
7.2. DESAFIOS NO DIAGNÓSTICO GENÉTICO DA INFERTILIDADE MASCULINA 61
7.3. SIGNIFICADO CLÍNICO DAS VARIANTES IDENTIFICADAS..... 62
7.4. ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE VARIANTES *NR5A1* E *DMRT1* 66

8. CONCLUSÃO 67

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 68

10. APÊNDICE..... 74

10.1. PRIMERS UTILIZADOS NA MUTAGENESE E SEQUENCIAMENTO.....77
10.2. ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA ANDROLOGY 76

11. ANEXO..... 1000

11.1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....100
11.2. APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA - Colaboradores 1011
11.3. APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA -Thaís 1012

1. INTRODUÇÃO

A infertilidade conjugal é definida como a incapacidade de gerar descendentes após um período mínimo de doze meses de tentativas frequentes sem o uso de métodos contraceptivos. Para mulheres com idade superior a 35 anos, o tempo mínimo estabelecido é de seis meses (ASRM 2012). Estima-se que 10 a 15% dos casais sexualmente ativos em todo o mundo sejam inférteis (Suganya et al. 2015).

Por muitos anos a incapacidade de gerar filhos foi atribuída exclusivamente às mulheres e embora atualmente seja comprovado que a infertilidade masculina é fator responsável por cerca de metade dos casos de infertilidade conjugal (Suganthi et al. 2014), ainda é muito comum que o homem seja investigado apenas após uma extensiva análise e comprovação da fertilidade de sua parceira, o que pode atrasar o diagnóstico e tratamento da infertilidade masculina (Cocuzza et al. 2013).

1.1. ETIOLOGIA DA INFERTILIDADE MASCULINA

A infertilidade masculina é uma condição complexa com expressão fenotípica variável. Sua origem pode ser determinada por diversos fatores, tais como, traumatismos genitais, infecções urogenitais, doenças sistêmicas, criptorquidismo, varicocele, ejaculação retrógrada, obstruções do vaso deferente, distúrbios hormonais e anomalias genéticas. A exposição a fatores de risco como sedentarismo, tabagismo, alcoolismo, uso de medicamentos, perda ou ganho demasiado de peso, má nutrição e rotina excessiva de exercícios físicos também podem afetar negativamente a fertilidade masculina (Godoy et al. 2014; Suganya et al. 2015; Leaver 2016).

Dentre as possíveis etiologias, é estimado que ao menos 15% dos casos de infertilidade masculina sejam causados por fatores genéticos (Krausz et al. 2015). Desses, as anomalias cromossômicas mais frequentemente encontradas são a Síndrome de Klinefelter (47, XXY), microdeleções no cromossomo Y envolvendo a região do fator de azoospermia (AZF – *Azoospermia Factor*) e translocações envolvendo cromossomos sexuais e/ou cromossomos autossômicos (Suganya et al. 2015; Naasse et al. 2015). Na tabela 1 estão listados os fatores genéticos mais comuns, responsáveis pela infertilidade masculina.

Tabela 1. Fatores genéticos e anormalidades intrínsecas que ocasionam ausência de espermatozoides no sêmen. Tabela adaptada de (Hamada et al. 2013).

Causas pré-testiculares (Não obstrutivas)
Hipogonadismo Hipogonadotrófico Hipotalâmico (deficiência de GnRH)
Congênito (isolado ou Síndrome de Kalmann)
Manifestação tardia
Distúrbios pituitários associados ao hipogonadismo
Deficiência generalizada dos hormônios pituitários (GH, ACTH, TSH, prolactina, LH, FSH)
Deficiência seletiva de gonadotropinas (FSH, LH)
Causas testiculares (Não obstrutivas)
Afetando a espermatogênese e/ou produção de andrógenos
Síndrome de Klinefelter (47, XXY)
Microdeleções AZF no cromossomo Y
Síndrome do Homem XX (46, XX, *SRY*+)
Mosaicismo germinativo (disgenesia gonadal mista - 45, X0/46XY)
Síndrome de Jacobs (47, XYY)
Síndrome de Noonan
Anorquia congênita bilateral (*vanishing testis syndrome*)
Translocações autossômicas
Distúrbios multifatoriais (Ex: Criptorquidismo)
Distúrbios monogênicos
Alterações epigenéticas
Causas pós-testiculares (Obstrutivas)
Fibrose cística
Ausência congênita bilateral do vaso deferente
Ausência congênita unilateral do vaso deferente
Obstrução congênita do ducto ejaculatório
Obstrução congênita bilateral do epidídimo

1.2. DIAGNÓSTICO DA INFERTILIDADE MASCULINA

1.2.1. Diagnóstico clínico

O diagnóstico clínico da infertilidade masculina é realizado com base na análise do sêmen e anamnese do paciente, que consiste no levantamento do histórico médico (ocorrência de traumas genitais, cirurgias, infecções, doenças infantis e doenças sexualmente transmissíveis, uso de medicamentos e exposição à radiação e quimioterapia) e avaliação física, para detecção de varicocele, mensuração do tamanho e anatomia dos testículos e observação da presença de características eunucoides como ginecomastia e padrão feminino de distribuição de pelos. Em seguida, exames complementares como investigação endócrina, ultrassonografia e biópsia testicular podem ser requisitados (Cocuzza et al. 2013).

Cerca de 90% dos homens inférteis possuem espermograma alterado (Leaver 2016), cujos principais fenótipos apresentados são oligozoospermia (número reduzido de espermatozoides no sêmen), astenozoospermia (mobilidade reduzida dos espermatozoides), teratozoospermia (número significativo de espermatozoides com morfologia alterada), oligoastenoteratozoospermia (combinação dos três fenótipos anteriores) e azoospermia (ausência de espermatozóides no sêmen, mesmo após centrifugação) (Tüttelmann et al. 2018). Essa classificação precisa ser realizada com base em pelo menos dois resultados de ejaculação e seguindo as diretrizes da Organização Mundial de Saúde (OMS) para controle de qualidade, uma vez que podem ocorrer variações entre as amostras de sêmen coletadas (WHO 2010).

Dentre os pacientes portadores de azoospermia, 40% apresentam obstruções (*obstructive azoospermia,* OA), geralmente associadas à ejaculação retrógrada ou anomalias anatômicas no epidídimo e vaso deferente, ou seja, há produção de espermatozoides, mas estes não estão presentes no ejaculado devido a causas pós-testiculares que afetam sua migração (Wosnitzer & Goldstein 2014). Em contrapartida, na azoospermia não obstrutiva (*non-obstructive azoospermia*, NOA) há falha na produção de espermatozoides, que pode ser consequencia de causas pré-testiculares, como as alterações hormonais ou causas testiculraes, como os distúrbios da espermatogênese (ASRM 2018).

Em associação com o espermograma, as avaliações hormonais auxiliam no diagnóstico diferencial entre OA e NOA. O tamanho testicular normal, com baixo volume de ejaculado (<1,5 mL) e níveis normais do hormônio folículo estimulante (FSH) e testosterona são comuns à OA, enquanto pacientes com NOA geralmente apresentam testículos reduzidos e aumento dos níveis de FSH (ASRM 2018). Pacientes com suspeita de OA também podem ser submetidos à uroanálise pós-ejaculatória, para detecção de ejaculação retrógrada ou ultrassonografia, para detecção de obstruções no canal ejaculatório (ASRM 2018).

Por ser um procedimento invasivo, a biópsia testicular é restrita aos casos em que não é possível diferenciar entre OA e NOA, como por exemplo, quando o paciente apresenta azoospermia associada ao volume normal dos testículos e sêmen, sem aumento significativo de FSH (ASRM 2018). Dessa forma, muitos indivíduos que já apresentam indícios de NOA, não chegam a realizar biópsia testicular, dificultando a investigação de anomalias na espermatogênese no âmbito de pesquisa.

A biópsia testicular de homens com NOA revela variação histológica, que inclui aplasia de células germinativas (*Sertoli cell-only syndrome*, SCOS), parada completa de maturação de células germinativas (*Maturation arrest*) e hipoespermatogênese ou atrofia testicular mista (*Mixed testicular atrophy*), que consiste na parada de maturação de células germinativas em diferentes estádios de desenvolvimento. Essa variação pode ser consequência da regulação genética ou epigenética da espermatogênese (Gershoni et al. 2017).

1.2.2. Diagnóstico genético

Devido ao componente genético associado à infertilidade masculina e aos riscos de transmissão de anomalias à prole, exames citogenéticos e moleculares tornaram-se parte da rotina para diagnóstico dessa condição (Godoy et al. 2014; Kumari et al. 2015). A triagem genética é relevante antes do início dos procedimentos de fertilização assistida, não apenas pelo seu valor diagnóstico, mas também para a tomada de decisão clínica e aconselhamento genético adequado.

Como a síndrome de Klinefelter é a principal causa genética da infertilidade masculina, o protocolo de exames genéticos se inicia com a análise do cariótipo, que é capaz de detectar anomalias cromossômicas numéricas, mosaicismos e algumas anomalias cromossômicas estruturais (Suganya et al. 2015; Naasse et al. 2015; Bansal et al. 2016).

Em seguida, é realizada a análise molecular de microdeleções AZF no cromossomo Y. Nos últimos anos foi demonstrado que alguns pacientes inférteis com etiologia pré-determinada (tumor testicular, síndrome de Klinefelter e varicocele) apresentaram microdeleções AZF no cromossomo Y (Dai et al. 2015; Krausz et al. 2013), demonstrando a importância desse teste molecular para a realização de um aconselhamento genético mais assertivo (Godoy et al. 2014). Dessa forma, essa análise é atualmente indicada para todos os pacientes que apresentam oligozoospermia severa ($<5\times10^6$ espermatozoides por mL de sêmen) ou azoospermia (Krausz et al. 2013). Juntos, esses dois exames (cariótipo e microdeleções AZF) elucidam a etiologia de apenas de 4% dos pacientes inférteis não selecionados e 20% dos pacientes azoospérmicos (Tüttelmann et al. 2018).

Esse protocolo de exames genéticos não sofreu modificação nos últimos vinte anos (Tüttelmann et al. 2018) e, apesar dos esforços na identificação de genes responsáveis pela infertilidade masculina (Oud et al. 2018), na rotina clínica são analisados apenas o gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator),* em pacientes portadores de azoospermia obstrutiva (ausência de vaso deferente), e um painel de genes em pacientes que apresentam o fenótipo raro de hipogonadismo hipogonadotrófico (Hamada et al. 2013; Tüttelmann et al. 2018).

A figura 1 sintetiza os principais exames que geralmente são realizados durante a rotina clínica de investigação da etiologia da infertilidade masculina (Cocuzza et al. 2013; Krausz et al. 2015; ASRM 2018).

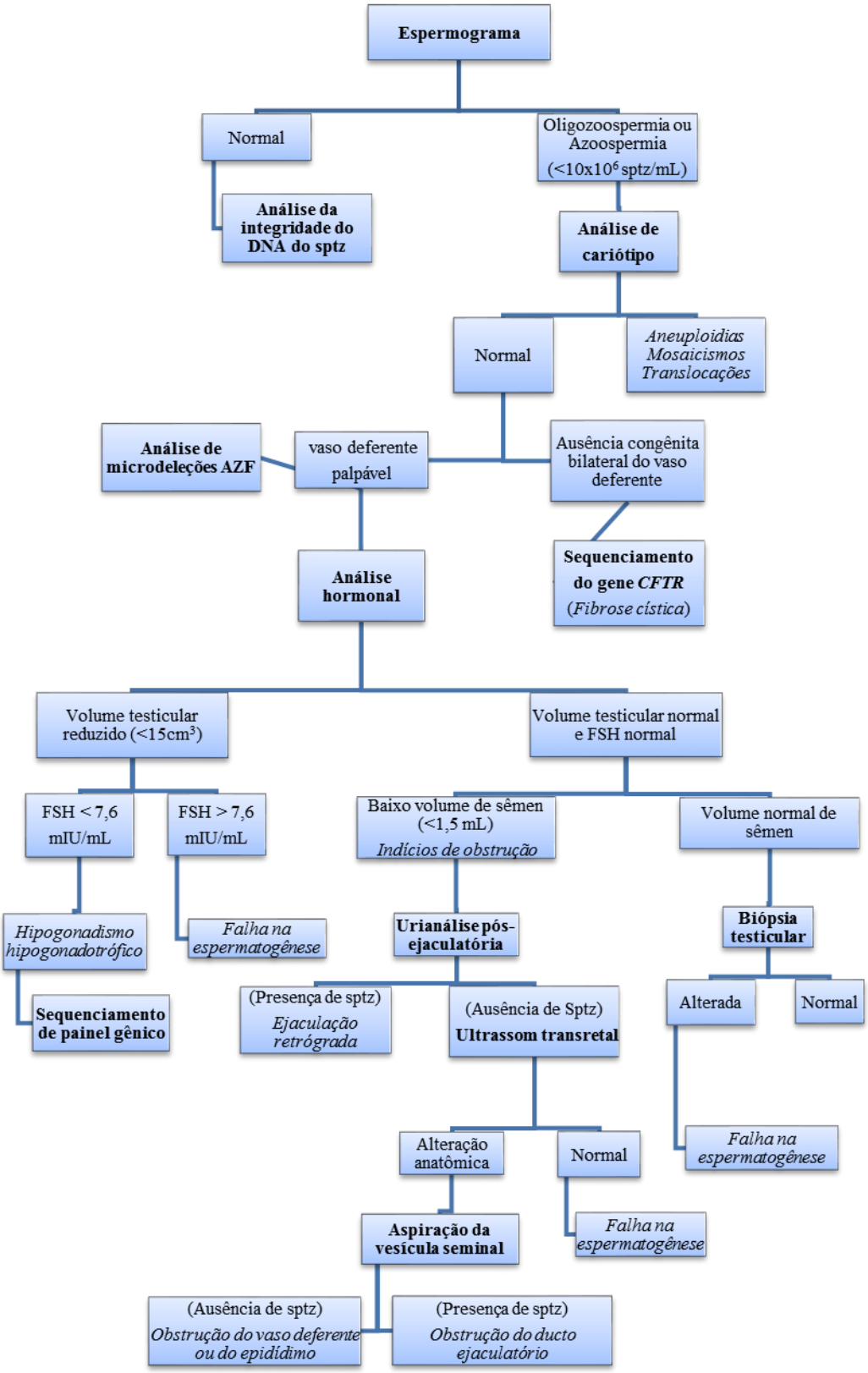

Figura 1. Análises atualmente empregadas durante a rotina clínica de investigação da infertilidade masculina. Sptz: Espermatozoides.

1.3. ESTUDOS GENÉTICOS EM INFERTILIDADE MASCULINA

Com o desenvolvimento da citogenética e associação de aneuploidias em cromossomos sexuais com a infertilidade feminina (Síndrome de Turner; 45,XO) e masculina (Síndrome de Klinefelter; 47,XXY), houve grande interesse da comunidade científica em compreender a estrutura do cromossomo Y e os mecanismos responsáveis pelos erros de segregação dos cromossomos sexuais durante a meiose (Skaletsky et al. 2003; Willard 2003).

Postula-se que os cromossomos sexuais X e Y tenham surgido a partir de um único par de cromossomos autossômicos durante a evolução dos mamíferos e que a diferenciação desses dois cromossomos tenha se iniciado com o surgimento do gene *SRY* (há ~160 milhões de anos), a partir do gene *SOX3* presente no cromossomo ancestral. Posteriormente genes com funções específicas ligadas à determinação sexual masculina teriam se acumulado no proto-cromossomo Y, enquanto o proto-cromossomo X teria mantido genes ancestrais de funções biológicas mais gerais (Navarro-Costa 2012).

Esse processo de diferenciação cromossômica teria sido responsável pela redução das regiões de homologia entre os dois cromossomos sexuais, resultando em uma supressão progressiva da recombinação meiótica entre eles. Enquanto nas fêmeas o cromossomo X possuía seu homólogo para se parear durante a meiose, nos machos o pareamento do cromossomo X com o Y tornou-se cada vez mais restrito às extremidades, denominadas de **PAR1** e **PAR2** (PAR- *Pseudo Autossomic Region*), localizadas nos braços curto (Yp) e longo (Yq) do cromossomo Y, respectivamente (Fig.2). Como consequência desse processo, o cromossomo X manteve-se mais estável ao longo dos anos e o cromossomo Y sofreu sucessivas perdas de material, conversão gênica e duplicações (há ~30 milhões de anos), dando origem a uma região exclusiva denominada de **MSY** (*Male specific region of chromossome Y*) cuja maior parte está inativa e encontra-se condensada na forma de heterocromatina (Navarro-Costa 2012).

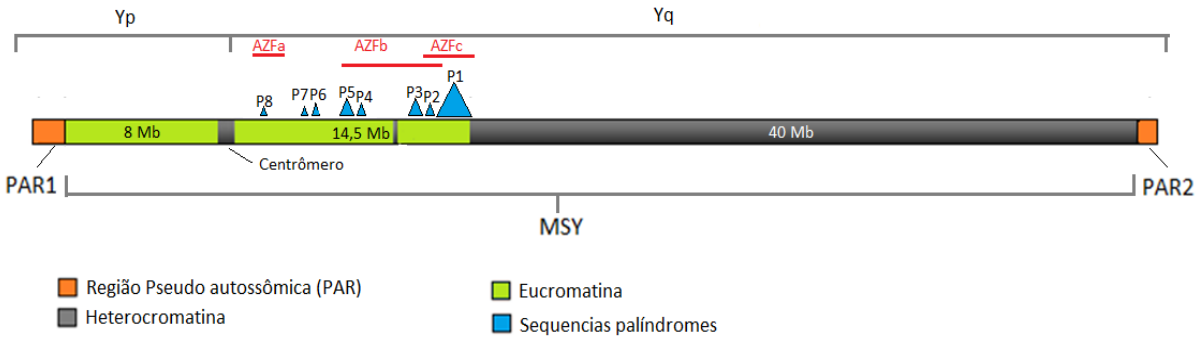

Figura 2. Estrutura do cromossomo Y, evidenciando as regiões PAR1 e PAR2 em laranja e região MSY, composta em grande parte de heterocromatina (cinza). A região codificante (eucromatina), destacada em verde, possui cerca de 23 Mb e está repleta de segmentos palíndromes (Azul, P1-P8). Em vermelho estão destacadas as regiões AZF, onde ocorrem as microdeleções. Yp: braço curto do cromossomo Y (~11 Mb), Yq: braço longo do cromossomo Y (~56 Mb). Figura modificada de (Navarro-Costa 2012; Krausz et al. 2013; Skaletsky et al. 2003).

Apesar da região MSY não sofrer recombinação alélica, pressupõe-se que as oito sequências palíndromes (sequências igualmente lidas em direções opostas) espalhadas na região de eucromatina (codificante) sejam capazes de realizar recombinação entre si, atuando, dessa forma, no "embaralhamento genético" dessa porção de DNA. No entanto, a junção permanente dessas sequências pode levar à perda do material genético entre elas, ocasionando as chamadas microdeleções no cromossomo Y (Borges & Macedo 2016).

As microdeleções no cromossomo Y foram descobertas por Tiepolo e Zuffardi em 1976, na ocasião em que analisavam citogeneticamente o cromossomo Y de seis pacientes azoospermicos (apud (Tyler-smith & Krausz 2009)). O segmento deletado nesses pacientes estava localizado no braço longo do cromossomo Y e foi denominado de região AZF (Azoospermia Factor) (Tyler-smith & Krausz 2009; Suganthi et al. 2014). Essa região foi posteriormente subdividida em três: AZFa, AZFb e AZFc, de acordo com a localização no cromossomo Y (Fig.2) (Tyler-smith & Krausz 2009).

Vale ressaltar que o termo "microdeleções" foi originalmente empregado tendo como referência a resolução das técnicas citogenéticas, mas essas deleções consistem na perda de grandes fragmentos de DNA, com extensão de 0,8 a 7,7 milhões de pares de bases (Mb) (Tyler-smith & Krausz 2009; Navarro-Costa 2012).

A região **AZFa** tem aproximadamente 800Kb (Kilo bases) e contém três genes funcionais – *USP9Y, DBY e UTY* – e ao menos onze pseudogenes com cópias homólogas em X (Suganthi et al. 2014; Yu et al. 2015). Deleções nessa região são resultado de erros na recombinação homóloga entre duas sequencias retrovirais humanas endógenas, denominadas HERV15yq1 e HERV15y12, que estão localizadas na região proximal de Yq11 (Yu et al. 2015). As deleções parciais do segmento AZFa estão associadas à hipoespermatogênese, enquanto a deleção completa inibe a produção e maturação de linhagens germinativas nos túbulos seminíferos, sendo o fenótipo mais severo e também menos frequente dentre as microdeleções AZF (Yu et al. 2015).

A região **AZFb** se estende de 6,2 a 7,7 Mb em MSY, tendo 1,5 Mb de sobreposição com a região AZFc (Yu et al. 2015). Em AZFb estão localizados cerca de 32 genes, todos com expressão restrita ao testículo (Suganthi et al. 2014). Destes, quatro genes de cópia única *KDM5, EIF1AY, RPS4Y2* e *CYORF15* e sete genes de múltiplas cópias – *XKPY, HSFY, RBMY1AY, PRY, CDY, BPY* e *DAZ* – foram considerados fortes candidatos para associação com a infertilidade masculina (Yu et al. 2015). Deleções em AZFb ocorrem por erros na recombinação intracromossômica entre as sequencias palíndromes P5 e P1 (Suganthi et al. 2014). Os portadores dessas deleções possuem espermatogônia e espermatócitos primários dentro da normalidade, porém, as linhagens germinativas ficam estacionadas na fase pré-meiótica, produzindo poucos (oligozoospermia) ou nenhum (azoospermia) espermatozoide maduro (Yu et al. 2015).

A região **AZFc** tem aproximadamente 3,5 Mb de extensão e inclui 21 genes (Suganthi et al. 2014), dos quais três – *CDY1, BPY2* e *DAZ* – se sobrepõem à região AZFb (Yu et al. 2015). Deleções em AZFc ocorrem devido a erros durante as recombinações homólogas entre as sequencias palíndromes P3 e P1 e postula-se que sua proximidade com a região de heterocromatina aumente ainda mais a probabilidade de recombinação intracromossômica inadequada (Yu et al. 2015). Além da deleção completa de AZFc (3,5 Mb), podem ocorrer deleções parciais nessa região, dentre as quais, as deleções **gr/gr** são as mais conhecidas. Essas deleções de aproximadamente 1,6 Mb não eliminam nenhuma família gênica presente em AZF, porém, reduzem o número de cópias de determinados genes, o que pode estar relacionado à diminuição da qualidade ou quantidade de espermatozoides produzidos (Bansal et al. 2016).

As deleções em AZFc são as mais frequentemente encontradas em indivíduos com deficiência na espermatogênese, cuja expressão fenotípica abrange desde normozoospermia até azoospermia (Navarro-Costa et al. 2010; Bansal et al. 2016). Foi proposto que essa diversidade de fenótipos se deva à ocorrência de recombinações aleatórias em diferentes populações, provocando uma heterogeneidade do número de cópias dos genes localizados principalmente na região gr/gr (Navarro-Costa et al. 2010; Bansal et al. 2016). Além da diversidade fenotípica, a frequência de deleções gr/gr também é bastante variável em diferentes populações (Bansal et al. 2016). Apesar de terem sido consideradas um fator de risco através de estudo de meta-análise (Tüttelmann et al. 2007), na população brasileira não foi encontrada associação entre homens inférteis e deleções do tipo gr/gr (Carvalho et al. 2006). Essa controversa correlação com a infertilidade masculina pode ser resultado de distintas metodologias e critérios de inclusão e exclusão de pacientes (Bansal et al. 2016). Por ainda não estar bem estabelecida a associação de deleções parciais AZFc com infertilidade, na rotina clínica, geralmente são analisadas apenas as deleções clássicas em AZFa, AZFb e AZFc.

Os genes presentes no cromossomo Y, em especial os localizados na região AZF, foram os primeiros candidatos propostos a serem analisados em pacientes inférteis (Affara 2001), posteriormente a análise gênica se estendeu para toda a região MSY do cromossomo Y (Jangravi et al. 2013) e, a partir do crescimento dos estudos de associação genômica (*Genome Wide Association Study*, GWAS) com SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) e estudos de hibridação genômica comparativa (Array-CGH) com CNVs (*Copy Number Variants*) foram propostos muitos outros genes candidatos, presentes não só em Y, mas em X e nos cromossomos autossômicos (Krausz et al. 2015).

O GWAS analisa todo o genoma e detecta variantes genéticas comuns em um grupo de pacientes com fenótipo semelhante e pode gerar associações falso-positivas, por isso, a associação significativa de um SNP a uma doença específica deve ser validada em estudos independentes. Embora a abordagem por GWAS tenha sido aplicada com sucesso na descoberta de genes em doenças complexas (Visscher et al. 2012), poucos SNPs foram identificados, por meta-análise, em mais de um estudo com pacientes inférteis, indicando pouco ou nenhum efeito sobre a fertilidade masculina (Tüttelmann et al. 2018; Krausz & Riera-Escamilla 2018).

Poucas sobreposições de estudos também foram observadas nos estudos com Array-CGH em pacientes inférteis (Krausz & Riera-Escamilla 2018), embora muitas CNVs tenham demostrado correlação positiva com diminuição do número de espermatozóides no sêmen (Tüttelmann et al. 2011; Nakamura et al. 2017; Krausz et al. 2012). Um achado relevante compartilhado entre os estudos de Array-CGH é a alta quantidade de CNVs (especialmente deleções) em homens oligozoospérmicos e azoospérmicos, o que pode indicar uma instabilidade genômica nesses pacientes e a susceptibilidade à perda de DNA (Tüttelmann et al. 2011; Krausz & Riera-Escamilla 2018).

Atualmente, estima-se que mais de 2.000 genes, com funções *housekeeping* ou específicas da linhagem germinativa, estejam envolvidos na espermatogênese humana (Krausz et al. 2015). Nesse contexto, o desenvolvimento de técnicas capazes de analisar múltiplos genes em um único ensaio, como o sequenciamento de nova geração (*Next generation sequencing*, NGS) foi essencial para identificação dos fatores genéticos associados à infertilidade masculina (Krausz & Riera-Escamilla 2018).

O NGS permite o sequenciamento rápido e econômico de painéis de genes, exomas inteiros ou genomas completos (Robay et al. 2018). Desde a sua introdução em 2005 (Margulies et al. 2005), essa abordagem tem sido usada para identificar novos fatores genéticos em diferentes doenças complexas, incluindo a infertilidade masculina (Krausz & Riera-Escamilla 2018).

O estudo mais antigo com homens inférteis usando NGS foi realizado em 2013, no qual os autores identificaram variantes em três de cinco genes candidatos previamente associados à azoospermia não obstrutiva por GWAS (Lu et al. 2014; Robay et al. 2018). De acordo com uma revisão sistemática, apenas 23 estudos utilizaram NGS como metodologia primária de descoberta de variantes em homens inférteis, considerando o período de 2010 a 2017. A maioria desses estudos focou em anormalidades quantitativas dos espermatozóides e empregou o seqüenciamento completo do exoma (*Whole Exome sequencing*, WES) como metodologia padrão. Entretanto, quase todos os trabalhos que empregaram WES, realizaram essa análise em um único paciente (estudo de caso) ou uma única família (estudo de *pedigree*) (Robay et al. 2018). Até o momento, 12 estudos adicionais de WES foram aplicados na investigação da infertilidade masculina (Askari et al. 2019; Coutton et al. 2019; Fakhro et al. 2018; Hua & Wan 2019;

Jiang et al. 2019; Kasak et al. 2018; Martinez et al. 2018; Wu et al. 2019; Y. W. Sha et al. 2018; Y. Sha et al. 2018; Lin Li et al. 2018; L. Li et al. 2018). Destes doze, apenas três foram realizados em pacientes com NOA (Fakhro et al. 2018; Kasak et al. 2018; Y. Sha et al. 2018).

1.4. VALIDAÇÃO DE GENES ASSOCIADOS À INFERTILIDADE MASCULINA

Apesar de diversas variantes em numerosos genes terem sido descritas em associação com a infertilidade masculina, poucos estudos foram replicados de maneira independente ou demonstraram evidências funcionais de que as variantes identificadas são patogênicas. Além disso, faltam estudos biológicos em modelos experimentais, como por exemplo, camundongos inférteis geneticamente modificados, cujo gene de interesse foi silenciado (Tüttelmann et al. 2018). De acordo com um estudo atual, apenas três genes (*NR5A1, DMRT1, TEX11*) cumprem múltiplos níveis de evidência para uma associação robusta com a infertilidade masculina (Tüttelmann et al. 2018), embora não tenha sido usado nenhum método de avalição estruturada para essa classificação.

Em contrapartida, ao aplicar uma avaliação estruturada, foram encontrados 438 genes candidatos, descritos em mais de 1200 publicações sobre as causas monogenéticas da infertilidade masculina (Oud et al. 2018). Essa revisão sistemática recente aplicou um método de avaliação baseado no número de pacientes férteis e inférteis não aparentados em que variantes foram encontradas em cada gene; número de publicações independentes que reproduziram os achados da publicação inicial; evidências de patogenicidade da variante identificada e fenótipo apresentado por modelos animais portadores da variante. De acordo com esses critérios, 67 genes apresentaram evidências confiáveis de associação à infertilidade masculina, sendo poucos classificados com evidência “definitiva” ou “forte” ou “moderada”, ademais, mais de 80 foram classficados com evidência “limitada” (Oud et al. 2018). A falta de evidências se deve principalmente aos escassos estudos funcionais e ao fato da maioria das variantes terem sido descritas em um único paciente ou em uma única família (Oud et al. 2018).

1.5. ESTUDOS FUNCIONAIS

Existem vários programas computacionais capazes de estimar o impacto de uma variante em um transcrito ou proteína. Apesar de serem consideradas formas fracas de evidência, são a ferramenta mais viável para triagem das inúmeras variantes identificadas nos estudos de WES (Weile & Roth 2018).

Os ensaios laboratoriais são mais realistas do que as análises *in silico* para determinar o efeito das variantes na expressão de genes e proteínas, porém consomem mais tempo e recursos (Weile & Roth 2018). Uma das técnicas de análise *in vitro* mais utilizadas na atualidade é a mutagênese direcionada (*Site-directed mutagenesis*), com a qual é possível gerar trocas específicas de nucleotídeos na sequência de DNA e, consequentemente, alterar um gene de interesse, possibilitando assim, estudos de expressão gênica ou da estrutura e função da proteína mutante (Weile & Roth 2018).

A mutagênese direcionada pode ser utilizada em associação com diferentes ensaios para medição da expressão gênica. Um método sensível e relativamente fácil e barato para análise da expressão gênica é o ensaio da Luciferase (*Luciferase reporter assay*). A luciferase é uma classe de proteínas oxidativas encontradas em várias espécies de organismos bioluminescentes, sendo as mais conhecidas, a *Firefly* e a *Renilla*, encontradas em vagalumes e cnidários, respectivamente. Essas proteínas oxidativas são utilizadas como enzima repórter em experimentos laboratoriais, pois, ao reagir com agentes de transfecção, emitem um sinal luminoso que é captado pelo luminômetro. A emissão de luz é proporcional à taxa de transcrição do gene em estudo (Lin & Barbosa 2002).

Apesar dos escassos estudos funcionais com genes associados à infertilidade masculina, o ensaio da luciferase foi utilizado com sucesso na caracterização dos efeitos de variantes em genes candidatos humanos, inclusive tem protocolos bem estabelecidos para o gene *NR5A1* (Bashamboo et al. 2010; Ferlin et al. 2015).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando que a maioria dos casos de falhas na espermatogênese permanece sem etiologia definida, justifica-se a busca por variantes patogênicas causais que possam esclarecer o fenótipo da infertilidade masculina. Dentre os diversos genes candidatos propostos ao longo dos anos, poucos possuem validade clínica, uma vez que os estudos genéticos em infertilidade masculina ainda são escassos (Barratt et al. 2017) e faltam evidências para associação robusta entre genes e o fenótipo em questão (Oud et al. 2018).

A fim de fornecer evidência para a validação clínica de alguns genes, nos propusemos a executar um estudo independente de exoma em pacientes brasileiros não aparentados, a fim de investigar a presença de variantes raras e potencialmente patogênicas em um conjunto de genes candidatos associados à azoospermia não obstrutiva. Além disso, realizamos o estudo funcional *in vitro* de variantes identificadas em dois genes candidatos (*NR5A1* e *DMRT1*)

3. HIPÓTESE

Existem variantes patogênicas nos genes selecionados para análise, que podem ser a causa do fenótipo de azoospermia nos pacientes inférteis analisados.

4. OBJETIVOS

4.1. GERAL

Esse trabalho teve como objetivo realizar o seqüenciamento completo do exoma de um grupo de pacientes azoospérmicos do Brasil e analisar um conjunto de genes previamente associados à infertilidade masculina, em busca de variantes potencialmente patogênicas que pudessem ser a causa do fenótipo apresentado pelos pacientes. Adicionalmente planejamos realizar o estudo funcional de variantes identificadas no gene *NR5A1* e *DMRT1.*

4.2. ESPECÍFICOS

- ✓ Realizar o sequenciamento completo do exoma de um grupo de pacientes azoospérmicos e um grupo controle de indivíduos normozoospérmicos;
- ✓ Analisar os dados de sequenciamento dos genes candidatos selecionados;
- ✓ Confirmar, pelo sequenciamento direto de Sanger, as variantes encontradas através do sequenciamento do exoma;
- ✓ Selecionar variantes descritas nos genes *NR5A1* e *DMRT1* e realizar estudo funcional *in vitro* para determinação da patogenicidade.

5. MATERIAL E MÉTODOS

5.1. AMOSTRAS BIOLÓGICAS

Este estudo foi realizado em parceria com o Instituto de Genética Humana da Faculdade de Medicina da Universität Klinikum Münster (UKM), Alemanha e com o Laboratório de Citogenética Molecular Humana, do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP).

O grupo controle consistiu em 17 indivíduos saudáveis não aparentados com idade inferior a 45 anos, atendidos no Centro de Reprodução e Andrologia (CeRA) de Münster, Alemanha. Todos apresentaram avaliação seminal normal, de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (WHO 2010).

Os pacientes inférteis brasileiros foram recrutados para um estudo anterior, sob orientação da professora Dra. Lúcia R. Martelli (Lab. Citogenética Molecular, Dpto. De Genética, USP-RP) (Grangeiro 2018). A seleção desses pacientes se deu da seguinte forma: 101 indivíduos em investigação por infertilidade masculina foram inicialmente avaliados no ambulatório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HC-FMRP, Brasil). Um indivíduo foi excluído por apresentar doença multissistêmica e três foram excluídos por apresentarem histórico de procedimentos cirúrgicos na região genital. Assim, um grupo de 97 homens inférteis aparentemente normais ao exame físico e sem história de doença oncológica, doença sistêmica ou crônica foi encaminhado ao ambularório de Genética Médica do HC-FMRP.

Após a análise do sêmen e avaliação hormonal, foram excluídos 70 pacientes portadores de oligozoospermia; três com azoospermia obstrutiva; um diagnosticado com Síndrome da insensibilidade androgênica parcial (SIPA) e um com elevação isolada de FSH. Os 22 pacientes com azoospermia não obstrutiva foram submetidos à avaliação genética no laboratório de Citogenética Molecular da FMRP e seis foram excluídos, dentre os quais, três apresentaram síndrome de Klinefelter, dois apresentaram heteromorfismo da cromatina, e um apresentou deleção completa de AZFc.

Dessa forma, foram desconsiderados da casuística os pacientes apresentando as seguintes características associadas ao fenótipo de infertilidade masculina:

I) Endocrinopatias: hipogonadismo hipogonadotrófico, hiperprolactinemia, hiper / hipotireoidismo, uso de esteroides anabolizantes;

II) Patologias ou procedimentos que afetam a produção de espermatozoides: quimioterapia ou radioterapia, orquite traumática ou infecciosa, varicocele ≥ grau II, criptorquidia bilateral, síndrome de Klinefelter, translocações ou microdeleções AZF;

III) Disfunções pós-testiculares: disfunção erétil / perda da libido / anorgasmia, ejaculação retrógrada / anejaculação, ausência congênita do ducto deferente, vasectomia, obstrução mecânica resultante de trauma ou infecção.

Ao final, foram selecionados 16 pacientes inférteis não aparentados, com idade inferior a 45 anos, apresentando azoospermia não obstrutiva, segundo os critérios de classificação da Organização Mundial da Saúde (WHO 2010), cariótipo normal com exclusão de mosaicismo (Hook 1977) e ausência de microdeleções AZF clássicas, de acordo com o protocolo aprovado pela Academia Europeia de Andrologia (EAA) e Rede Europeia de Qualidade em Genética Molecular (EMQN) (Krausz et al. 2013). As informações clínicas referentes a esses pacientes estão resumidas na Tabela 2. De acordo com a biópsia testicular, seis pacientes apresentam aplasia de células germinativas (*Sertoli-Cell Only Syndrome,* SCOS) e seis apresentam parada da maturação de células germinativas (Mat.A). Quatro pacientes, não submetidos ao procedimento de biópsia testicular, permaneceram classificados com portadores de azoospermia não obstrutiva (NOA).

Tabela 2. Caracterização clínica dos pacientes NOA selecionados. FSH: hormônio folículo estimulante, LH: hormônio luteinizante. Em negrito: parâmetros hormonais fora dos limites de normalidade.

Paciente	Idade (anos)	Testosterona ng/mL (2.49-8.36)	FSH mIE/mL (<7.6)	LH mIE/mL (1.7-8.6)	Cariótipo (bandeamentoGTG)	Deleções AZF	Histologia testicular
M1802	34	3.18	**16.7**	8.1	46, XY[100]	Negativo	SCOS
M1803	33	4.20	3.7	2.0	46, XY[50]	Negativo	Mat.A
M1804	32	6.81	**7.7**	3.0	46, XY[50]	Negativo	SCOS
M1805	29	3.92	**23**	7.9	46, XY[50]	Negativo	SCOS
M1806	35	**1.83**	**13.1**	4.2	46, XY[50]	Negativo	SCOS
M1807	33	3.95	3.2	**1.0**	46, XY[50]	Negativo	-
M1808	30	4.11	**21**	6.7	46, XY[50]	Negativo	Mat.A
M1809	24	4.80	4.3	5.0	46, XY[50]	Negativo	-
M1810	31	2.96	1.7	2.6	46, XY[50]	Negativo	Mat.A
M1811	39	3.25	**19.7**	6.5	46, XY[100]	Negativo	-
M1812	34	3.05	**11.5**	5.9	46, XY[50]	Negativo	Mat.A
M1813	37	5.20	**7.7**	2.8	46, XY[50]	Negativo	Mat.A
M1814	34	4.45	**7.7**	2.7	46, XY[50]	Negativo	-
M1815	26	3.20	**9.4**	3.7	46, XY[100]	Negativo	Mat.A
M1816	36	3.00	**17.5**	6.5	46, XY[50]	Negativo	SCOS
M1817	31	3.50	**10.1**	5.5	46, XY[50]	Negativo	SCOS

5.2. ASPECTOS ÉTICOS

Esta pesquisa foi conduzida de acordo com os padrões éticos das instituições envolvidas. Foi obtido o consentimento livre e informado por escrito para o exame genético de todos os participantes brasileiros (Anexo 11.1), de acordo com o Comitê de Ética do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto (número de referência HCRP 8715/2013 e HCRP 11930/2017 – Anexos 11.2 e 11.3) e dos participantes alemães, de acordo com o Comitê de Ética da Junta Médica do Estado e da Faculdade de Medicina de Münster. (Kennzeichen 2010-578-fS). A identidade dos pacientes foi preservada por meio da utilização de um código de referência.

5.3. PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS

5.3.1. Extração de DNA genômico

O DNA genômico dos pacientes brasileiros foi extraído de amostras de sangue periférico utilizando o kit de purificação MasterPure™ (Epicentre®, US) e estocado à temperatura de -20ºC no Laboratório de Citogenética Molecular (FMRP-USP) (Grangeiro 2018). Uma alíquota de cada amostra foi enviada ao Instituto de Genética Humana de Münster para as análises genéticas posteriores.

O DNA genômico dos pacientes alemães foi isolado de amostras de sangue periférico, de acordo com protocolo descrito por Röpke e colaboradores (Röpke et al. 2013).

5.3.2. Análise de microdeleções AZF no cromossomo Y

A comprovação da ausência de microdeleções AZF no cromossomo Y foi realizada em todas as amostras, por meio da técnica de PCR-multiplex (*Polymerase Chain Reaction-* Multiplex) utilizando o Kit Quiagen Multiplex PCR (Cat.No. 206143, Qiagen, Hilden, Alemanha) e marcadores STS (*Sequence-tagged site*), conforme protocolo sugerido Dr. Frank Tüttelmann e Dr. Csilla Krausz e aprovadas pela EAA e EMQN (Krausz et al. 2013).

A análise das microdeleções clássicas nas regiões AZFa, AZFb e AZFc foi realizada em duas reações, multiplex A e multiplex B. Cada reação foi ajustada para o volume final de 25µL contendo 2,5µL do mix de primers (2µM de cada primer, Forward e Reverse) A (ZFX/Y, sY86, sY127, sY254) ou B (SRY, sY84, sY134, sY255), 8 µL de água ultrapura, 2 µL de DNA (~500ng) 12,5 µL de MasterMix (composto por dNTP, Hot-StarTaq DNA Polymerase e tampão com 6mM de $MgCl_2$). As condições de amplificação multiplex foram: 1 ciclo de ativação a 95°C por 15 minutos; 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação (94ºC), 90 segundos sob temperatura de hibridação dos primers (60°C) e 90 segundos de elongação (72ºC), finalizado por um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos e resfriamento a 4ºC.

A análise das microdeleções gr/gr foi realizada em duas reações de PCR comum, cada uma contendo 15 µL de água ultrapura, 2,5 µL de Buffer RE 10X, 2 µL dNTPs (2,5nmol/L),1 µL DNA (~50ng), 2 µL de primers (sY1191F/sY1191R ou sY1291F/sY1291R) e 0,15 µL Taq DNA polymerase, para o volume final de 25 µL. As condições de amplificação foram: 1 ciclo de ativação a 95°C por 5 minutos; 33 ciclos de 30 segundos de desnaturação (94ºC), 90 segundos sob temperatura de hibridação dos primers (60°C) e 45 segundos de elongação (72ºC), finalizado por um ciclo de extensão final a 72°C por 10 minutos e resfriamento a 4ºC

Os produtos de amplificação foram visualizados em fotodocumentador, após serem submetidos à eletroforese em gel de agarose (2% para as microdeleções clássicas e 1,8% para microdeleções gr/gr) sob tensão de 100 V por 1 hora e 30 minutos, para as microdeleções clássicas e 120V por 30 min para microdeleções gr/gr. Além da

reação sem adição de DNA (branco), foram utilizados como controle uma amostra contendo DNA feminino e uma amostra de DNA masculino sem microdeleções AZF.

5.3.3. Sequenciamento completo do exoma (*Whole Exome Sequencing* - WES)

O sequenciamento completo do exoma dos 17 indivíduos saudáveis e dos 16 pacientes portadores de azoospermia não obstrutiva foi realizado utilizando-se a plataforma robotizada Bravo G5562-90000 (Agilent Technologies) e o sistema de sequenciamento em larga escala NextSeq®500 da Illumina® (San Diego, CA, USA). Esse sistema consiste em três etapas: Preparação das bibliotecas de DNA, clusterização e sequenciamento por síntese.

5.3.3.1. Preparação das bibliotecas de DNA

As bibliotecas de DNA foram preparadas em placas de 96 poços, dispondo 5 µL de DNA (50 ng) de cada paciente em poços separados. Os reagentes foram preparados e distribuídos em diferentes placas, as quais foram inseridas na estação de trabalho do sistema robotizado Bravo, de acordo com as orientações do fabricante, descritas em protocolo disponível online (https://www.agilent.com/cs/library/usermanuals/public/G9681-90000.pdf).

Nessa etapa, o DNA genômico é enzimaticamente fragmentado e são adicionados adaptadores (P1 e P2) nas extremidades dos fragmentos, os quais servirão como primers durante a amplificação inicial (Fig.3). Os segmentos (DNA+adaptador) são amplificados por PCR e purificados usando esferas magnéticas (AMPure XP beads *Pre capture* PCR). Para controle de qualidade e quantificação, alíquotas das amostras purificadas são analisadas na plataforma TapeStation 2200 (Agilent Technologies), utilizando o kit D1000 *ScreenTape System* (Agilent Technologies). O sistema *ScreenTape* possui um gel de agarose em seu interior e funciona como uma combinação de eletroforese e quantificador (*Nanodrop*), pois permite a visualização da banda formada e também a medição da concentração do produto amplificado.

Posteriormente, o produto amplificado foi diluído para uma concentração de 750 ng/µL em um volume final de 12 µL e foram adicionadas sondas marcadas com biotina, que se ligam às sequencias de interesse no pool de fragmentos. Neste estudo, utilizamos sondas que cobrem todo o exoma humano (SureSelectQXT Human All Exon v6). Após hibridação com as sondas específicas, a captura dos

fragmentos de interesse (*capture library*) é realizada através da adição de esferas contendo estreptavidina, as quais se ligam à biotina presente nas sondas. Esse processo de hibridação com sondas e captura é denominado enriquecimento. As moléculas híbridas são lavadas para remoção de ligações não específicas e após essa purificação, é realizada a etapa final de amplificação dos híbridos capturados e adição de sequencias referências (*idexing tag*) em suas extremidades.

Combinações de sequencias referências (ID5 e ID7) identificam a qual paciente pertence cada segmento, durante o sequenciamento multiplex por síntese. Além disso, cada ID está complexado a uma sequencia P5 ou P7, que é complementar à *flow-cell* do sequenciador. Após purificação (AMPure XP beads *Post capture* PCR), quantificação e análise da qualidade, as bibliotecas estavam prontas para serem adicionadas à *flow-cell* (Fig. 3).

Figura 3. Biblioteca pronta, contendo o fragmento de interesse ligado a adaptadores (P1 e P2) e sequencia referência (ID5 e ID7) complexado aos oligonucleotídeos (P5 ou P7), que se ligam à *flow-cell*.

5.3.3.2. Clusterização

As bibliotecas foram diluídas e amostras de 4 nM foram usadas para desnaturação, clusterização em *flow cell* e sequenciamento por síntese. A clusterização é dividida em três etapas: A) amplificação, B) linearização e bloqueio, C) hibridação de primers. Durante a amplificação, cada fragmento de cDNA da biblioteca é incorporado à superfície da *flow cell*, a qual é coberta com oligonucleotídeos complementares aos adaptadores P5 ou P7 (Fig.4A). Ao se ligar à extremidade P5, por exemplo, o fragmento amplificado se dobra e a ponta recém-sintetizada se liga à extremidade P7 (Fig.4B). Uma nova fita complementar é sintetizada, essa amplificação por ponte origina os clusters (Fig.4C).

A linearização (Fig.4D) consiste na reação de remoção de um dos adaptadores ligados à *flow-cell*, para assegurar que a hibridação dos primers e o sequenciamento ocorram em apenas uma das fitas de DNA em cada cluster. O bloqueio se refere à neutralização de hidroxilas nas extremidades 3' das fitas linearizadas, essa etapa

evita a adição de fluoróforos ou outros fragmentos de DNA que não sejam os primers de sequenciamento.

A linearização e bloqueio (Fig.4D) asseguram a formação de fitas simples de DNA, às quais os primers se pareiam e se ligam (Fig.4E).

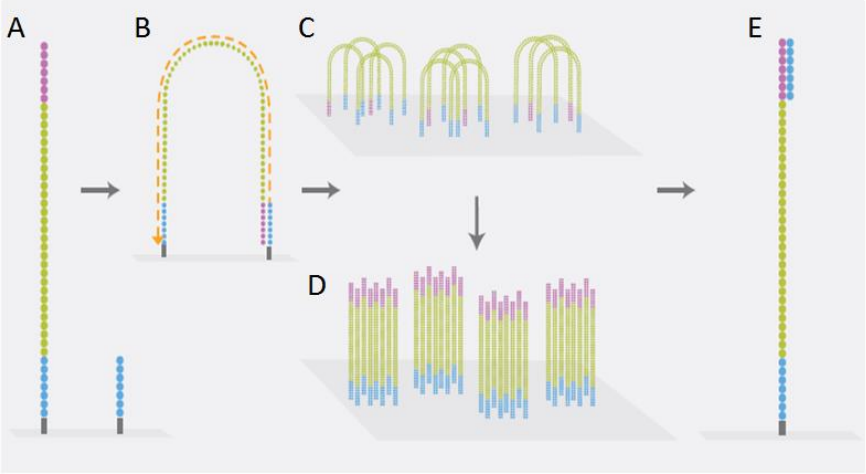

Figura 4. Amplificação por ponte, clusterização e linearização da biblioteca. A) Ligação do fragmento de DNA à flow cell, B) Amplificação por ponte, C) formação de clusters, D) linearização e bloqueio e E) Hibridação de primers (https://www.cegat.de/en/services/next-generation-sequencing/).

5.3.3.3. Sequenciamento por síntese

Após a linearização, a biblioteca está pronta para ser lida através do sequenciamento por síntese, baseado na detecção de sinais de fluorescência, liberados quando ocorre a incorporação e clivagem de um nucleotídeo marcado (Fig.5). Essa etapa foi realizada no sistema Illumina NextSeq 500, usando o kit NextSeq 500 V2 High-Output (300 ciclos), segundo orientações do fabricante.

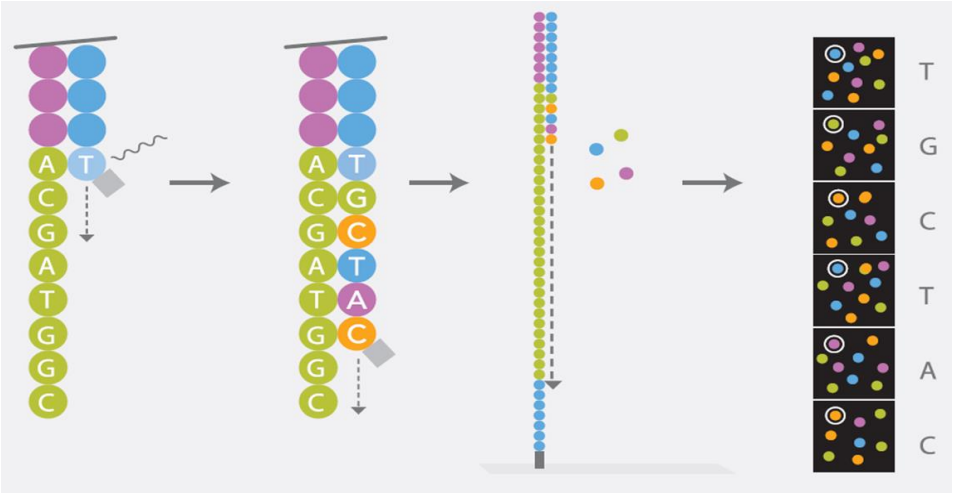

Figura 5. Sequenciamento por síntese (https://www.cegat.de/en/services/next-generation-sequencing/).

5.3.4. Processamento de dados

Os arquivos gerados pelo sequenciador no formato FASTA foram processados e as sequências restantes do adaptador e primers foram removidos utilizando o software Cutadapt v1.15 (Martin 2011). Após passaram por um controle de qualidade (FASTQC), as leituras das sequências foram transformadas no formato BWA para serem alinhadas contra o genoma de referência GRCh37.p13 usando o software BWA Mem v0.7.17 (Li & Durbin 2010). As sequencias alinhadas (SAM) foram transformadas em arquivo binário (BAM) e ordenadas pelas coordenadas cromossômicas, dessa forma, leituras duplicadas no genoma foram mapeadas e excluídas da análise posterior, minimizando artefatos e aumentando a acurácia da leitura. SNPs e Indels foram identificados e filtrados usando o GATK toolkit v3.8 com o *haplotype caller*, de acordo com as recomendações de melhores práticas (Mckenna et al. 2010). Resumidamente, as sequencias foram realinhadas considerando chamadas independentes de SNPs e Indels já conhecidas. Apenas as variantes em posições em que ambas as chamadas concordaram foram retidas, eliminando erros de sequenciamento e fornecendo o número de leituras que foram mapeadas com sucesso, de acordo com o genoma de referência. As variantes resultantes (formato vcf) foram anotadas com o Preditor de Efeito de Variantes do Ensembl (*Variant effect predictor*- VEP) (McLaren et al. 2016). Esses dados foram inseridos no banco de dados *in house* alemão, denominado *Genesys*®, o qual possui

interface para diversas análises, incluindo seleção de variantes presentes em genes de interesse.

5.3.5. Seleção de genes candidatos para análise de sequenciamento

Apesar do WES fornecer dados de sequenciamento de toda a região codificante do genoma humano, procuramos variantes apenas em um conjunto de genes candidatos relacionados à infertilidade masculina. A seleção desses genes candidatos foi baseada em uma revisão sistemática (Oud et al. 2018), que estabeleceu a validade clínica de vários genes, de acordo com as evidências descritas na literatura. Consideramos todos os genes classificados com evidência definitiva, forte, moderada e limitada de associação monogenética à infertilidade masculina e selecionamos aqueles descritos em pacientes com fenótipos semelhantes aos apresentados por nossos pacientes, como, azoospermia não-obstrutiva (*Non-obstructive azoospermia*, NOA), aplasia de células germinativas (*Sertoli cell-only syndrome*, SCOS) e parada de maturação de células germinativas (*Maturation arrest*, Mat.A). Atenção especial foi dada aos genes *NR5A1, DMRT1* e *TEX11*, os quais foram validados por (Tüttelmann et al. 2018). Ademais, o gene *SYCE1L* foi incluído por interesse próprio.

Na tabela 3 estão listados os genes selacionados para análise, juntamente com sua classificação baseada nas evidências de associação com a infertilidade masculina. Também estão descritos os padrões de herança dessa condição em humanos, determinados através de estudos de associação com outras variantes presentes no mesmo gene indicado.

Tabela 3. Conjunto de genes selecionados para análise, a partir na Tabela Sumplementar S5 do artigo de Oud et al., 2018. Foram consideradas as seguintes categorias de doenças: *Leydig cell dysfunction/ SCOS/ premeiotic arrest/ meiotic arrest; SCOS; SCOS/ premeiotic arrest; SCOS/ premeiotic arrest/ meiotic arrest; SCOS/ premeiotic defect/ meiotic defect; meiotic arrest; meiotic arrest/ spermiogenesis defect; premeiotic arrest; premeiotic arrest/ meiotic arrest; premeiotic arrest/ meiotic arrest/ spermiogenesis defect.*

Gene	Padrão de herança da infertilidade	Evidência de associação com infertilidade	Referências
APOA1	AD	Moderada	Oud et al., 2018
AR	X	Definitiva	Oud et al., 2018
CCDC155	AR	Limitada	Oud et al., 2018
CDC14A	AR	Moderada	Oud et al., 2018
CFTR	AR	Limitada	Oud et al., 2018
DMC1	AR	Limitada	Oud et al., 2018
DMRT1	AD	Moderada, gene validado	Oud et al., 2018; Tüttelmann et al., 2018
DNMT3B	AD	Limitada	Oud et al., 2018
E2F1	AD	Limitada	Oud et al., 2018
FANCA	AR	Moderada	Oud et al., 2018
FANCM	AR	Limitada	Oud et al., 2018
FSHR	AR	Moderada	Oud et al., 2018
HAUS7	X	Limitada	Oud et al., 2018
HSF2	AD	Limitada	Oud et al., 2018
KLHL10	AD	Moderada	Oud et al., 2018
MAGEB4	X	Limitada	Oud et al., 2018
MEI1	AR	Limitada	Oud et al., 2018
MEIOB	AR	Limitada	Oud et al., 2018
NANOS2	AR	Limitada	Oud et al., 2018
NR5A1	AD	Forte, gene validado	Oud et al., 2018; Tüttelmann et al., 2018,
PDHA2	AR	Limitada	Oud et al., 2018
PLK4	AD	Limitada	Oud et al., 2018
PSMC3IP	AR	Limitada	Oud et al., 2018
RBMXL2	AD	Limitada	Oud et al., 2018
REC8	AD	Limitada	Oud et al., 2018
SPO11	AR	Limitada	Oud et al., 2018
STX2	AR	Limitada	Oud et al., 2018
SYCE1	AR	Limitada	Oud et al., 2018
SYCE1L	AR	Sem evidência	----
SYCP3	AD	Moderada	Oud et al., 2018
TAF4B	AR	Limitada	Oud et al., 2018
TEX11	X	Forte, gene validado	Oud et al., 2018; Tüttelmann et al., 2018,
TEX14	AR	Limitada	Oud et al., 2018
TEX15	AR	Moderada	Oud et al., 2018
TRIM37	AR	Moderada	Oud et al., 2018
UBR2	AD	Limitada	Oud et al., 2018
USP26	X	Limitada	Oud et al., 2018

5.3.6. Seleção de variantes

Foram selecionadas apenas variantes codificantes cujas consequências eram potencialmente graves para a função da proteína - ou seja, aquelas que afetam sítios de *splicing* (doador /receptor*), start loss, stop gain, frameshift* e *missense*. A fim de descartar polimorfismos comuns, todas as variantes com frequência maior que 5% na população mundial, de acordo com os bancos de dados ExAC, ESP, 100genomes e gnomAD, foram excluídas (Riera-Escamilla et al. 2019).

Para variantes presentes em genes localizados no cromossomo X ou Y, a frequência populacional máxima considerada foi de 1%. Este mesmo limite também foi estabelecido para variantes presentes em genes previamente associados, através de estudos de segregação, à herança autossômica domintante. Isso porque, considerando a penetrância completa, variantes dominantes ou em hemizigose tendem a se manter em baixa frequência na população, principalmente aquelas relacionadas ao fenótipo de infertilidade, que impacta diretamente no valor adaptativo dos indivíduos portadores. Já as variantes associadas à herança autossômica recessiva geralmente possuem frequência maior na população, devido à vantagem de sofrerem menor exposição à seleção natural, quando presentes em heterozigose.

Também foram excluídas variantes sem predição de patogenicidade pelos quatro programas *in silico* considerados: SIFT, PolyPhen-2-2, MutationTaster e CADD (score <10); variantes presentes em controles normozoospérmicos ou variantes únicas associadas à herança autossômica recessiva.

5.3.7. Confirmação das variantes encontradas por sequenciamento de Sanger

As variantes encontradas através do exoma foram confirmadas pelo sequenciamento direto (Sanger) das regiões de interesse nos genes candidatos. A amplificação por PCR foi conduzida de acordo com os protocolos descritos em Rö*pke et* al., 2013; Te*wes et* al., 2014; L*ima et* al., 2016. Os primers utilizados estão listados na abaixo (Tabela 4).

Tabela 4. Lista de primers utilizados para confirmação das variantes encontradas.

Gene_exon_variante	Primer Forward	Primer Reverse
*DMRT1*_3_(c.671A>G)	TTTGGCTATAGGAGAAGCAACAG	TGTGTGTCACCTGTGTGTGC
*DNMT3B*_23_(c.2452G>A)	GCCAAGAGTATGGTGCTAGG	CTGATTTGTGCACAAGGAGGC
*KLHL10*_4_(c.242A>T)	GCACCCCACTTTCTCAGACC	TCCAAGCACAGCTCTGACTTG
*KLHL10*_5_(c.887T>C)	GGCCTCAAGTGATCCACCTG	GACATAGCAACGTCTGGAGT
*TEX14*_7_(c.727C>G)	AGGATCATCTGGCCAAAAATGG	TAGCCAGGTGTGGTGGTG
*TEX14*_31_(c.4297G>A)	TGATGATGAGACTGGGCAAAAG	AGTCTAGCTCTAGGAATTATTAGG TGT
*TEX15*_1_(c.5969G>A)	TGACTTTCCTAATGTGGGCCA	TCAGGCTGAATTTGCAGACC
*TEX15*_3_(c.8074G>A)	ACCCTCTCTGCCCAATCC	ACTTTTGGAGCATCTGGGCA
*REC8*_2_(c.91C>T)	CACCTTGCCACCAGAGAAG	CACACCGATCTGAAGTTGGG
*SYCE1L*_1_(c.22C>G)	ACTACCCTCACTCCCCAACT	CACCGCCCCACTTTTGTTTG

Após a confirmação da qualidade da PCR por eletroforese em gel de agarose 1,5%, corado com o fluoróforo *SYBR Safe*®, os produtos de PCR foram tratados com ExoSAP-IT (USB Corporation, Cleveland, OH, USA). O sequenciamento foi realizado utilizando-se o kit BigDyeTerminator v3.1 Cycle Sequencing (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA) e as amostras foram analisados no aparelho ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems®, Life Technologies, Carlsbad, California, USA).

Os arquivos do sequenciamento dos genes candidatos foram analisados através do programa CodonCodeAligner® (*CodonCode Corporation*), cujo papel é alinhar as sequências de nucleotídeos obtidas das amostras de pacientes com a sequência referência de indivíduos normais, permitindo assim, a visualização gráfica de variantes. O fluxograma abaixo (Fig.6) resume os passos realizados para identificação de variantes nos genes candidatos.

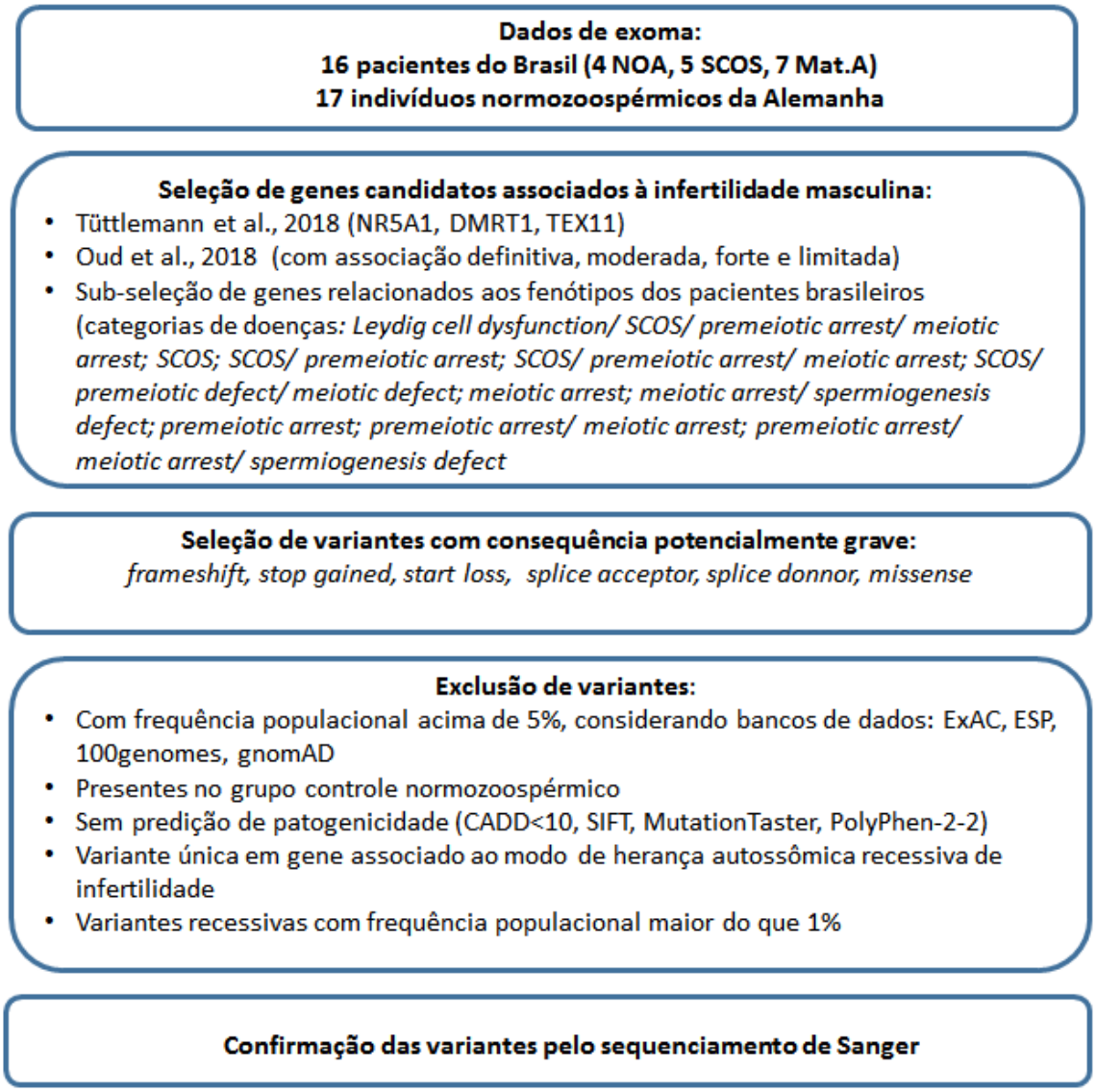

Figura 6. Fluxograma evidenciando as etapas do estudo do exoma e análise das variantes encontradas nos genes candidatos.

5.3.8. Análise funcional *in vitro*

5.3.8.1. Escolha dos genes e variantes a serem analisados

Dos três genes validados pelo grupo de pesquisa de Münster, dois, *NR5A1* e *DMRT1,* foram escolhidos para realização do estudo funcional. O primeiro foi escolhido por possuir forte evidencia de associação com a infertilidade masculina e protocolo estabelecido para o ensaio da luciferase. O segundo foi escolhido por ainda não ter estudo funcional descrito em humanos, mas possuir evidência moderada de

associação à infertilidade masculina. Dessa forma, reproduzimos a análise funcional descrita em *NR5A1* e testamos o mesmo protocolo para o gene *DMRT1*.

Uma vez que os genes *NR5A1* e *DMRT1* são fatores de transcrição, para análise de sua expressão, é necessária a presença de um promotor induzível na célula humana transfectada. O mesmo promotor (Cyp11A humano) estabelecido para a análise da expressão do gene *NR5A1* (Bashamboo et al. 2010; Malikova et al. 2014; Ferlin et al. 2015) foi utilizado para análise do gene *DMRT1*. O motivo dessa escolha foi a comprovação de que *DMRT1* é capaz de ativar o gene Cyp11A de Medaka (peixe-arroz) (Wang et al. 2010).

Para o gene *NR5A1* selecionamos variantes previamente avaliadas, que serviram de controle positivo e variantes ainda não avaliadas. Um dos controles positivos, a variante c.104_105delGCinsAA, provoca grande diminuição da expressão gênica e foi previamente utilizada como controle em experimento semelhante, conforme descrito em Bashamboo *et a*l., 2010. Desse mesmo estudo selecionamos um segundo controle positivo, a variante c.712G>A, que apresentou uma redução de quase 50% da expressão de *NR5A1*, além de ter sido descrita em pacientes inférteis em dois estudos independentes (Bashamboo et al. 2010; Ferlin et al. 2007) e também foi encontrada em pacientes inférteis do banco de exomas alemão (*Genesys*).

As variantes c.437G>C e c.991G>C, identificadas nos genes *NR5A1* e *DMRT1*, respectivamente, foram elegidas como controles negativos do experimento, pois foram encontradas tanto em pacientes inférteis como em indivíduos normozoospérmicos do grupo controle. Assim, era esperado que fossem benignas e não apresentassem diminuição significativa da expressão gênica.

Adicionalmente foram selecionadas cinco variantes no gene *NR5A1* para serem testadas, das quais três (c.493G>C, c.769G>A, c.968T>C) foram descritas em um estudo prévio do grupo de Münster (Röpke et al. 2013) e duas (c.1079C>T e c.1379A>C) foram encontradas no banco de exomas alemão. Também foram selecionadas três variantes no gene *DMRT1* (c.308A>G, c.344T>A, c.671A>G), as quais foram identificadas em pacientes do banco de dados alemão. Na tabela 5 estão listadas as oito variantes selecionadas do gene *NR5A1* e as quatro do gene *DMRT1*; a referência do local em que a variante foi identificada; o motivo da seleção e os fenótipos associados.

Tabela 5. Variantes dos genes *NR5A1* e *DMRT1* selecionadas para estudo funcional. N: número de pacientes descritos. NOA: (*Non-obstructive azoospemia*) azoospermia não obstrutiva, SCOS: (*Sertoli cell-only syndrome*) aplasia de células germinativas ou Síndrome das células de Sertoli, Mat. A (*Maturation arrest*) parada de maturação de células germinativas, MixedA: (*Mixed atrophy*) atrofia mista de células germinativas, RsA: (*Round spermatid arrest*) Parada de maturação na fase de espermátide, Cripto: Criptozoospermia, Oligo (oligozoospermia), Br: Brasileiro, De: (Deutsche) Alemão.

Gene	Referência	Motivo da seleção	Fenótipo (N)	HGVS
NR5A1	Bashamboo et al. 2010 apud Ito et al. 2000	Controle positivo já descrito	XY reversão sexual	c.104_105delGCinsAA p.Gly35Glu
NR5A1	Röpke et al. 2013; *Genesys;* Wada et al. 2006	Controle negativo	NOA(16)/Controle(5); SCOS(5)/NOA(5Br,4De)/Mat.A(4)/ MixedA(3)/RsA(1)/Controle(1); Cripto(1)	c.437G>C p.(Gly146Ala)
NR5A1	*Genesys;* Bashamboo et al. 2010; Ferlin et al. 2015	Descrita em estudos independentes, mostrou redução da expressão gênica	NOA (1) - -	c.712G>A p.(Asp238Asn)
NR5A1	Röpke et al. 2013	Descrita em estudo prévio	Mat.A (1)	c.493G>C p.(Gly165Arg)
NR5A1	Röpke et al. 2013	Descrita em estudo prévio	MixedA (1)	c.769G>A p.(Asp257Asn)
NR5A1	Röpke et al. 2013	Descrita em estudo prévio	Oligo (1)	c.968T>C p.(Ile323Thr)
NR5A1	*Genesys*	Encontrada em pacientes do banco	NOA (1)	c.1079C>T p.(Ala360Val)
NR5A1	*Genesys*	Encontrada em pacientes do banco	Rsa (1)	c.1379A>C p.(Gln460Pro)
DMRT1	*Genesys*	Controle negativo	Controle(1)/SCOS(1)	c.991G>C p.(Asp331His)
DMRT1	*Genesys*	Encontrada em pacientes do banco	Crypto(1)/SCOS(1)	c.308A>G p.(Lys103Arg)
DMRT1	*Genesys*	Encontrada em pacientes do banco	SCOS(1)	c.344T>A p.(Met115Lys)
DMRT1	*Genesys*	Encontrada em pacientes do banco	NOA(2)/MixedA(1); SCOS(1)	c.671A>G p.(Asn224Ser)

5.3.8.2. Desenho experimental

As variantes selecionadas foram reproduzidas em células embrionárias de rim humano por meio de mutagênese direcionada e transfecção, segundo o protocolo adaptado de Bashamboo *et al*., 2010. A expressão das células mutadas foi quantificada utilizando o ensaio da luciferase e analisadas através do sistema GloMax® *Explorer Multimode Microplate Reader.*

Resumidamente, a mutagênese direcionada consiste na produção de fitas de DNA mutantes utilizando primers complementares contendo a base alterada no meio, um vetor plasmidial contendo o gene de interesse e uma enzima polimerase sem ação de *proof reading*, que permite a incorporação "errada" de bases durante a amplificação do DNA, gerando um plasmídeo mutante. Posteriormente, as fitas de DNA parental são digeridas através da adição de uma enzima que corta sequências de DNA metiladas. O plasmídio mutante é então introduzido em bactérias *E.coli* ultra competentes e após o crescimento das colônias em meio seletivo, o DNA é extraído e sequenciado para confirmação da presença da mutação.

O plasmídio contendo o gene de interesse mutado deve ser co-transfectado com o plasmídio contendo o promotor específico induzível e a enzima repórter *Firefly*. Um terceiro plasmídio contendo um promotor constitutivo e a enzima repórter *Renilla* também é inserido na célula e atua como controle interno da reação da luciferase. A utilização de duas proteínas luciferase dá nome ao experimento "ensaio duplo da luciferase".

Após a transfecção as células são incubadas e posteriormente lisadas para liberação das enzimas oxidativas em meio contendo o substrato adequado. Primeiramente é medida a atividade da enzima *Firefly*, complexada ao promotor induzível pelo gene em estudo e posteriormente é medida a atividade da enzima *Renilla*. Após normalização dos dados é possível comparar o efeito da variante na expressão do gene estudado. As etapas desse estudo funcional estão ilustradas na figura 7.

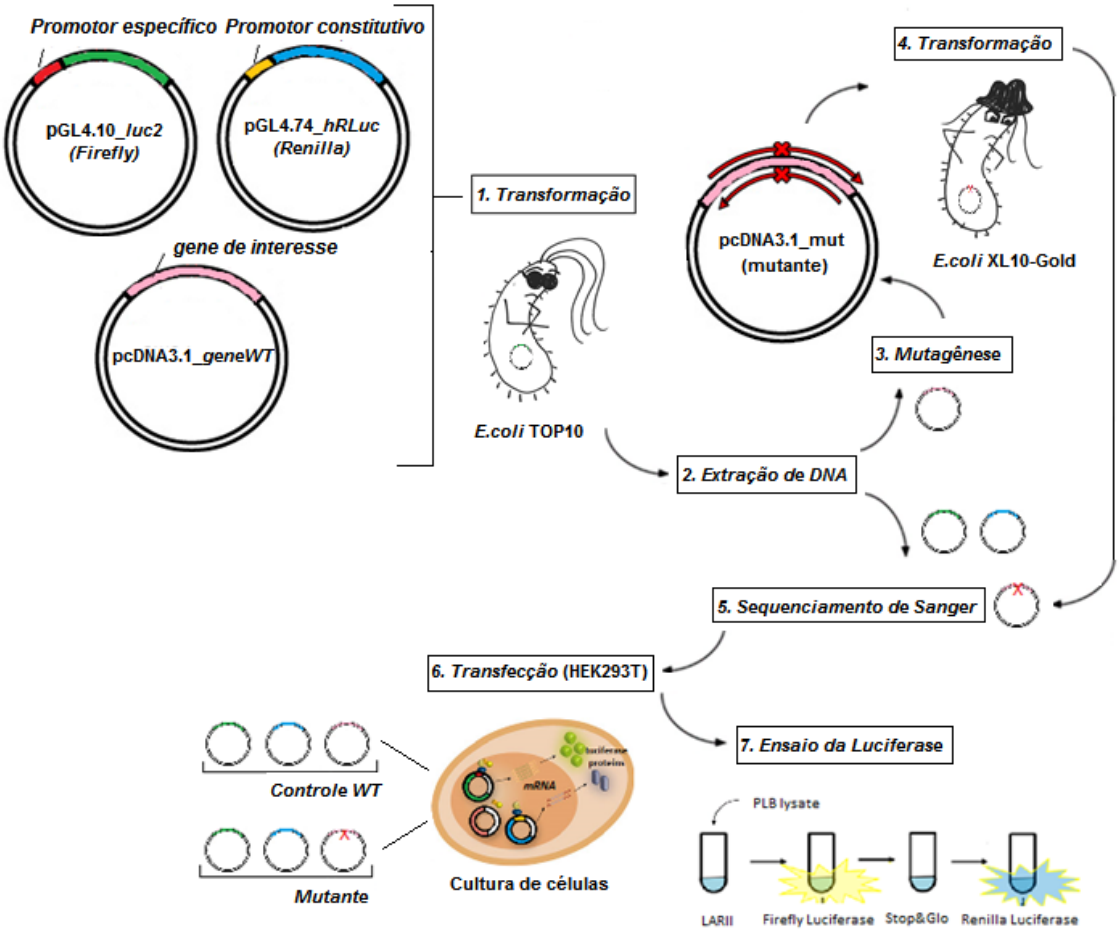

Figura 7. Esquema ilustrativo evidenciando as etapas de mutagênese, transfecção e quantificação da expressão gênica pelo ensaio da luciferase.

5.3.8.3. Clonagem dos vetores

Os vetores pGL4.10luc2 (contendo o gene da enzima *Firefly* e o promotor Cyp11A1); pGL4.74Rluc/TK (contendo o gene da *Renilla* e promotor constitutivo TK); pcDNA3.1_*NR5A1* e pcDNA3.1_*DMRT* foram obtidos comercialmente (GenScript). Esses vetores foram clonados separadamente em bactérias competentes, através do processo de transformação.

Para isso, cada amostra contendo 50 µL de bactérias *E.coli* TOP10 e 1 µL de DNA plasmidial foi incubada no gelo por 30 minutos e depois submetida ao choque térmico a 42°C por 30 segundos, seguido de incubação em gelo por 2 minutos. Posteriormente, foram adicionados 50 µL de meio LB (10g Trypton, 10gNaCl, 5g extrato de levedura e água para 1L, pH7.2) sem antibióticos e a amostra foi mantida

em incubadora a 180 rpm e 37°C por 1 hora. Decorrido esse tempo, as bactérias transformadas foram divididas em duas placas de Petri contendo meio LB ágar com ampicilina (1L meio LB, 20g de ágar, 1 µL de ampicilina) e foram incubadas por 12 horas a 37°C. Cinco colônias de cada vetor plasmidial foram coletadas e cultivadas em 3 mL de meio LB líquido contendo 3 µL de ampicilina em incubadora a 180 rpm e 37°C por 1 hora.

Por fim, o DNA plasmidial foi extraído através de kit comercial (Miniprep QIAGEN 250, Cat.No. 2710), quantificado em Nanodrop e sequenciado utilizando primers desenhados de maneira a cobrir toda a sua extensão (Apêndice 10.1). Na reação de PCR, ajustada para 10 µL, foram utilizados 3,5 µL de água, 2 µL de Buffer de sequenciamento (5x), 0,5 µL de Byg Dye Terminator (v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA, USA), 2 µL de cada primer (Forward/Reverse) e 2 µL DNA (~200 ng). As condições de amplificação foram: 1 ciclo de ativação a 96°C por 2 minutos; 25 ciclos de 5 segundos sob temperatura de pareamento dos primers a 50°C, 2 minutos de elongação a 60ºC, 10 segundos de desnaturação a 94°C; finalizado por resfriamento a 4ºC. As amostras foram purificadas com Sephadex e sequenciadas no sistema 3730 *DNA Analyser* (Applied Biosystems)

Uma amostra de 50 µL de bactérias provenientes da colônia sequenciada foi cultivada (cultura midi) por 1 hora a 180rpm e 37°C, em 50 mL de meio LB contendo ampicilina (1:1000). Após esse período foi realizada extração de DNA por kit comercial (Midi-prep Qiagen 25, Cat.No.12143) e quantificação em Nanodrop. As amostras de DNA de cada cultura midi foram diluídas para concentração de 100ng/µL e estocados a -20°C.

5.3.8.4. Mutagênese

Para realização da mutagênese direcionada, primers complementares de 25 a 45 pares de bases foram desenhados contendo a variante no meio de sua extensão, permitindo a ligação destes no mesmo local da sequência gênica, em fitas opostas do plasmídeo. Esses primers foram desenhados de maneira a conter bases G ou C nas extremidades 5' e 3'; porcentagem GC > 40% e com temperatura de Melting (Tm) ≥78°C, calculada a partir da fórmula a seguir:

81.5 + 0.41(%GC) - (675/ N) - % mismatch

N: número de bases da sequência, sem considerar base inserida ou deletada, % mismatch: número de bases alteradas na sequencia dividido por N.

Para cada reação de mutagênese, utilizando o kit *QuickChange II XL Site directed mutagenesis* (Agilent Technologies, Cat.No200522), foram adicionados 2,5 µL (125ng) de cada primer (Forward/Reverse); 2µL (10ng) do vetor de expressão pcDNA3.1 contendo um dos genes estudados; 5 µL de tampão (10x); 3 µL de *Quick Solution*; 1 µL de dNTP mix, 1 µL (2,5 U) de enzima polimerase *Pfu-UltraHD* e água para volume final de 50 µL. As condições de amplificação foram: 1 ciclo de ativação a 95°C por 1 minuto; 18 ciclos de 50 segundos sob temperatura de 95°C, 50 segundos sob temperatura de pareamento dos primers (60°C), 7,5 minutos de elongação a 68ºC (1min/Kb do plasmídeo); um ciclo de 7 minutos a 68°Cl; finalizado por resfriamento a 4ºC.

Para digestão do DNA plasmidial parental, foi adicionado 1 µL da enzima de restrição *DpnI* (100U) a cada a reação amplificada, as quais foram incubadas por 1 hora a 37°C. Após esse período o plasmídeo mutante foi introduzido em bactérias *E.coli* ultra competentes (XL10 Gold) através do processo de transformação utilizando β-mercaptoethanol.

O protocolo para essa transformação consiste na pré-incubação em gelo, por 10 minutos, de 45 µL de bactérias XL10Gold e 2 µL de β-mercaptoethanol, seguida de adição de 2 µL do DNA plasmidial mutante digerido e incubação em gelo por 30 minutos. As amostras de bactérias foram submetidas ao choque térmico (30s a 42°C e 2min em gelo) para incorporação dos plasmídeos. Posteriormente foram adicionados 500 µL de meio SOC pré-aquecido (2% Trypton, 0,5% extrato de levedura, 10µM NaCl, 2,5µM KCl, 10µM de $MgCl_2$, 10 µM $MgSO_4$, 20 µM glicose) e as amostras foram incubadas a 37°C e 250 rpm por 1 hora em Shaker.

As bactérias transformadas foram distribuídas em quatro placas de Petri contendo meio LB Ágar e ampicilina (1:1000) e incubadas por 12 horas a 37°C. Posteriormente cinco colônias foram coletadas para extração de DNA, sequenciamento, produção de cultura midi e extração de DNA, conforme descrito anteriormente para transformação de bactérias Top10 e obtenção de DNA dos outros vetores.

5.3.8.5. Transfecção

Células de rim embrionário humano (HEK293T) foram cultivadas em placas de Petri contendo 10 mL de meio HEK (500mL DMEM com Glutamina, 50 µL *Fetal Calf Serum* - FCS, 5 µL ampicilina) à 37°C até atingirem densidade de 30 a $35x10^4$ células/mL. Para a realização da transfecção foram depositados 100 µL da suspensão de células (3- $3,5x10^4$ células) em cada poço de uma placa específica de 96 poços. Após 24 horas o meio HEK foi substituído por 47 µL de meio Opti-MEM; 0,5 µL (250ng) de cada vetor (pcDNA3.1/mutante, pGL4.10luc2/Cyp11A1, pGL4.74Rluc/TK) e 1,5 µL do agente de transfecção X-tremeGENE9. As amostras foram mantidas em repouso à temperatura ambiente por 30 minutos e após esse período foram adicionados 90 µL de meio Opti-MEM e 10 µL do complexo de transfecção (8 µL Opti-MEM, 1,5 µL de X-tremeGENE9 e 0,5 µL de *Renilla*). As reações foram incubadas por 48 horas a 37°C, sendo o meio de transfecção trocado por meio HEK após decorridas 24 horas da transfecção.

Foram utilizados como controle da transfecção amostras contendo apenas os reagentes da reação, sem adição de DNA dos vetores e amostras contendo o vetor de expressão selvagem, sem mutação.

5.3.8.6. Ensaio da Luciferase - Medição da expressão gênica

O ensaio da luciferase foi realizado utilizando o kit Dual-Luciferase® Reporter Assay System (Promega) e luminômetro GloMax20/20 (Promega). Decorridas 48 horas da transfecção, o meio de cultura HEK for removido e as células foram lavadas com 100 µL solução PBS (Phosfate Buffered Saline). Em cada poço foram adicionados 20 µL do agente de lise PLB (1X) e a placa permaneceu em movimento à temperatura ambiente por 15 minutos. Para medição da luminencência da enzima *Firefly* foram adicionados 100 µL do substrato LARII em cada poço. Posteriormente foram adicionados 100 µL do reagente Stop/Glo e a luminescência do controle *Renilla* foi mensurada. O software do sistema GloMax produziu uma tabela no formato Excel contendo os valores das medições, com os quais foram produzidos gráficos após normalização dos dados.

6. RESULTADOS

6.1. ANÁLISE DE MICRODELEÇÕES AZF NO CROMOSSOMO Y

Os dezesseis pacientes azoospérmicos não apresentaram microdeleções AZF clássicas (Fig.8) nem microdeleções parciais gr/gr (Fig.9).

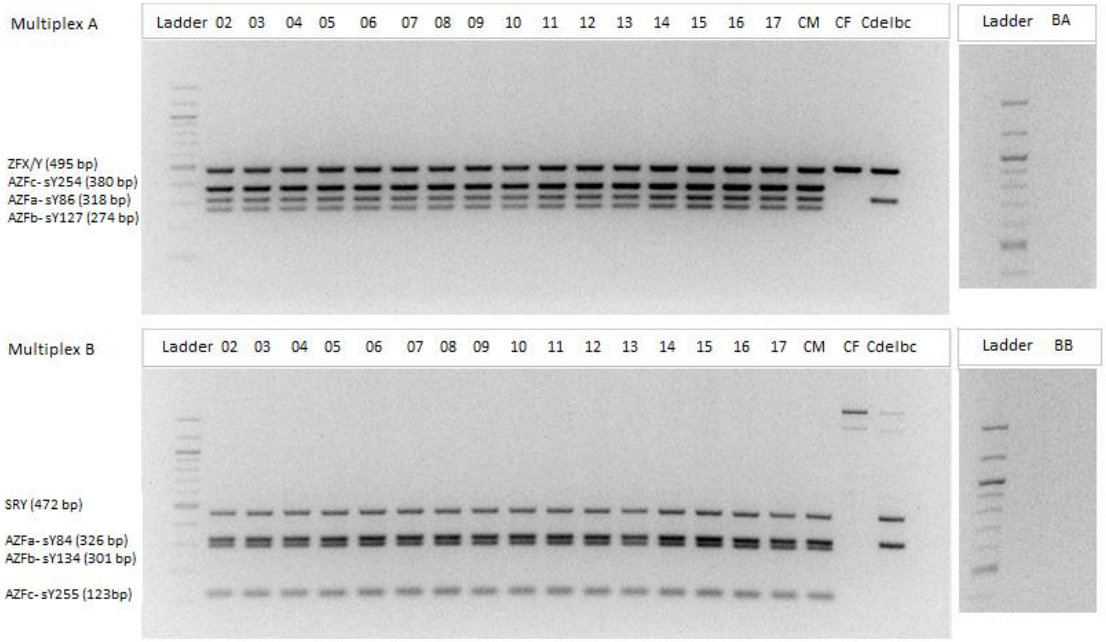

Figura 8. Análise básica AZF. Eletroforese em gel de agarose 2%, 100 Volts, 1h30. ZFX/Y: Controle interno positivo feminino e masculino; SRY: controle interno positivo masculino; 02 a 17: Pacientes M1802 a M1817, respectivamente; CM: DNA controle masculino; CF: DNA controle feminino; Cdelbc: DNA controle masculino com deleção AFZb/c; BA: controle negativo branco do multiplex A; BB: controle negativo branco do multiplex B.

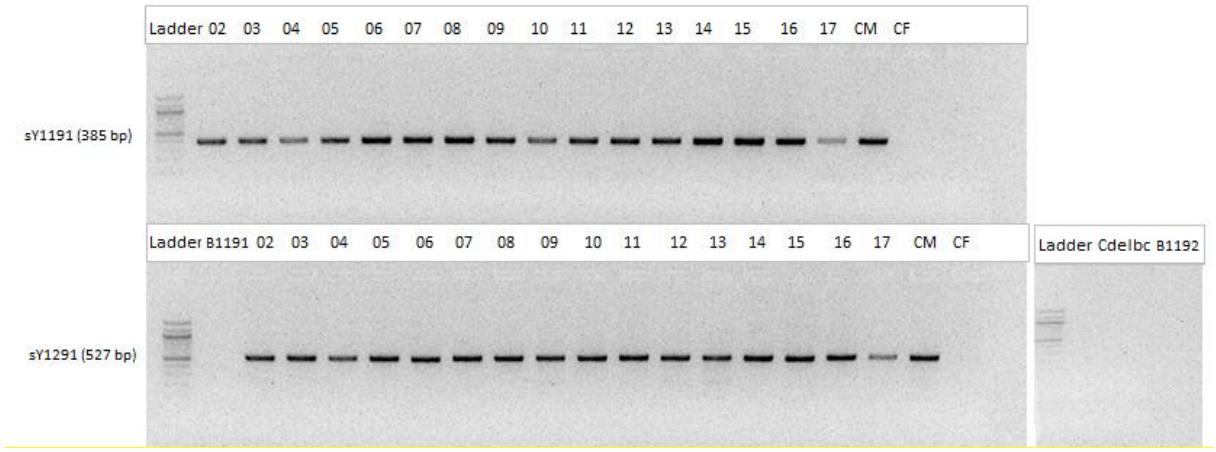

Figura 9. Análise estendida (AZF gr/gr). Eletroforese em gel de agarose 1.8%, 120 Volts, 30 minutos. 02 a 17: Pacientes M1802 a M1817, respectivamente; CM: DNA controle masculino; CF: DNA controle feminino; Cdelbc: DNA controle masculino com deleção AFZb/c; B1191: controle negativo branco para marcador sY1191; B1291: controle negativo branco para o marcador sY1291.

6.2. VARIANTES IDENTIFICADAS NOS GENES CANDIDATOS SELECIONADOS

No conjunto de 37 genes candidatos analisados (Tabela 3) foram identificadas 35 variantes no grupo infértil. Após a aplicação dos critérios de seleção, foram excluídas 16 variantes únicas associadas à herança recessiva; uma variante dominante, que também foi encontrada em um indivíduo do grupo controle (normozoospérmico) e oito variantes em heterozigose sem predição de patogenicidade pelos quatro programas de análise in silico utilizados (SIFT, PolyPhen, Mutation Taster) e CADD (Score<10). Dessas oito variantes consideradas benignas, duas são ligadas à herança dominante e três pares estão associados à herança recessiva.

Ao final, seis variantes previstas como patogênicas, três com predição incerta (classificação concomitante como benigna e deletéria) e uma predita como benigna no gene *TEX15* (c.5969G>A) foram mantidas para avaliação subsequente, totalizando assim, dez variantes missense distribuídas em sete genes candidatos (Tabela 6).

Optamos por relatar a variante c.5969G> A no gene *TEX15*, apesar dela ser considerada benigna, pois foi encontrada em combinação com outra variante em heterozigose (c.8074G> A) predita como deletéria (Tabela 6). Além disso, o gene

TEX15 tem evidência moderada de associação com a infertilidade masculina (Oud et al. 2018). Assim, descrevemos um paciente heterozigoto composto (M1804) (Fig.10A) afetado por azoospermia devido à aplasia de células germinativas (SCOS) e discreto aumento do nível de FSH (Tabela 2).

Duas variantes, c.727C> G e c.4297G> A, foram identificadas em heterozigose no gene *TEX14* em outro paciente heterozigoto composto (M1810) (Fig.10B), o qual apresentou parada de maturação de células germinativas na histologia testicular e parâmetro hormonal normal (Tabela 2). Esse fenótipo apresentado condiz com o relatado em outros pacientes portadores de variantes missense (Fakhro et al. 2018; Gershoni et al. 2017).

Uma única variante no gene *REC8*, c.91C> T, foi identificada em um paciente azoospérmico com parâmetros hormonais normais (Paciente M1809) (Fig.10C) (Tabela 2). Apesar deste gene possuir poucas evidências de associação à infertilidade masculina (Oud et al. 2018), esta mesma variante já foi descrita em um paciente portador de NOA, embora tenha sido considerada um polimorfismo naquela ocasião (Griffin et al. 2009).

No paciente M1809, também identificamos uma variante em homozigose potencialmente patogênica (22C> G) no gene *SYCE1L* (Fig.10C), durante a análise de seu parálogo *SYCE1*. O gene *SYCE1L* não tem evidência de associação à infertilidade até o momento, mas variantes do tipo splicing no gene *SYCE1* foram descritas em irmãos azoospérmicos apresentando NOA devido à parada de maturação de células germinativas (Maor-Sagie et al. 2015).

Duas variantes únicas foram encontradas no gene *KHLH10*. A variante c.887T> C foi identificada no Paciente M1816 (Fig.10D), apresentando SCOS e níveis aumentados de FSH (Tabela 2), enquanto a variante c.242A> T foi identificada no Paciente M1811 (Fig.10E), apresentando NOA, aumento dos níveis de FSH e, infelizmente, sem resultado de biópsia (Tabela 2). Até o momento, variantes missense e de splincing no gene *KHLH10* foram descritas apenas em associação com o fenótipo de oligozoospermia em humanos (Yatsenko et al. 2006; Miyamoto et al. 2017) e não no contexto de azoospermia ou SCOS, como observado neste estudo (Pacientes M1816 e M1811).

O paciente M1816 também possui uma variante no gene *DMRT1* (c.671A> G) (Fig.10D). Embora ambas as variantes (c.887T> C no gene *KLHL10* e c.671A> G no

gene *DMRT1*) tenham uma frequência maior do que o nosso limiar inicial, não as excluímos, pois estavam próximas do limite de frequência (1,02% e 1,24%, respectivamente). Ademais, a variante c.671A> G foi previamente descrita em dois pacientes com SCOS (Tewes et al. 2014).

Uma única variante, c.2452G>A, foi identificada no gene *DNMT3B* em um paciente azoospérmico com níveis aumentados de FSH (Paciente M1814) (Fig.10F)(Tabela 2). Apesar de haver evidências limitadas de uma associação com infertilidade masculina (Oud et al. 2018), variantes missense neste gene já foram descritas em pacientes com NOA (Li et al. 2015).

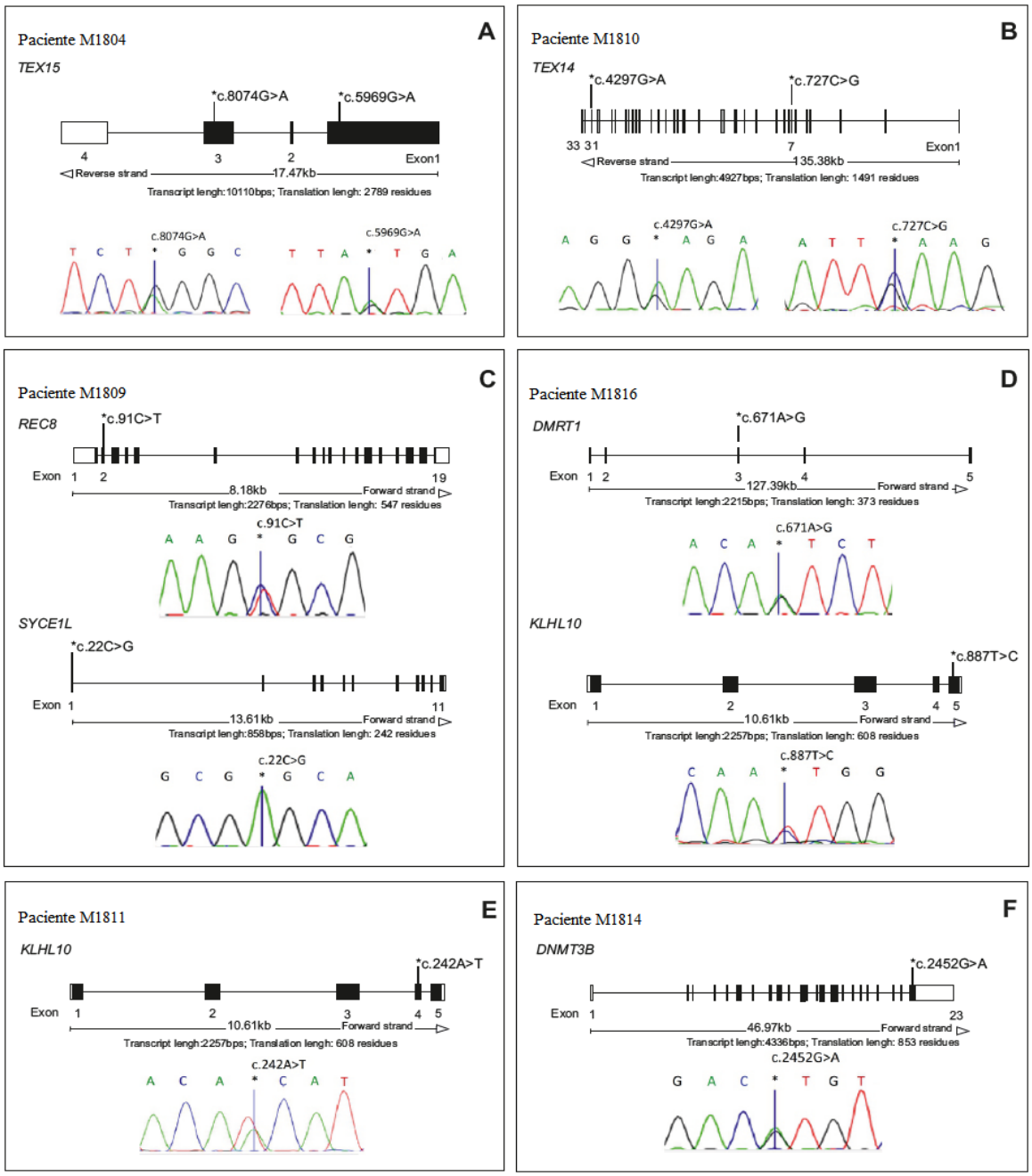

Figura 10. Variantes potencialmente patogênicas identificadas neste estudo. A ilustração evidencia as posições genômicas e cromatogramas de substituição de nucleotídeos. Os asteriscos indicam os nucleotídeos alterados. A estrutura dos genes foi reconstruída com base nos dados do *Ensembl*. Os números indicam os exons e o tamanho do gene. As barras em preto e branco representam exons codificantes e não codificantes, respectivamente.

Tabela 6. Variantes encontradas nos pacientes NOA. ID: código de identificação do paciente, Mat.A: parada de maturação de células germinativas, P: variante provavelmente ou possivelmente patogênica, B: variante benigna, D: variante deletéria ou danosa, T: variante tolerável, N: variante neutra, ou seja, não danosa à proteína. Popmax: Frequência alélica máxima na população mundial, considerando os bancos de dados do ExAC, ESP, 100genomes e gnomAD. Em negrito: predição patogênica. *variante com frequência acima dos limites estabelecidos (ver no texto o motivo da inclusão).

Paciente		**Variante**						**Programas *In silico***		**Popmax (%)**
ID	Fenótipo	Gene	Transcrito	Padrão de herança	cDNA	Predição de alteração na proteína	Genótipo	CADD ≥10=dano	PolyPhen/ SIFT/MutationTaster	ExAC, ESP, 100genomes, gnomAD
M1804	SCOS	*TEX15*	NM_031271.3	AR	c.8074G>A c.5969G>A	p.(Gly2692Arg) p.(Ser1990Asn)	1/0 1/0	**24.9** 9.1	**P** / - / N B / - / N	0.5 2.57
M1809	NOA	*REC8* *SYCE1L*	NM_01048205.1 NM_01129979.1	AD AR	c.91C>T c.22C>G	p.(Arg31Cys) p.(Leu8Val)	1/0 1/1	**35** 6.4	**P** / - / **D** **P** / - / -	0.52 3.86
M1810	Mat.A	*TEX14*	NM_01201457.1	AR	c.4297G>A c.727C>G	p.(Glu1433Lys) p.(Gln243Glu)	1/0 1/0	**26.9** **25.9**	B / **D** / **D** P / **D** / **D**	0.39 1.2
M1811	NOA	*KLHL10*	NM_01329595.1	AD	c.242A>T	p.(Asn81Ile)	1/0	**19.2**	B / T / **D**	0.2
M1814	NOA	*DNMT3B*	NM_006892.3	AD	c.2452G>A	p.(Val818Met)	1/0	**34**	**P** / D / -	0.01
M1816	SCOS	*KLHL10* *DMRT1*	NM_01329595.1 NM_021951.2	AD AD	c.887T>C c.671A>G	p.(Ile396Thr) p.(Asn224Ser)	1/0 1/0	**23** **25.4**	B / T / **D** **P** / T / **D**	1.02* 1.24*

6.3. ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE VARIANTES *NR5A1* E *DMRT1*

Das oito variantes de *NR5A1* selecionadas, foi possível concluir as análises funcionais preliminares de cinco. Em contrapartida, para o gene *DMRT1* realizamos a análise da expressão das quatro variantes selecionadas (Tabela 7).

Dentre as três variantes em que o ensaio da luciferase não foi realizado, só tivemos sucesso na obtenção dos mutantes c.769G>A. Não houve crescimento de colônias dos mutantes c.1079C>T e 1379A>C, mesmo após a repetição das etapas de mutagênese e transformação com diferentes concentrações de DNA plasmidial e primers. Assim, o mutante c.769G>A está pronto para realizar a transfecção e ensaio da luciferase, enquanto novas tentativas de mutagênese precisam ser realizadas para obtenção dos mutantes c.1079C>T e 1379A>C. Em experimentos futuros, testaremos aumentar a temperatura de pareamento do primers durante a PCR de amplificação ou aumentar a quantidade da enzima *DpnI* e o tempo de digestão das fitas parentais. Na ausência de sucesso, novos primers serão obtidos comercialmente.

Tabela 7. Variantes selecionadas para análise funcional e status do experimento. C+: controle positivo, C-: controle negativo.

Gene	Referência	Variante	*Status*
NR5A1	Bashamboo et al. 2010 *apud* Ito et al. 2000	c.104_105delGCinsAA **(C+)** p.Gly35Glu	**Ensaio da luciferase**
NR5A1	*Genesys;* Bashamboo et al. 2010; Ferlin et al. 2015	c.712G>A **(C+)** p.(Asp238Asn)	**Ensaio da luciferase**
NR5A1	Röpke et al. 2013; *Genesys;* Wada et al. 2006	c.437G>C **(C-)** p.(Gly146Ala)	**Ensaio da luciferase**
NR5A1	Röpke et al. 2013	c.493G>C p.(Gly165Arg)	**Ensaio da luciferase**
NR5A1	Röpke et al. 2013	c.769G>A p.(Asp257Asn)	Mutante sequenciado
NR5A1	Röpke et al. 2013	c.968T>C p.(Ile323Thr)	**Ensaio da luciferase**
NR5A1	*Genesys*	c.1079C>T p.(Ala360Val)	Sem crescimento de colônias mutantes
NR5A1	*Genesys*	c.1379A>C p.(Gln460Pro)	Sem crescimento de colônias mutantes
DMRT1	*Genesys*	c.991G>C **(C-)** p.(Asp331His)	**Ensaio da luciferase**
DMRT1	*Genesys*	c.308A>G p.(Lys103Arg)	**Ensaio da luciferase**
DMRT1	*Genesys*	c.344T>A p.(Met115Lys)	**Ensaio da luciferase**
DMRT1	*Genesyis;* este estudo (M1816)	c.671A>G p.(Asn224Ser)	**Ensaio da luciferase**

A medição da expressão gênica pelo ensaio da luciferase foi realizada em quadruplicata e repetida em quatro experimentos independentes. Os resultados aqui apresentados correspondem ao último ensaio realizado, porém ainda são preliminares, uma vez que encontramos grande divergência entre as medições das quadruplicatas, como evidenciado pela barra de desvio padrão nos gráficos das figuras 11 e 12. É provável que essa divergência tenha sido fruto da injeção não padronizada de reagentes pelo bico injetor do sistema automatizado GloMax, pois percebemos que o volume final dos poços após a realização das medições não era homogêneo.

Segundo os resultados preliminares da análise do gene NR5A1 (Fig.11), a variante c.437G>C se mostrou um bom controle negativo, uma vez que apresentou expressão semelhante ao controle sem mutação (WT). O controle positivo c.104_105delGCinsAA,

já bem caracterizado na literatura, apresentou baixa expressão, de acordo com o previsto, apesar de ter apresentado grande desvio padrão. Dentre as três variantes preditas como patogênica que foram testadas, apenas a variante c.968T>C mostrou expressão reduzida. Entretanto, a variante c.712G>A, que previamente demonstrou diminuir a expressão gênica, aqui aparece com expressão elevada. Podemos perceber que tanto esta variante, quanto a variante c.493G>C apresentaram grande desvio padrão, dessa forma, essa expressão acima do controle provavelmente é um artefato.

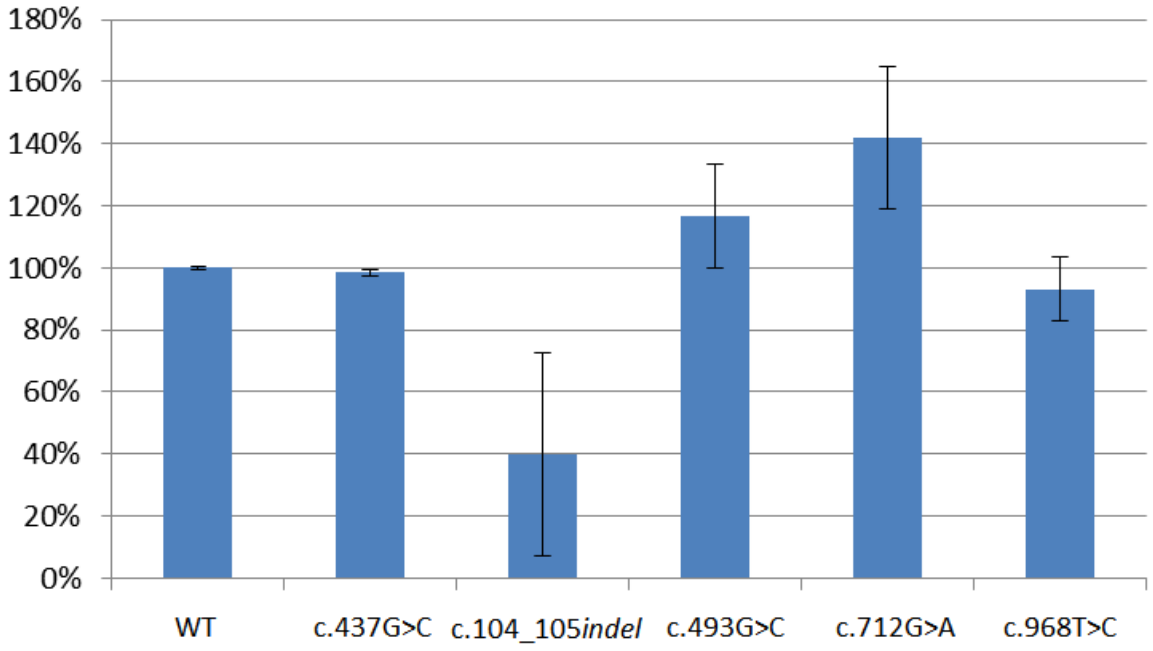

Figura 11. Expressão das variantes no gene NR5A1. WT: controle sem mutação no gene; c.437G>C: controle negativo (presente em indivíduos normozoospérmicos); c.104_105indel: controle positivo c.104_105delGCinsAA (comprovadamente diminui expressão do gene); c.493G>C e c.968T>C: variantes previamente descritas em indivíduos com parada de maturação de células germinativas e oligozoospermia, respectivamente; c.712G>A: variante previamente descrita em indivíduos NOA em estudos independentes.

De acordo com os resultados preliminares da análise do gene *DMRT1* (Fig.12), as variantes avaliadas apresentaram diminuição da expressão gênica em relação ao controle WT, inclusive a variante c.991G>C, que havia sido escolhida como controle negativo, por também ter isso encontrada em indivíduos normozoospérmicos. Entretanto, como o controle WT apresentou um desvio padrão relativamente alto, a divergência entre a expressão deste e do controle negativo c.991G>C pode ser um artefato. Dentre as três variantes previstas como patogênicas, c.344 foi a que apresentou maior diminuição da expressão, porém, também apresenta maior desvio padrão.

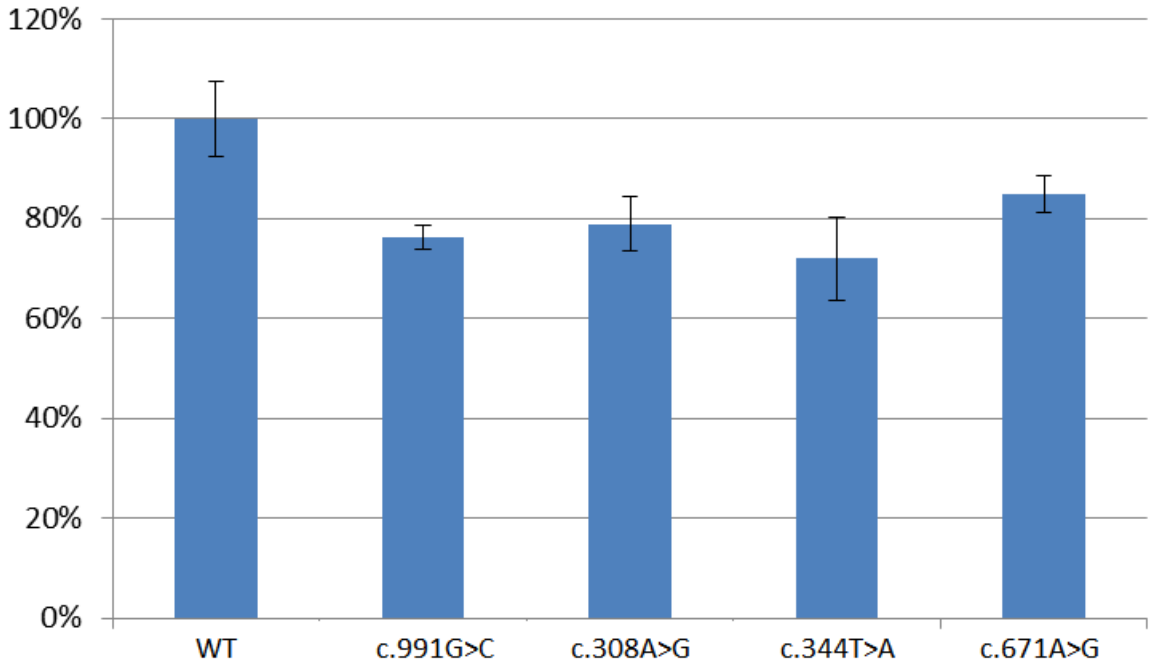

Figura 12. Expressão das variantes do gene *DMRT1*. WT: controle sem mutação no gene; c.991G>C: controle negativo (presente em indivíduos normozoospérmicos); c.308A>G e c.344T>A: variantes encontradas em indivíduos portadores de SCOS do banco de exomas alemão; c.671A>G: variante encontrada no paciente M1816 com SCOS e em indivíduos portadores de SCOS e atrofia mista de células germinativas do banco de dados alemão.

7. DISCUSSÃO

7.1. DESAFIOS NO DIAGNÓSTICO MOLECULAR DE MICRODELEÇÕES AZF

A técnica molecular tradicionalmente empregada na análise de microdeleções AZF no cromossomo Y é a PCR-multiplex utilizando marcadores STS (Simoni 2001). Apesar desse método ser simples e amplamente divulgado na literatura através do Protocolo Europeu (Simoni 2001; Krausz et al. 2013), vários laboratórios e institutos de pesquisa continuam utilizando marcadores STS de sua própria escolha para detecção dessas deleções, o que dificulta comparações entre as frequências destas em diferentes populações (Sugan*thi et* al., 2014; Ban*sal et* al., 2016).

A discrepante frequência de microdeleções AZF em populações distintas parece estar mais ligada à falta de padronização na seleção de pacientes e na escolha de marcadores STS do que à genuína existência de polimorfismos estruturais com base na etnia e origem geográfica da população (Navarro-Costa et al. 2010; Kumari et al. 2015). Dessa forma, os marcadores que não estão inclusos no Protocolo Europeu, quando utilizados, podem estar gerando falsos positivos (Simoni, 2001; Bunyan, Callaway and Laddach, 2012; Naa*sse et* al., 2015; Ban*sal et* al., 2016)

No Brasil, a frequência de microdeleções AZF entre indivíduos portadores de azoospermia não obstrutiva é estimada em 7,7% (Simoni et al. 2008). Essa frequência foi calculada com base em três publicações independentes do Estado de São Paulo que utilizaram o PCR multiplex como técnica padrão de análise (Pieri et al. 2002; SãoPedro et al. 2003; Pina-Neto et al. 2006).

O primeiro estudo propôs a utilização de seis marcadores STS para o diagnóstico das microdeleções em nossa população, dois dos quais estão atualmente no Protocolo Europeu, cuja primeira versão havia sido publicada em 2001. Com essa seleção de marcadores e uma análise de 114 pacientes inférteis, a frequência de microdeleções encontrada foi de 8,8% (Pieri et al. 2002).

O segundo estudo utilizou uma seleção de 12 marcadores STS, dentre os quais quatro estão no atual Protocolo Europeu. A frequência de microdeleções AZF encontrada entre 60 pacientes com azoospermia não obstrutiva ou oligozoospermia severa foi de 6,7%.

Interessantemente, dois pacientes com oligozoospermia severa possuíam varicocele bilateral (SãoPedro et al. 2003). Embora a varicocele seja tradicionalmente considerada um fator não genético para a infertilidade masculina, foi detectada uma maior frequência de microdeleções AZF nos chineses azoospérmicos portadores de varicocele (18%), em comparação com o grupo de azoospérmicos sem varicocele (6%)(Dai et al. 2015). Esses achados mostram a importância da realização da análise de microdeleções AZF em todos os pacientes com número reduzido de espermatozoides, independentemente de apresentarem outras prováveis causas de infertilidade.

O terceiro estudo utilizou 28 marcadores STS, destes, quatro estão indicados no Protocolo Europeu. A frequência de deleções em AZF encontradas nos 165 pacientes com infertilidade secundária foi de 7,5% (Pina-Neto et al. 2006).

Até o presente momento foram publicados apenas outros três estudos semelhantes no Brasil. Dois deles utilizaram apenas três marcadores STS, todos do Protocolo Europeu e analisaram, respectivamente, 143 e 94 pacientes com NOA ou oligozoospermia severa, obtendo uma frequência de microdeleções em AZF de 4,2% (Mafra et al. 2011) e 1,1% (Godoy et al. 2014), dados bastante inferiores aos encontradas anteriormente. No único estudo em que foram utilizados todos os marcadores do Protocolo Europeu, a frequência de microdeleções em AZF obtida foi de 44% em uma amostra composta por 23 indivíduos portadores de azoospermia e 40 portadores de oligozoospermia severa provenientes de Goiás (Arruda et al. 2007).

De acordo com o exposto, as disparidades dos resultados encontrados nos diferentes estudos conduzidos até o momento no Brasil parecem refletir a falta de padronização da técnica, principalmente relacionada à seleção de marcadores STS e de pacientes incluídos na análise. Com a adoção do protocolo europeu e maior acessibilidade à análise de microdeleções AZF, não só no âmbito da pesquisa, mas também na rotina médica, será possível estimar com maior fidelidade a frequência destas em nossa população.

Além de terem sido encontradas diferenças regionais na frequência de microdeleções AZF clássicas em pacientes oligozoospérmicos e azoospérmicos (Pina-Neto et al. 2006; Godoy et al. 2014), alguns tipos de microdeleções, como as deleções parciais em AZFc, denominadas gr/gr, não foram associadas à infertilidade em nossa população (Carvalho et al. 2006), contrapondo-se aos resultados encontrados na Itália, Holanda e China (Giachini et al. 2008; Visser et al. 2009; Yang et al. 2010). Não se sabe ao certo se a divergência na associação entre infertilidade e microdeleções parciais gr/gr também é

devido à utilização não padronizada de marcadores STS (Simoni 2001; Krausz et al. 2013) ou devido à estrutura peculiar do cromossomo Y ser propensa a sofrer mutações aleatórias em populações étnico e geograficamente distintas (Bansal et al. 2016; Tyler-smith & Krausz 2009) ou ainda, devido à expressão fenotípica variável conferida pelas deleções de genes múltiplas cópias (Bunyan et al. 2012).

Dessa forma, por ainda ser incerta a associação entre infertilidade masculina e microdeleções parciais gr/gr, esta análise ainda não foi incluída na rotina clínica. Contudo, visto que o presente estudo tem como foco investigar as causas monogenéticas da infertilidade masculina, asseguramos que os pacientes inférteis analisados também fossem negativos para este tipo de deleção.

7.2. DESAFIOS NO DIAGNÓSTICO GENÉTICO DA INFERTILIDADE MASCULINA

O diagnóstico da infertilidade masculina é dificultado, não apenas pelo fenótipo heterogêneo, e pelo envolvimento de milhares de genes no processo de espermatogênese (Tüttelmann et al. 2018), mas pelo fato de que mutações deletérias em genes relacionados à reprodução impactam diretamente no valor adaptativo, dessa forma, tendem a permanecer em baixa frequência na população. Por esse motivo, é necessária a análise de vários genes em um grande grupo de pacientes para detectar novos genes candidatos (Oud et al. 2018).

O avanço da genômica e o desenvolvimento de novas tecnologias de sequenciamento em larga escala tornou possível a realização da análise de múltiplos genes em múltiplos pacientes em um único experimento. Uma das técnicas do sequenciamento de nova geração, o WES, tem sido empregado com sucesso para identificação de novos genes candidatos associados a falhas na espermatogênese (Gershoni et al. 2017; Fakhro et al. 2018; Robay et al. 2018). Todavia, a interpretação dos dados genéticos não é simples, uma vez que a maioria das mutações encontradas em genes candidatos foram descritas em um único paciente ou uma única família, como é esperado acontecer em estudos de variantes raras (Oud et al. 2018). Ademais, o volume de novas variantes identificadas pelo NGS excede a capacidade dos pesquisadores em realizar estudos funcionais, o que dificulta a distinção de variantes raras patogênicas e variantes raras benignas (Walsh et al. 2014). Para este fim, são usados programas de predição *in silico*, que são confiáveis, mas não determinantes da patogenicidade de uma variante.

Dessa forma, tanto a realização de estudos genéticos independentes como a realização de estudos funcionais são essenciais para dar maior robustez à validade clínica dos genes candidatos em relação ao diagnóstico de infertilidade masculina (Oud et al. 2018).

O presente estudo fornece evidências para a validade clínica de alguns genes associados à azoospermia. Entre os 37 genes analisados, encontramos variantes em sete. Atribuímos o sucesso na identificação de variantes, mesmo dispondo de um número reduzido de pacientes, à seleção racional de genes a serem analisados. Resumidamente, foram selecionados apenas os genes em que foram descritas variantes com padrão de herança monogenética, com alta penetrância, afetando apenas a fertilidade e associados ao fenótipo apresentado por nossos pacientes. Para minimizar a probabilidade de encontrar variantes benignas, consideramos apenas as de consequências graves, que levam à ruptura do gene (*start loss, stop gain, splicing, frameshift*) ou troca de aminoácidos (*missense*), excluímos variantes comuns, com frequências alélicas >5% na população mundial e selecionamos as previstas como patogênicas e ausentes nos indivíduos controles. Com essa abordagem foram identificadas variantes patogênicas em seis dos dezesseis pacientes não relacionados, portadores de azoospermia não obstrutiva (37,5%).

Além deste ser o primeiro estudo a utilizar WES na investigação da infertilidade em homens portadores de NOA na américa latina, poucos trabalhos realizaram WES em mais de dois indivíduos não aparentados. Apenas quatro outros estudos analisaram de 18 a 30 pacientes não aparentados. Dessa forma, nosso tamanho amostral é compatível com o descrito na literatura e pode considerado suficiente para esse tipo de análise.

7.3. SIGNIFICADO CLÍNICO DAS VARIANTES IDENTIFICADAS

O paciente M1804 apresentou duas variantes em heterozigose (c.8074G> A e c.5969G> A), no gene ***TESTIS EXPRESSED GENE 15*** (*TEX15*, OMIM 605795). Apesar de não termos amostras de DNA parentais para análise de segregação, consideramos que estas variantes estavam em alelos distintos. Indivíduos heterozigotos compostos foram previamente descritos na literatura (Colombo et al. 2017), mas a maioria das variantes identificadas no gene *TEX15* foi descrita em homozigose e ocasionava de perda de função da proteína (Okutman et al. 2015; Wang et al. 2018). Esse gene, exclusivamente expresso nos testículos, é essencial para o estabelecimento de sinapses cromossômicas e recombinação meiótica em células germinativas, atuando no reparo de quebras duplas da fita de DNA (*Double-Strand Break*, DSD) durante a espermatogênese (Yang et

al. 2008; Wang et al. 2018). Em camundongos, mutações em *TEX15* causam redução drástica do tamanho do testículo e parada de maturação de células germinativas (Yang et al. 2008). Em humanos, esses fenótipos também foram observados, além de terem sido descritas variantes associadas à oligozoospermia severa e criptozoospermia (Colombo et al. 2017; Okutman et al. 2015; Wang et al. 2018). No entanto, até o momento, não foram relatadas variantes em pacientes NOA com SCOS (Colombo et al. 2017; Okutman et al. 2015; Wang et al. 2018), tal como observado neste presente estudo (Paciente M1804)

Todavia, uma das variantes *missense* identificadas no paciente M1804 (c.5969G>A) foi considerada benigna por quatro programas de predição e é relativamente prevalente na população mundial (0,0257). Assim, por enquanto, o valor de diagnóstico de ambas as variantes é incerto, mas, considerando que o gene *TEX15* possui evidência moderada de associação à infertilidade masculina (Oud et al. 2018), essas variantes são elegíveis para uma futura análise funcional *in vitro*, a fim de confirmar sua patogenicidade.

Adicionalmente, duas variantes (c.727C> G e c.4297G> A) foram identificadas em outro paciente provavelmente heterozigoto composto (M1810) no gene ***TESTIS EXPRESSED GENE 14*** (*TEX14*, OMIM 605792). Neste caso, ambas as variantes foram preditas como patogências. Estudos em camundongos demonstraram que *TEX14*, exclusivamente expresso nos testículos, é necessário para a formação de pontes intercelulares e subsequente divisão celular de células germinativas. Na ausência de *TEX14*, as espermatogônias não completam a primeira citocinese (Greenbaum et al. 2006). Variantes *missense* nesse gene foram previamente descritas em irmãos azoospérmicos apresentando parada de maturação de células germinativas (Fakhro et al. 2018), enquanto uma variante de *splicing* foi identificada em um paciente com SCOS (Fakhro et al. 2018) e variantes *frameshift* foram associadas com ambos os fenótipos (Gershoni et al. 2017; Fakhro et al. 2018). Portanto, presuminos que as variantes *missense* encontradas sejam provavelmente causadoras da infertilidade no paciente M1810, reforçando a evidência de que as mutações no TEX14 podem ser responsáveis por muitos casos de NOA.

No paciente M1816, foram identificadas variantes potencialmente patogênicas em dois genes diferentes (*DMRT1* e *KLHL10*), dificultando nossa capacidade de definir o fator causal da azoospermia. O gene ***DOUBLESEX- AND MAB3-RELATED TRANSCRIPTION FACTOR 1*** (*DMRT1*; OMIM 602424) codifica um fator de transcrição que regula os genes nas células de Sertoli e nas células pré-meióticas durante a diferenciação pós-natal dos testículos (Macdonald et al. 2018). Já o ***KELCH HOMOLOG 10*** (*KLHL10*;

OMIM 615081) é um gene altamente conservado evolutivamente em mamíferos, expresso exclusivamente no citoplasma de espermátides. Sua haplo-insuficiência causa bloqueio no estágio de alongamento da espermiogênese em camundongos, levando à maturação assincrônica e degeneração de espermátides (Yan et al. 2004). Considerando que deleções e mutações *missense* no gene *DMRT1* foram relatadas tanto em pacientes criptozoospérmicos como em pacientes azoospémicos (Lima et al. 2015; Tüttelmann et al. 2018), enquanto mutações no gene *KLHL10* foram associadas apenas à oligozoospermia em humanos (Yatsenko et al. 2006; Miyamoto et al. 2017) e que a variante encontrada no gene *DMRT1*, c.671A> G, já foi descrita em dois pacientes portadores de azoospermia devido à SCOS (Tewes et al. 2014), assumimos que esta mesma variante seja a responsável pelo fenótipo de SCOS em nosso paciente, reforçando a associação de *DMRT1* à infertilidade masculina. Contudo, não podemos descartar a possibilidade de que a variante, c.887T> C, encontrada no gene *KLHL10,* também desempenhe um papel na indertilidade masculina, mas, como a azoospermia já é o fenótipo mais grave de infertilidade, nenhum efeito fenotípico adicional pode ser observado em nosso paciente.

Relatamos um segundo paciente com NOA portador da variante missense potencialmente patogênica c.242A> T em *KLHL10* (Paciente M1811). Isso aumenta a lista de variantes neste gene que podem estar associadas à infertilidade masculina e sugere que elas também podem ser responsáveis por NOA em humanos, porque a haplo-insuficiência desse gene perturba a maturação de células germinativas em camundongos.

No paciente M1814, portador de azoospermia e aumento de FSH, foi identificada a variante c.2452G>A no gene ***DNA METHYLTRANSFERASE 3 Beta*** (*DNMT3B*). Esse gene codifica uma metiltransferase que atua estabelecendo a metilação *de novo* do DNA e, portanto, é classificado como regulador epigenético da espermatogênese (Okano et al. 1999). O *DNMT3B* é predominantemente expresso em espermatogônias e espermatócitos. Recentemente, demonstrou-se que a expressão de proteínas *DNMT*s difere entre tipos de células espermatogênicas e entre os portadores de azoospermia não obstrutiva, incluindo aqueles que apresentam hipoespermatogênese, parada de maturação em espermátides, parada de maturação em espermatócitos e SCOS. A diminuição da expressão dessas proteínas causa alterações nos níveis globais de metilação do DNA em células espermatogênicas, o que pode contribuir para o desenvolvimento da infertilidade masculina em pacientes com NOA (Uysal et al. 2019). Com base nesses estudos funcionais e considerando que variantes missense já foram descritas em pacientes com NOA (Li et al. 2015), presumimos que a variante c.2452G>A

desempenha um papel na azoospermia do paciente M1814. Além disso, como o nosso é o segundo estudo relatando variantes potencialmente patogênicas no gene *DNMT3B* em pacientes com NOA (Oud et al. 2018), oferecemos mais evidências apoiando a sua associação com a infertilidade masculina.

Assim como o gene *DNMT3B,* ***RECOMBINATION PROTEIN 8*** (*REC8*, GCID: GC14P024171) possui pouca evidência de associação com a infertilidade masculina (Oud et al. 2018). Este gene codifica um componente específico do eixo coesina, necessário para a montagem do complexo sinaptonêmico (CS) (Fukuda et al. 2014). O CS liga-se a cromátides irmãs, impedindo a separação local destas e, garantindo, dessa forma, a troca de material genético durante o *crossing-over* e subseqüente segregação correta dos cromossomos homólogos durante a meiose (Agostinho et al. 2016; Ishiguro & Watanabe 2016). Embora estudos funcionais tenham relatado sua importante função durante a meiose, eles não conseguiram identificar mutações causais (Hann et al. 2011). Coincidentemente, a mesma variante encontrada no paciente M1809, c.91C> T, foi relatada em um único paciente azoospérmico americano (Griffin et al. 2009). Quando esta variante foi descrita, foi considerada como polimorfismo devido à sua alta frequência de 0,5 na população europeia (Griffin et al. 2009), mas, de acordo com ExAC, ESP, 100genomes e gnomAD, sua frequência populacional máxima é de 0,005. Uma vez que esta é de fato uma variante rara, descrita pela segunda vez em um paciente com NOA, supomos que seja uma variante causal da infertilidade masculina (Griffin et al. 2009).

Também foi identificada no paciente M1809, uma variante em homozigose, c.22C> G, no gene denominado ***SYNAPTONEMAL COMPLEX CENTRAL ELEMENT PROTEIN 1 LIKE*** (*SYCE1L*, GID: GC16P077233). É suposto que o gene *SYCE1L,* localizado no cromossomo 16q23.1, tenha funções semelhantes ao seu parálogo *SYCE1* (OMIM 611486) (UniProtKB / A8MT33, 2019). *SYCE1* é um dos componentes centrais do CS, que é formado por elementos laterais, transversos e centrais (Gómez-H et al. 2016). A perda de função de *SYCE1* leva à falha infertilidade em camundongos devido à falha na formação do CS e consequente parada da meiose (Dunne & Davies 2019). A variante c.22C> G encontrada no gene *SYCE1L* é predita como patogênica, mas tem freqüência relativamente alta na população mundial (0,0386). Embora mutações neste gene não tenham sido relatadas, mutações no seu parálogo, *SYCE1,* foram descritas em irmãos azoospérmicos devido à parada de maturação de células germinativas (Maor-Sagie et al. 2015). Portanto, segundo o princípio de "anotação paráloga" (Walsh et al. 2014), supomos que mutações em *SYCE1L* também possam ocasionar azoospermia. Nessa perspectiva, achamos que *SYCE1L* deve ser considerado em investigações futuras sobre

infertilidade masculina. Em síntese, para o paciente M1809, a variante causal plausível de NOA é c.91C> T, identificada no gene *REC8*, mas a variante em *SYCE1L* pode produzir um efeito sinérgico, pois ambos os genes estão intimamente relacionados e são necessários para a formação correta do complexo sinaptonêmico durante a meiose.

7.4. ESTUDO DA EXPRESSÃO GÊNICA DE VARIANTES *NR5A1* E *DMRT1*

Considerando o gene *NR5A1*, apesar dos controles negativos (WT e c.437G>C) apresentarem expressão homogênea e semelhante entre si, os controles positivos (c.104delGCinsAA e c.712G>A) apresentaram grande desvio-padrão. Visto que, um desvio-padrão elevado demonstra que as medições da expressão gênica nas quadruplicatas não foram homogêneas, só será possível inferir a patogenicidade das variantes selecionadas após normalizar os dados dos controles.

Ainda que a variante c.104delGCinsAA tenha apresentado redução de 60% na expressão gênica de *NR5A1,* a variante c.712G>A contraditoriamente apresentou aumento de 40% nessa expressão, em comparação com o controle não mutado (WT). Nos experimentos descritos em Bashamboo *et a*l., 2010, essas mesmas variantes apresentaram redução de 90% e 50%, respectivamente, na expressão gênica.

Uma vez que todas as variantes de *DMRT1* selecionadas apresentaram diminuição da expressão gênica em relação ao controle WT, podemos considerar que o promotor Cyp11A foi capaz de ser induzido por este gene. Contudo, a variante c.991G>C não se mostrou um bom controle negativo, pois apesar de ser considerada benigna, apresentou redução da expressão gênica, assim como as outras variantes potencialmente patogênicas. Dessa forma, uma nova variante presente em indivíduos normozoospérmicos deverá ser adicionada em análises futuras, como controle negativo.

Como o estudo funcional ainda está em fase de padronização, não foi possível tirar conclusões sobre o efeito das variantes selecionados sobre a expressão dos genes analisados. Entretanto, foi possível confirmar que o ensaio da luciferase, tal como descrito para o gene *NR5A1*, pode ser aplicado para análise do gene *DMRT1* humano.

8. CONCLUSÃO

Em conclusão, neste primeiro estudo a empregar o sequenciamento completo do exoma em pacientes brasileiros não aparentados portadores de NOA, analisamos 37 genes candidatos associados à infetrilidade masculina e identificamos variantes em sete genes. Uma das variantes, c.671A> G, foi encontrada em um gene previamente conhecido por desempenhar papel crítico na espermatogênese (*DMRT1).* E a variante c.91AC> T, no gene *REC8,* também já foi descrita em pacientes com NOA, mas a literatura sobre esse gene é escassa. Além disso, identificamos novas variantes em dois genes, *KLHL10* e *TEX15*, com evidência moderada de associação a distúrbios na espermatogênica, e em dois genes, *DNMT3B* e *TEX14*, com evidências limitadas de associação, mas que podem ser responsáveis por um número de casos de NOA. Neste estudo, descrevemos uma variante homozigótica no gene *SYCE1L*, o qual ainda não foi associado à infertilidade masculina, mas apresentou potencial para ser um gene candidato em estudos de infertilidade masculina. Embora o número de pacientes analisados seja pequeno, a seleção racional de genes permitiu detectar variantes raras e potencialmente patogênicas, fornecendo evidências para validar genes candidatos associados à azoospermia.

A expressão da variante identificada no gene *DMRT1*, juntamente com outras duas variantes potencialmente patogênicas foi analisada através do ensaio funcional da luciferase. Esse ensaio ainda não foi realizado no contexto da infertilidade masculina em humanos para este gene, portanto, testamos o protocolo estabelecido para o gene *NR5A1,* que se mostrou adequado, inclusive o mesmo promotor (Cyp11A) se mostrou induzível por ambos os genes (*NR5A1* e *DMRT1*). Entretanto, como esse experimento encontra-se em fase de padronização, não foi possível tirar conclusões sobre o efeito das variantes selecionadas na expressão desses dois genes.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Affara, N.A., 2001. The role of the Y chromosome in male infertility. Expert Reviews in Molecular Medicine, 44(January), pp.1–16.

Agostinho, A. et al., 2016. High density of REC8 constrains sister-chromatid axes and prevents illegitimate synaptonemal complex formation. EMBO reports, 17, pp.901–913.

Arruda, J.T. et al., 2007. Y chromosome microdeletions in Brazilian fertility clinic patients. Genetics and Molecular Research, 6(2), pp.461–469.

Askari, M. et al., 2019. Identification of a homozygous GFPT2 variant in a family with asthenozoospermia. Gene, 699, pp.16–23. Available at: https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.02.060.

ASRM, 2018. Evaluation of the azoospermic male : a committee opinion. ASRM pages, 109(5), pp.777–782.

ASRM, 2012. Infertility : An Overview. American Society for Reproductive Medicine, 103(2), pp.1–19. Available at: http://www.asrm.org/uploadedFiles/ASRM_Content/Resources/Patient_Resources/Fact_Sheets_and_Info_Booklets/infertility_overview.pdf.

Bansal, S.K. et al., 2016. Gr/gr deletions on Y-chromosome correlate with male infertility: an original study, meta-analyses, and trial sequential analyses. Scientific reports, 6(February), p.19798. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4753437&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Barratt, C.L.R. et al., 2017. The diagnosis of male infertility: An analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance-challenges and future research opportunities. Human Reproduction Update, 23(6), pp.660–680.

Bashamboo, A. et al., 2010. Human male infertility associated with mutations in NR5A1 encoding steroidogenic factor 1. American Journal of Human Genetics, 87(4), pp.505–512.

Borges, C.H. de S. & Macedo, L.C., 2016. Infertilidade masculina decorrente de microdeleções no cromossomo Y. Reprodução & Climatério, (x x), pp.1–6. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1413208716000091.

Bunyan, D.J., Callaway, J.L.A. & Laddach, N., 2012. Short Communication Detection of Partial Deletions of Y-chromosome AZFc in Infertile Men Using the Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification Assay. J Reprod Infertil, 13(9), pp.174–178.

Carvalho, C.M.B. et al., 2006. No association found between gr/gr deletions and infertility in Brazilian males. Molecular Human Reproduction, 12(4), pp.269–273.

Cocuzza, M., Alvarenga, C. & Pagani, R., 2013. The epidemiology and etiology of azoospermia. Clinics (São Paulo, Brazil), 68 Suppl 1(3), pp.15–26.

Colombo, R., Pontoglio, A. & Bini, M., 2017. Two novel TEX15 mutations in a family with nonobstructive azoospermia. Gynecologic and Obstetric Investigation, 82(3), pp.283–286.

Coutton, C. et al., 2019. Bi-allelic Mutations in ARMC2 Lead to Severe Astheno-Teratozoospermia Due to Sperm Flagellum Malformations in Humans and Mice. American Journal of Human Genetics, 104(2), pp.331–340.

Dai, R.L. et al., 2015. Varicocele and male infertility in Northeast China : Y chromosome

microdeletion as an underlying cause. Genetics and Molecular Research, 14(Group 3), pp.6583–6590.

Dunne, O.M. & Davies, O.R., 2019. Molecular structure of human synaptonemal complex protein SYCE1. Chromosoma.

Fakhro, K.A. et al., 2018. Point-of-care whole-exome sequencing of idiopathic male infertility. Genetics in Medicine, 20(11), pp.1365–1373. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/gim.2018.10.

Ferlin, A. et al., 2007. Molecular and clinical characterization of Y chromosome microdeletions in infertile men: A 10-year experience in Italy. Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism, 92(3), pp.762–770.

Ferlin, A. et al., 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), pp.163–169.e1. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.04.017.

Fukuda, T. et al., 2014. STAG 3-mediated stabilization of REC8 cohesin complexes promotes chromosome synapsis during meiosis. The EMBOjounal, 33(11), pp.1243–1256.

Gershoni, M. et al., 2017. A familial study of azoospermic men identifies three novel causative mutations in three new human azoospermia genes. Genetics in Medicine, 19(9), pp.998–1006. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/gim.2016.225.

Giachini, C. et al., 2008. Partial AZFc deletions and duplications: Clinical correlates in the Italian population. Human Genetics, 124(4), pp.399–410.

Godoy, G.C. et al., 2014. Clinical Medicine Insights : Reproductive Health. Clinical Medicine Insights Reproductive Health, 8, pp.51–57.

Gómez-H, L. et al., 2016. C14ORF39/SIX6OS1 is a constituent of the synaptonemal complex and is essential for mouse fertility. Nature Communications, 7, pp.1–16.

Grangeiro, C.H.P., 2018. Genomic assessment of idiopathic male infertility by nonobstructive azoospermia. University of São Paulo.

Greenbaum, M.P. et al., 2006. TEX14 is essential for intercellular bridges and fertility in male mice. PNAS, 103(13), pp.4982–4987.

Griffin, J. et al., 2009. Severe Male Factor Infertility Clinical Corner : Communication Analysis of the Meiotic Recombination Gene REC8 for Sequence Variations in a Population with Severe Male Factor Infertility. Systems Biology in Reproducitve Medicine, 6368, pp.163–165.

Hamada, A.J., Esteves, S.C. & Agarwal, A., 2013. A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. Clinics (São Paulo, Brazil), 68(S1), pp.39–60.

Hann, M.C., Lau, P.E. & Tempest, H.G., 2011. Meiotic recombination and male infertility:from basic science to clinical reality? Asian Journal of Andrology, 13(2), pp.212–218.

Hook, E.B., 1977. Exclusion of Chromosomal Mosaicism : Tables of 90 %, 95 %, and 99 % Confidence Limits and Comments on Use. Am J Num Genet, 29, pp.94–97.

Hua, J. & Wan, Y. yang, 2019. Whole-exome sequencing identified a novel mutation of AURKC in a Chinese family with macrozoospermia. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 36(3), pp.529–534.

Ishiguro, K. & Watanabe, Y., 2016. The cohesin REC 8 prevents illegitimate inter-sister synaptonemal complex assembly. EMBO reports, 17(6), pp.783–784.

Jangravi, Z. et al., 2013. A fresh look at the male-specific region of the human y

chromosome. Journal of Proteome Research, 12(1), pp.6–22.

Jiang, X. et al., 2019. A homozygous RNF220 mutation leads to male infertility with small-headed sperm. Gene, 688, pp.13–18. Available at: https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.11.074.

Kasak, L. et al., 2018. Bi-allelic Recessive Loss-of-Function Variants in FANCM Cause Non-obstructive Azoospermia. American Journal of Human Genetics, 103(2), pp.200–212. Available at: https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2018.07.005.

Krausz, C. et al., 2013. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: State-of-the-art 2013. Andrology, 2(1), pp.5–19.

Krausz, C. et al., 2012. High Resolution X Chromosome-Specific Array-CGH Detects New CNVs in Infertile Males. PLoS ONE, 7(10).

Krausz, C., Escamilla, A.R. & Chianese, C., 2015. Genetics of male infertility: From research to clinic. Reproduction, 150(5), pp.R159–R174.

Krausz, C. & Riera-Escamilla, A., 2018. Genetics of male infertility. Nature Reviews Urology, 15(6), pp.369–384. Available at: http://dx.doi.org/10.1038/s41585-018-0003-3.

Kumari, A. et al., 2015. Copy number variation and microdeletions of the Y chromosome linked genes and loci across different categories of Indian infertile males. Scientific Reports, 5(November), p.17780. Available at: http://www.nature.com/articles/srep17780.

Leaver, R.B., 2016. Male infertility: an overview of causes and treatment options. Bristish Journal of Nursing, 25(18), pp.35–40.

Li, H. & Durbin, R., 2010. Fast and accurate long-read alignment with Burrows – Wheeler transform. Bioinformatics, 26(5), pp.589–595.

Li, L. et al., 2018. A novel mutation in HAUS7 results in severe oligozoospermia in two brothers. Gene, 639, pp.106–110. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2017.10.014.

Li, L. et al., 2018. DNAH6 is a novel candidate gene associated with sperm head anomaly. Andrologia, 50(4), pp.1–7.

Li, Z. et al., 2015. Excess of rare variants in genes that are key epigenetic regulators of spermatogenesis in the patients with non-obstructive azoospermia. Scientific Reports, 5, pp.1–7.

Lima, A. et al., 2016. Rare DMRT1 regulatory variants in severe spermatogenic failure. , 531(7594), pp.390–394.

Lima, A. et al., 2015. Rare double sex and mab-3-related transcription factor 1 regulatory variants in severe spermatogenic failure. Andrology, 3, pp.825–833.

Lin, C.J. & Barbosa, A.S., 2002. Técnicas de Análise da Regulação da Transcrição Gênica e suas Aplicações na Endocrinologia Molecular. Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia, 46(4), p.11.

Lu, C. et al., 2014. Pathogenic variants screening in five non-obstructive azoospermiaassociated genes. Molecular Human Reproduction, 20(2), pp.178–183.

Macdonald, J. et al., 2018. DMRT1 repression using a novel approach to genetic manipulation induces testicular dysgenesis in human fetal gonads. Human Reproduction, 33(11), pp.2107–2121.

Mafra, F.A. et al., 2011. Chromosomal and molecular abnormalities in a group of Brazilian infertile men with severe oligozoospermia or non-obstructive azoospermia attending an infertility service. International Braz J Urol, 37(2), pp.244–250.

Malikova, J. et al., 2014. Human NR5A1/SF-1 mutations show decreased activity on BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor), an important regulator of energy balance: Testing impact of novel SF-1 mutations beyond steroidogenesis. PLoS ONE, 9(8).

Maor-Sagie, E. et al., 2015. Deleterious mutation in SYCE1 is associated with non-obstructive azoospermia. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, 32(6), pp.887–891.

Margulies, M. et al., 2005. Genome sequencing in open microfabricated high density. Nature, 437(7057), pp.376–380.

Martin, M., 2011. Cutadapt Removes Adapter Sequences From High-Throughput Sequencing Reads. EMBnetjournal, 17(1), pp.10–12.

Martinez, G. et al., 2018. Whole-exome sequencing identifies mutations in FSIP2 as a recurrent cause of multiple morphological abnormalities of the sperm flagella. Human Reproduction, 33(10), pp.1973–1984.

Mckenna, A. et al., 2010. The Genome Analysis Toolkit : A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. Genome Research, 20, pp.1297–1303.

McLaren, W. et al., 2016. The Ensembl Variant Effect Predictor. Genome biology, 17(1), p.122. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27268795%0Ahttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4893825.

Miyamoto, T. et al., 2017. Human male infertility and its genetic causes. Reproductive Medicine and Biology, 16(2), pp.81–88.

Naasse, Y. et al., 2015. Chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in infertile men from Morocco. BMC urology, 15, p.95. Available at: http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=4574444&tool=pmcentrez&rendertype=abstract.

Nakamura, S. et al., 2017. Next-generation sequencing for patients with non-obstructive azoospermia: implications for significant roles of monogenic/oligogenic mutations. Andrology, 5(4), pp.824–831.

Navarro-Costa, P., 2012. Sex, rebellion and decadence: The scandalous evolutionary history of the human Y chromosome. Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Basis of Disease, 1822(12), pp.1851–1863. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.04.010.

Navarro-Costa, P., Gonçalves, J. & Plancha, C.E., 2010. The AZFc region of the Y chromosome: At the crossroads between genetic diversity and male infertility. Human Reproduction Update, 16(5), pp.525–542.

Okano, M. et al., 1999. DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. Cell, 99, pp.247–257.

Okutman, O. et al., 2015. Exome sequencing reveals a nonsense mutation in TEX15 causing spermatogenic failure in a Turkish family. Human Molecular Genetics, 24(19), pp.5581–5588.

Oud, M.S. et al., 2018. Systematic review monogenic causes of male infertility. BioRxiv, 44(0).

Pieri, P.D.C. et al., 2002. A cost-effective screening test for detecting AZF microdeletions on the human Y chromosome. Genetic testing, 6(3), pp.185–194.

Pina-Neto, J. et al., 2006. Somatic cytogenetic and azoospermia factor gene microdeletion studies in infertile men. Brazilian Journal of Medical and Biology Research, 39, pp.555–561.

Riera-Escamilla, A. et al., 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, (Andrology), pp.1–11.

Robay, A. et al., 2018. A systematic review on the genetics of male infertility in the era of next-generation sequencing. Arab Journal of Urology, 16(1), pp.53–64. Available at: https://doi.org/10.1016/j.aju.2017.12.003.

Röpke, A. et al., 2013. Comprehensive sequence analysis of the NR5A1 gene encoding steroidogenic factor 1 in a large group of infertile males. European Journal of Human Genetics, 21(9), pp.1012–1015.

SãoPedro, S.L. et al., 2003. Prevalence of Y chromosome deletions in a Brazilian population of nonobstructive azoospermic and severely oligozoospermic men. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 36(6), pp.787–793.

Sha, Y. et al., 2018. A novel TEX11 mutation induces azoospermia: A case report of infertile brothers and literature review. BMC Medical Genetics, 19(1), pp.1–7.

Sha, Y.W. et al., 2018. TDRD6 is associated with oligoasthenoteratozoospermia by sequencing the patient from a consanguineous family. Gene, 659(March), pp.84–88. Available at: https://doi.org/10.1016/j.gene.2018.03.040.

Simoni, M. et al., 2008. Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Münster experience. Reproductive biomedicine online, 16(2), pp.289–303. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60588-3.

Simoni, M., 2001. Molecular diagnosis of Y chromosome microdeletions in Europe : state-of-the-art and quality control. Human Reprod, pp.402–409.

Skaletsky, H. et al., 2003. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. Nature, 243, pp.825–838.

Suganthi, R. et al., 2014. Y Choromosomal Microdeletion Screening in The Workup of Male Infertility and Its Current Status in India. International Journal of Fertility ans Sterility, 7(4), pp.253–266.

Suganya, J. et al., 2015. Chromosomal Abnormalities in Infertile Men from Southern India. Journal of clinical and diagnostic research : JCDR, 9(7), pp.GC05–10. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26393143\nhttp://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC4572974.

Tewes, A.C. et al., 2014. DMRT1 mutations are rarely associated with male infertility. Fertility and Sterility, 102(3).

Tüttelmann, F. et al., 2011. Copy Number Variants in Patients with Severe Oligozoospermia and Sertoli-Cell-Only Syndrome Frank. PLoS ONE, 6(4), pp.1–11.

Tüttelmann, F. et al., 2007. Symposium : Endocrinology of male reproduction and infertility Gene polymorphisms and male infertility – a meta-analysis and literature review. Reproductive BioMedicine, 15(6), pp.643–658.

Tüttelmann, F., Ruckert, C. & Röpke, A., 2018. Disorders of spermatogenesis. Medizinische Genetik. Available at: http://link.springer.com/10.1007/s11825-018-0181-7.

Tyler-smith, C. & Krausz, C., 2009. The Will-o ' -the-Wisp of Genetics — Hunting for the Azoospermia Factor Gene. N Engl J Med, 360(9), pp.925–927.

Uysal, F., Akkoyunlu, G. & Ozturk, S., 2019. Decreased expression of DNA methyltransferases in the testes of patients with non-obstructive azoospermia leads to changes in global DNA methylation levels. Reproduction, Fertility and Development, pp.1–9.

Visscher, P.M. et al., 2012. Five years of GWAS discovery. American Journal of Human

Genetics, 90(1), pp.7–24. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ajhg.2011.11.029.

Visser, L. et al., 2009. Y chromosome gr/gr deletions are a risk factor for low semen quality. Human Reproduction, 24(10), pp.2667–2673.

Walsh, R. et al., 2014. Paralogue annotation identifies novel pathogenic variants in patients with brugada syndrome and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. Journal of Medical Genetics, 51(1), pp.35–44.

Wang, D.S. et al., 2010. Doublesex- and Mab-3-related transcription factor-1 repression of aromatase transcription, a possible mechanism favoring the male pathway in Tilapia. Endocrinology, 151(3), pp.1331–1340.

Wang, X. et al., 2018. Case study of a patient with cryptozoospermia associated with a recessive TEX15 nonsense mutation. Asian Journal of Andrology, 20, pp.101–102.

Weile, J. & Roth, F.P., 2018. Multiplexed assays of variant effects contribute to a growing genotype – phenotype atlas. Human Genetics, 137(9), pp.665–678.

WHO, 2010. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen 5th ed., Geneva, Switzerland: World Health Organization.

Willard, H.F., 2003. Tales of the Y chromosome. Nature, 423(Genome Biology), pp.810–812.

Wosnitzer, M.S. & Goldstein, M., 2014. Obstructive azoospermia. Urologic Clinics of North America, 41(1), pp.83–95. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.ucl.2013.08.013.

Wu, H. et al., 2019. NovelCFAP43 andCFAP44 mutations cause male infertility with multiple morphological abnormalities of the sperm flagella (MMAF). Reproductive BioMedicine Online, 38(5), pp.769–778. Available at: https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.12.037.

Yan, W. et al., 2004. Haploinsufficiency of kelch-like protein homolog 10 causes infertility in male mice. The National Academy of Sciences of the USA, 101(20), pp.7793–7798.

Yang, F. et al., 2008. Mouse TEX15 is essential for DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis during male meiosis. Journal of Cell Biology, 180(4), pp.673–679.

Yang, Y. et al., 2010. Differential effect of specific gr/gr deletion subtypes on spermatogenesis in the Chinese Han population. International Journal of Andrology, 33(5), pp.745–754.

Yatsenko, A.N. et al., 2006. Non-invasive genetic diagnosis of male infertility using spermatozoal RNA: KLHL 10 mutations in oligozoospermic patients impair homodimerization. Human Molecular Genetics, 15(23), pp.3411–3419.

Yu, X. et al., 2015. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and transmission characteristics in azoospermic and severe oligozoospermic patients. Int J Clin Exp Med, 8(9), pp.14634–14646.

10. APÊNDICE

10.1. PRIMERS UTILIZADOS PARA MUTAGÊNESE E SEQUENCIAMENTO

PRIMERS MUTAGENESE		
GENE/ MUTAÇÃO	**PRIMERS FOWARD**	**PRIMERS REVERSE**
NR5A1 (NM_004959.4)		
c.104_105delGCinsAA_p.Gly35Glu	GTGTGAGAGCTGCAAGGAATTCTTCAAGCGCACGG	CCGTGCGCTTGAAGAATTCCTTGCAGCTCTCACAC
c.437G>C_p.Gly146Ala	CCCAGCCTGCATGCGCCTGAGCCCAAG	CTTGGGCTCAGGCGCATGCAGGCTGGG
c.493G>C_p.Gly165Arg	CACTGGGCGACTTTCGGGCCCCAGCAC	GTGCTGGGGCCCGAAAGTCGCCCAGTG
c.712G>A_p.Asp238Asn	GAGCCGGATGAGAACCAGGTGCGGGC	GCCCGCACCTGGTTCTCATCCGGCTC
c.769G>A_p.Asp257Asn	CAAAAGCCGCCCCAACCAGCCGGCG	CGCCGGCTGGTTGGGGCGGCTTTTG
c.968T>C_p.Ile323Thr	CAAGGAGGGCAGCACCCTGCTGGTCACC	GGTGACCAGCAGGGTGCTGCCCTCCTTG
c.1079C>T_p.Ala360Val	GCTGCAGCTGCTTGTGCTGCAGCTGGACC	GGTCCAGCTGCAGCACAAGCAGCTGCAGC
c.1379A>C_p.Gln460Pro	CTGCAAGCCAAGCAGACTTGAGCCTGGGCCG	CGGCCCAGGCTCAAGTCTGCTTGGCTTGCAG
DMRT1 (NM_021951.2)		
c.308A>G_p.Lys103Arg	GCGACTGCCAGTGCAGGAAGTGCAACCTGATC	GATCAGGTTGCACTTCCTGCACTGGCAGTCGC
c.344T>A_p.Met115Lys	GCAGCGCGTGAAGGCCGCGCAGGTG	CACCTGCGCGGCCTTCACGCGCTGC
c.671A>G_p.Asn224Ser	CCTTATTACAACAGTCTATACAACTGCCCGCAGTAC	GTACTGCGGGCAGTTGTATAGACTGTTGTAATAAGG
c.991G>C_p.Asp331His	CCGCCCAGCAGTCAACATTCTGGCTTGGTTTC	GAAACCAAGCCAGAATGTTGACTGCTGGGCGG

PRIMES SEQUENCIAMENTO DOS INSERTOS	
GENE/ POSIÇÃO (cDNA)	
NR5A1 (NM_004959.4)	
pcDNA3.1_NR5A1_350F	GCAAGATCGACAAGACGCAGC
pcDNA3.1_NR5A1_732F	GCTACCTCTACCCTGCCTTTC
pcDNA3.1_NR5A1_864F	CATCCTGCAGCTGCTGCAG
pcDNA3.1_NR5A1_997F	CCAGACCTTCATCTCCATCGTG
pcDNA3.1_NR5A1_1360F	GACGCTCAGGAGAAGGCC
pcDNA3.1_NR5A1_1822F	GGTGGCTGTTAACCACCC
pcDNA3.1_NR5A1_2313F	CCAGGCTGGTATTTATCTGCAAGG
DMRT1 (NM_021951.2)	
pcDNA3.1_DMRT1 _c.445F	CTGCCAGTGCAAGAAGTGC
pcDNA3.1_DMRT1 _c.944F	GCCTGGTCAGACAGGAAACC
pcDNA3.1_DMRT1 _c.1437	CTTTAGGGTCCGTGACTACCATC
pcDNA3.1_DMRT1 _c.1922	GACCTTAGTGATGCAGAGTTCCTG

PRIMES SEQUENCIAMENTO DOS VETORES PLASMIDIAIS	
VETOR/ POSIÇÃO (cDNA)	
pcDNA3.1_insF	TAATACGACTCACTATAGGG
pcDNA3.1_insR	TAGAAGGCACAGTCGAGG
pGL4.74_hRluc_270F	GAGTGTGACCTTTTCGGTCTG
pGL4.74_hRluc_518F	GAGGGACTGCAGGAGCTTC

pGL4.74_hRluc_1052F	GAATGGGTAAGTCCGGCAAG
pGL4.74_hRluc_1588F	CCTGGGTTCTTTTCCAACGC
pGL4.74_hRluc_2119F	GCAACTCGTAGGACAGGTG
pGL4.74_hRluc_2660F	CGACTTATCGCCACTGGC
pGL4.74_hRluc_3192F	CCGTCGTGTAGATCACTACG
pGL4.74_hRluc_3732F	CTATACGGGACAACACCGC
pGL4.74_hRluc_4198F	CTGTCCCCAGTGCAAGTG
pGL4.10_luc2_168F	GAGCAGCTGCACAAAGCC
pGL4.10_luc2_559F	GCAAGACCGACTACCAGG
pGL4.10_luc2_1114F	GCTACGGCCTGACAGAAAC
pGL4.10_luc2_1672F	GACTGACCGGCAAGTTGG
pGL4.10_luc2_2249F	GAATCAGGGGATAACGCAGG
pGL4.10_luc2_2828F	GTTGGTAGCTCTTGATCCGG
pGL4.10_luc2_3401F	CGCCAGTGAGTAGTTTCCG
pGL4.10_luc2_3940F	GCAAAGAAGGGAATGAGTGCG
pGL4.10_luc2_4215F	CAAGTGCAGGTGCCAGAAC

10.2. ARTIGO SUBMETIDO À REVISTA ANDROLOGY

ANDROLOGY

Sequence analysis of 37 candidate genes for male infertility: Challenges in variant assessment and validating genes

Journal:	*Andrology*
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Original Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Fenz Araujo, Thaís; University of Sao Paulo, Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School Friedrich, Corinna; University of Münster, Institute of Human Genetics Paiva Grangeiro, Carlos ; University of Sao Paulo, Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School Martelli, Lucia ; University of Sao Paulo, Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School Emich, Jana; University of Münster, Institute for Human Genetics Wyrwoll, Margot; University of Münster, Institute for Human Genetics Kliesch, Sabine; University Hospital Münster Centre of Reproductive Medicine and Andrology, Department of Cllinical and Surgical Andrology Simões, Aguinaldo ; University of Sao Paulo, Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School Tüttelmann, Frank; University of Münster, Institute of Human Genetics
Major Area:	Both
Clinical:	Genetics
Basic Science:	Pathology
Specific Topics:	Genetic disorders, Spermatogenesis, Gene expression, mutations and polymorphisms

SCHOLARONE™
Manuscripts

Andrology - Basic research article

Sequence analysis of 37 candidate genes for male infertility: Challenges in variant assessment and validating genes

Thais Fenz Araujo[1*], Corinna Friedrich[2*], Carlos Henrique Paiva Grangeiro[1], Lucia Regina Martelli[1], Jana Emich[2], Margot Julia Wyrwoll[2], Sabine Kliesch[3], Aguinaldo Luíz Simões[1], Frank Tüttelmann[2]

[1]Department of Genetics, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo (USP), Ribeirão Preto, SP, Brazil, [2]Institute of Human Genetics, University of Münster, Münster, Germany, [3]Centre of Reproductive Medicine and Andrology, Department of Clinical and Surgical Andrology, University Hospital Münster, Münster, Germany

*these authors contributed equally to the study and should be considered joint first authors

Short title: Challenges in validating male infertility genes

Key words: male infertility, non-obstructive azoospermia, whole exome sequencing, candidate genes

*Corresponding author: Corinna.Friedrich@ukmuenster.de

Address: Institute of Human Genetics, University of Münster, Vesaliusweg 12-14, 48149 Münster, Germany

Word count: abstract 299, text 4276

Abstract

Background: The routine genetic analysis for diagnosing male infertility has not changed over the last twenty years, and currently available tests can only determine the etiology of 4% of unselected infertile patients. Thus, to create new diagnostic assays, we must better understand the molecular and genetic mechanisms of male infertility. Although next generation sequencing allows for simultaneous analysis of hundreds of genes and the discovery of novel candidates related to male infertility, so far only a few gene candidates have enough sound evidence to support the gene–disease relationship.

Objective: Since complementary studies are required to validate genes, we aimed to analyze the presence of potentially pathogenic rare variants in a set of candidate genes related to azoospermia in a hitherto understudied South American population.

Subjects and Methods: We performed whole exome sequencing in a group of 16 patients with non-obstructive azoospermia from Ribeirão Preto, Brazil. Based on a recent systematic review of monogenic causes of male infertility, we selected a set of 37 genes related to azoospermia, Sertoli-cell-only syndrome and spermatogenic arrest to analyze. The identified variants were confirmed by Sanger sequencing, and their functional consequence was predicted by *in silico* programs.

Results: We identified potential pathogenic variants in seven genes in six patients. Two variants, c.671A>G (p.Asn224Ser) in *DMRT1* and c.91C>T (p.Arg31Cys) in *REC8*, have already been described in association with azoospermia. We also found new variants in genes that already have moderate evidence of being linked to spermatogenic failure (*TEX15*, *KLHL10*), in genes with limited evidence (*DNMT3B*, *TEX14*) and in one novel promising candidate gene that has no evidence so far (*SYCE1L*).

Discussion: Although this study included a small number of patients, the process of rationally selecting genes allowed us to detect rare potentially pathogenic variants, providing supporting evidence for validating candidate genes associated with azoospermia.

Introduction

Male infertility is a multifactorial condition associated with variable phenotypes, and it affects approximately 7% of men worldwide (Krausz *et al.*, 2018). Diagnosing this condition is difficult not only because several environmental and genetic factors interfere with spermatogenesis (Cocuzza *et al.*, 2013), but also because of social taboos. In some countries of Africa, men unable to father children are so marginalized that some may even commit suicide (Zarrabi *et al.*, 2018). Moreover, a man is usually only analyzed after the woman has undergone an extensive workup (Cocuzza *et al.*, 2013).

The cornerstone of male infertility diagnostics is semen analysis, which evaluates sperm number, motility and morphology following World Health Organization (WHO) guidelines (WHO, 2010). The most severe phenotype of male infertility is non-obstructive azoospermia (NOA), characterized by the absence of spermatozoa in the ejaculate even after centrifugation. In men with NOA, testicular biopsy reveals histological variations, including Sertoli cell-only syndrome (SCOS), maturation arrest at any stage of spermatogenesis and mixed testicular atrophy. These variations in histopathology might be a consequence of the complex process that regulates spermatogenesis (Gershoni *et al.*, 2017).

Among several possible etiologies, those of genetic origin may be transmitted to one's offspring if a child can be conceived, e.g. by assisted reproduction. Therefore, genetic screening is relevant not only because of its diagnostic value but also for its potential prognostic value for clinical decision-making and appropriate genetic counselling (Kumari *et al.*, 2015; Belva *et al.*, 2016; Krausz *et al.*, 2018). Since Klinefelter syndrome and other chromosomal aberrations are the major genetic causes of male infertility, the first genetic examination performed is karyotype analysis. This exam detects numerical chromosomal abnormalities, mosaicisms, and some structural chromosomal abnormalities. Patients with severe oligozoospermia ($<5 \times 10^6$ sperm per mL semen) or azoospermia usually undergo molecular analysis to identify AZF deletions on chromosome Y (Krausz *et al.*, 2013). Beyond these genetic examinations, gene sequencing in a clinical setting is currently only performed in the very rare condition of hypogonadotropic hypogonadism or in men with congenital bilateral absence of vas deferens (CBAVD) (Tüttelmann *et al.*, 2018).

This routine diagnostic workup has not changed over the last twenty years, and the currently available genetic tests can only determine the etiology of 4% of unselected infertile men and

20% of azoospermic men (Tüttelmann *et al.*, 2018). Thus, developing new diagnostic assays requires understanding the molecular and genetic mechanisms of male infertility.

Determining the genetic component of male infertility is difficult because >2,000 genes are involved in human spermatogenesis (Krausz *et al.*, 2015). Since the late 1990s, an intense search has been underway to identify genetic risk factors of male infertility via associations with single nucleotide polymorphisms (SNP) and copy number variation (CNV) (Krausz *et al.*, 2015). Despite the more than 300 SNPs distributed in 123 genes reported to be associated with male infertility (Krausz *et al.*, 2015) and some CNVs (Nakamura *et al.*, 2017; Krausz *et al.*, 2012; Tüttelmann *et al.*, 2011), most data remain controversial, as patients' ethnic and geographical origin seem to influence the phenotypic expression of these genomic variations (Krausz *et al.*, 2015; Krausz *et al.*, 2018)

A relatively novel approach to identify potential pathogenic genes is next generation sequencing (NGS), which allows for rapid and cost-effective sequencing of whole exomes or genomes. As such, this approach can help identify novel genetic factors in different complex diseases, including male infertility (Krausz *et al.*, 2018). In fact, whole exome sequencing (WES) has already been employed to identify novel genes related to the phenotype of non-obstructive azoospermia in humans (Fakhro *et al.*, 2018; Gershoni *et al.*, 2017), but the number of genes that can be confidently linked to this condition is still low (Oud *et al.*, 2019). Without stronger evidence, some findings may lead to distorted conclusions, resulting in inappropriate subsequent research or false understanding of genetic pathways (Oud *et al.*, 2019).

Although several variants in numerous genes have been described in association with male infertility, few studies have been independently validated or have provided functional evidence that the variants identified are pathogenic. Furthermore, only a fraction the identified genes have supporting biological evidence (e.g. a knockout mouse model showing male infertility) (Tüttelmann *et al.*, 2018). Regarding genes that do fulfil multiple levels of evidence for an association with male infertility, an unstructured assessment reportedly found three: *NR5A1*, *DMRT1*, and *TEX11* (Tüttelmann *et al.*, 2018). Very recently, an extensive literature review and structured clinical validity assessment of a large number of genes showed that only a few have "strong" evidence of being associated with male infertility, while many more have "moderate" or "limited" evidence (Oud *et al.*, 2019).

Since studies in male infertility are still lacking (Barratt *et al.*, 2017), our objective was to analyze the presence of rare, potentially pathogenic variants in a set of candidate genes associated with non-obstructive azoospermia and provide evidence for their clinical validity.

Subjects and methods

Ethical approval

This study was conducted in accordance with the ethical standards of the involved institutions. Written informed consent for genetic testing was obtained from all subjects participating, according to the approved Ethics Committee of the Hospital das Clínicas of Ribeirão Preto (reference number HCRP_n°8715/2013), and Ethics Committee of the State Medical Board and the Medical Faculty Münster (Kennzeichen 2010-578-f-S).

Patients

The study group consisted of 16 unrelated infertile patients, below 45 years of age at first evaluation, seeking advice for couple infertility at Human Reproduction Division of Hospital das Clínicas of Ribeirão Preto (HCRP, Brazil). These patients were recruited in a previous study (Grangeiro, 2018) and all presented non-obstructive azoospermia, according to WHO (WHO, 2010), and their normal routine diagnostic workups included GTG-banding with exclusion of chromosomal mosaicism (Hook, 1977) and AZF-deletions according to the EAA and EMQN protocol (Krausz *et al.*, 2013). Clinical information regarding these patients is summarized in Table 1. According to the testicular biopsy, six patients had SCOS and six had germ cell maturation arrest. Four patients did not undergo testicular biopsy.

We excluded patients showing characteristics known to be associated with male infertility phenotype, such as (1) endocrinopathy (hypogonadotropic hypogonadism, hyperprolactinemia, hyper/hypothyroidism, use of anabolic steroids); (2) pathologies or procedures that affect the production of spermatozoa (chemo- or radiotherapy, traumatic or infectious orchitis, varicocele (≥ grade II), bilateral cryptorchidism); or (3) post-testicular dysfunctions (erectile dysfunction / loss of libido / anorgasmia, retrograde ejaculation / anejaculation, congenital absence of the vas deferens, vasectomy, mechanical obstruction resulting from trauma or infection).

The control group consisted of 17 unrelated healthy men below 45 years attending the Centre of Reproductive Medicine and Andrology (CeRA) in Münster, Germany. They presented normal semen parameters according to WHO criteria (WHO, 2010).

Whole exome sequencing and bioinformatic analysis

Genomic DNA was isolated from peripheral blood according to standard procedures and as described previously (Röpke *et al.*, 2013). For WES, samples were prepared and enriched according to the protocol of Agilent's SureSelect^{QXT} Target Enrichment for Illumina Multiplexed Sequencing Featuring Transposase-Based Library Prep Technology (Agilent). The libraries were index tagged using appropriate pairs of index primers for multiplexed sequencing. To capture libraries, SureSelect^{XT} Human All Exon V6 was used. Quantity and quality of the libraries were determined with Agilent's TapeStation 2200, and the final concentration was adjusted to 1.6 pM. Sequencing was performed on the Illumina NextSeq® 500 System using the NextSeq 500 V2 High-Output Kit (300 cycles).

After trimming, the remaining adapter sequences and primers were removed with Cutadapt v1.15 (Martin, 2011). Sequence reads were aligned against the reference genome GRCh37.p13 using BWA Mem v0.7.17 (Li *et al.*, 2010). Duplicate reads and reads that mapped to multiple locations in the genome were excluded from further analysis. Single nucleotide variations and small insertions/deletions (Indels) were identified and quality-filtered using GATK toolkit v3.8 with haplotype caller, according to the best practice recommendations (McKenna *et al.*, 2010). Briefly, haplotype caller performs local de novo assembly in active regions and calculates haplotype likelihoods at potential variant sites. Resulting variants were annotated with *Ensembl* Variant Effect Predictor (Mclaren *et al.*, 2016).

Selection of genes for analysis

Initially, we analyzed the WES data for the three genes *NR5A1*, *DMRT1* and *TEX11* from our unstructured assessment (Tüttelmann *et al.*, 2018). Subsequently, we selected a set of genes based on a systematic review that established the clinical validity of candidate genes related to male infertility (Oud *et al.*, 2019). We considered all genes with definitive, strong, moderate and limited evidence of monogenetic association with male infertility and selected those

leading to the phenotypes presented by our patients, such as NOA, SCOS and germ cell maturation arrest (see Suppl. Table 1).

Variant filtering

We filtered for coding variants with potentially severe consequences for protein function - namely those affecting splice sites (donor/acceptor), start loss, stop gain, frameshift and missense. In order to rule out common polymorphisms, we excluded all variants with a frequency higher than 0.05 in any subpopulation in the Exome Sequencing Project (ESP, https://evs.gs.washington.edu/EVS/), 1000 Genomes Browser (http://phase3browser.1000genomes.org/index.html) and the genome aggregation database gnomAD (https://gnomad.broadinstitute.org/) (modified from Riera-Escamilla *et al.*, 2019). For genes associated with autosomal dominant inheritance or linked to X- and Y-chromosomes, we excluded variants with a frequency above 0.01. For missense variants, we excluded those not predicted to be pathogenic by all any of the *in silico* programs considered: SIFT, PolyPhen-2, MutationTaster and CADD (score <10). We also excluded variants present in normozoospermic controls for autosomal-dominant and X-linked genes as well as single variants present in genes associated with autosomal recessive inheritance.

Confirmation of variants with Sanger sequencing

All variants remaining after filtering were confirmed by Sanger sequencing as described previously (Tewes *et al.*, 2014). The primers used for DNA amplification are shown in Suppl. Table 2.

Results

In our set of 37 candidate genes (Suppl. Table 1), we identified 35 variants in the group of 16 Brazilian NOA patients. Applying further selection criteria, we excluded 16 single recessive variants, three combinations of recessive variants without prediction of pathogenicity, one dominant variant with a frequency of 0.023 in the general population, and two dominant variants also found in normozoospermic men from the control group. Along with six variants predicted as pathogenic, we considered three variants with uncertain prediction of pathogenicity (concomitant classification as benign and deleterious) and one predicted as

benign in *TEX15* gene (c.5969G>A). Hence, ten missense variants in seven candidate genes remained for subsequent in-depth assessment (Table 2).

We chose to report the heterozygous variant c.5969G>A in ***TEX15***, despite it being predicted as benign, because it was found in combination with another heterozygous variant (c.8074G>A), predicted as deleterious (Table 2). Moreover, *TEX15* has moderate evidence of association with male infertility (Oud *et al.*, 2019). Hence, we report a potentially compound heterozygous patient (M1804) (Fig. 1A) that, in contrast to previous reports, is affected by azoospermia due to SCOS. This patient also presents mildly increased FSH levels (Table 1).

Two heterozygous variants in the gene ***TEX14***, c.727C>G and c.4297G>A, were identified in another potentially compound heterozygous patient (M1810) (Fig. 1B). This man presented germ cell maturation arrest in the testicular histology and normal hormonal parameters, comparable to patients with missense variants in *TEX14* previously reported (Fakhro *et al.*, 2018).

A single variant was identified in the gene ***REC8***, c.91C>T, predicted to lead to an amino acid substitution p.(Arg31Cys), in an azoospermic patient with normal hormonal parameters (Patient M1809) (Fig. 1C). Despite the scarcity of studies in humans (Oud *et al.*, 2019), the same variant was previously described in a patient with NOA, although then it was not considered relevant for male infertility (Griffin *et al.*, 2009; Hann *et al.*, 2011). In the same patient, we identified a potentially pathogenic homozygous variant (c.22C>G) in the gene ***SYCE1L*** (Fig. 1C) during the analysis of its paralogue *SYCE1*. The *SYCE1L* gene has no evidence of association with infertility so far (Oud *et al.*, 2019), but variants in *SYCE1* have been described in azoospermic brothers presenting NOA due to meiotic arrest (Maor-Sagie *et al.*, 2015).

Two single variants were found in the gene ***KHLH10***. The variant c.887T>C was identified in patient M1816 (Fig. 1D), who presented SCOS and increased FSH levels, while c.242A>T was identified in patient M1811 (Fig. 1E), who presented NOA, increased FSH levels but who unfortunately did not have biopsy results. So far, missense and splice variants in *KHLH10* have only been described in association with oligozoospermia in humans (Yatsenko *et al.*, 2006; Miyamoto *et al.*, 2016) and not in the context of azoospermia or SCOS as observed in this study (Patients M1816 and M1811).

Patient M1816 also carries a variant in the gene ***DMRT1*** (c.671A>G) (Fig. 1D). Although both variants (c.887T>C in *KLHL10*, c.671A>G in *DMRT1*) have a higher prevalence than

our initial threshold of 0.01 in the general population, we included them because they were close to the limit (0.0102 and 0.0124, respectively). Furthermore, the variant c.671A>G was previously described in two patients with SCOS (Tewes *et al.*, 2014).

A single heterozygous variant, c.2452G>A, was identified in the gene ***DNMT3B*** in a patient with NOA and increased FSH levels (Patient M1814) (Fig. 1F). Despite limited evidence of an association with male infertility (Oud *et al.*, 2018), rare missense variants within this gene have been described in patients with NOA (Li *et al.*, 2015).

Discussion

Regardless of the social factors hindering it, diagnosing male infertility is an enormous challenge because it is a complex, multifactorial condition resulting in heterogeneous phenotypes and involving thousands of genes (Tüttelmann *et al.*, 2018). Moreover, once a deleterious mutation in a reproduction-related gene directly affects fitness, it tends to remain in the population at low frequencies, such that researchers must screen multiple genes in a large group of patients to find novel candidates genes (Oud *et al.*, 2019).

Testing multiple genes in multiple patients is now feasible as genomics has advanced and next generation sequencing is available. Concerning idiopathic spermatogenic failure, WES has previously been successfully employed to identify novel candidate genes (Fakhro *et al.*, 2018; Gershoni *et al.*, 2017). However, the interpretation of genetic data is not simple, because most candidate genes have been found via mutations in single patients or single families, as is expected in the search for rare variants (Oud *et al.*, 2019). Moreover, the amount of new variants identified by NGS exceeds researchers' capacities to perform functional studies, which makes it difficult to distinguish between variants that cause disease from variants that are rare but benign (Walsh *et al.*, 2014). Thus, independent genetic studies and functional studies are necessary to provide robustness to the clinical validity of candidate genes linked to male infertility (Oud *et al.*, 2019).

The present study provides evidence for the clinical validity of some genes associated with azoospermia. Among 37 genes analyzed, we found variants in seven. We attribute our success of finding variants, even in a small number of patients, to the rational selection of candidate genes to analyze. Briefly, we considered only highly penetrant genes that exclusively affect fertility, and we selected those linked to the phenotypes presented by our patients by only considering genes with evidence of association to male infertility. To minimize the chance of

finding benign variants, we considered only those with severe consequences, such as start loss, splicing, frameshift and missense. We excluded common variants with allele frequencies higher than 0.05 in general population, and we selected those predicted as pathogenic and that were absent in the control group. With this approach, we identified potentially pathogenic variants in six of sixteen non-related Brazilian patients with NOA (~38%). This is the first comprehensive screening of South-America NOA men.

Two heterozygous variants, c.8074G>A(;)5969G>A, were identified in patient M1804, in ***TESTIS EXPRESSED GENE 15*** (***TEX15***, OMIM 605795). This gene, exclusively expressed in testis, is essential for DNA double-strand break repair in germ cells, ensuring normal chromosome synapsis and meiotic recombination during spermatogenesis (Wang *et al.*, 2018; Yang *et al.*, 2008). In mice, mutations in this gene cause drastic reductions in testis size and meiotic arrest (Yang *et al.*, 2008), whereas in humans, variants are associated with severe oligozoospermia, cryptozoospermia and NOA due to maturation arrest (Colombo *et al.*, 2017; Okutman *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018). However, so far, no variants in *TEX15* have been reported in SCOS patients (Colombo *et al.*, 2017; Okutman *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018). Although compound heterozygous patients have been reported (Colombo *et al.*, 2017), most variants described in literature were nonsense and were found in homozygosis (Okutman *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2018). Of the *TEX15* variants we identified, one of the variants, c.5969G>A, was considered benign by four prediction programs and is relatively prevalent in the general population (0.0257). Moreover, as we did not have DNA samples from the parents to perform segregation analysis, we could not confirm if the variants were on different alleles. Thus, for now, the diagnostic value of both variants is uncertain. Considering the moderate evidence that *TEX15* is associated with male infertility (Oud *et al.*, 2019), it would be worthwhile to perform *in vitro* functional studies to confirm these variants' pathogenicity.

Additionally, two variants, c.727C>G(;)4297G>A, were identified in another probably compound heterozygous patient (M1810) in ***TESTIS EXPRESSED GENE 14*** (***TEX14***, OMIM 605792). In this case, both variants were predicted as damaging. Studies in mice have shown that *TEX14*, exclusively expressed in the testis, is required for the formation of intercellular bridges and subsequent cell division of germ cells. In its absence, the spermatogonia do not complete the first cytokinesis (Greenbaum *et al.*, 2006), which explains the germ cell maturation arrest phenotype presented by our patient. Missense variants in *TEX14* have already been described in azoospermic brothers presenting maturation arrest

(Fakhro *et al.*, 2018), while a homozygous splice site variant was identified in a patient with SCOS (Fakhro *et al.*, 2018), and frameshift variants were associated with both phenotypes (Fakhro *et al.*, 2018; Gershoni *et al.*, 2017). Therefore, we assume that the missense variants we found are probably causative for the infertility in patient M1810, reinforcing the evidence that mutations in *TEX14* may be responsible for many NOA cases.

In patient M1816, who presented SCOS and increased FSH levels, we identified potentially damaging variants in two different genes (***DMRT1*** and ***KLHL10***), hampering our ability to define the causal factor of azoospermia. ***DOUBLESEX- AND MAB3-RELATED TRANSCRIPTION FACTOR 1*** *(DMRT1*; OMIM 602424) is a conserved sex-determination transcription factor that regulates genes in Sertoli cells and pre-meiotic germ cells during postnatal testis differentiation (Macdonald *et al.*, 2018). ***KELCH HOMOLOG 10*** *(KLHL10*; OMIM 615081) is a highly evolutionarily conserved gene in mammals, exclusively expressed in the cytoplasm of spermatids. Its haplo-insufficiency causes a block in the elongation stage of spermiogenesis in mice, leading to asynchronous spermatid maturation (Yan *et al.*, 2004). Deletions and missense mutations in *DMRT1* are associated with a wide spectrum of phenotypes, from XY gonadal dysgenesis to disorders of spermatogenesis such as cryptozoospermia, SCOS and meiotic arrest (Tüttelmann *et al.*, 2018; Lima *et al.*, 2015; Tewes *et al.*, 2014). The same variant we found, c.671A>G, has already been reported in two patients with SCOS (Tewes *et al.*, 2014), whereas missense and splicing variants in *KLHL10* have only been associated with oligozoospermia in humans (Yatsenko *et al.*, 2006; Miyamoto *et al.*, 2016). Hence, we assume that the variant c.671A>G in *DMRT1* is causative of SCOS in patient M1816, reinforcing the association of this gene with male infertility. However, we cannot rule out the possibility that the variant c.887T>C in *KLHL10* also plays a role in the man's infertility. We report a second NOA patient carrying the potentially pathogenic missense variant c.242A>T in *KLHL10* (Patient M1811). This adds to the list of variants in *KLHL10* which may be associated with male infertility and suggests that they may also be responsible for NOA in humans, because the haplo-insufficiency of this gene disturbs the maturation of germ cells in mice.

A variant predicted as deleterious, c.2452G>A, was identified in ***DNMT3B***, in patient M1814, who presented azoospermia and increased FSH levels. ***DNA METHYLTRANSFERASE 3 Beta*** (*DNMT3B*) encodes a *de novo* methyltransferase that establishes DNA methylation and, therefore, is classified as an epigenetic regulator of spermatogenesis (Okano *et al.*, 1999). *DNMT3B* is predominantly expressed in spermatogonia

and spermatocytes. Recently, it was demonstrated that expression of *DNMT* proteins differs in spermatogenic cell types among NOA groups of patients, including those presenting hypospermatogenesis, round spermatid arrest, spermatocyte arrest and SCOS. Decreased expression of these proteins causes changes in global DNA methylation levels in spermatogenic cells, which may contribute to the development of male infertility in NOA patients (Uysal *et al.*, 2019). Based on these functional studies and considering that missense variants have already been described in patients with NOA (Li *et al.*, 2015), we presume that the variant we found plays a role in the azoospermia of patient M1814. Also, as ours is the second study reporting potentially pathogenic variants in *DNMT3B* in NOA patients (Oud *et al.*, 2019), we offer more evidence supporting the association of this gene with male infertility.

Like *DNMT3B*, ***RECOMBINATION PROTEIN 8*** (***REC8***, GCID:GC14P024171) has limited evidence of association with male infertility (Oud *et al.*, 2019). This gene encodes a specific component of the cohesin axis needed for assembly of the synaptonemal complex (SC) (Fukuda *et al.*, 2014); the SC binds sister chromatids, preventing their local separation, thus assuring genetic exchange by crossing over and subsequent accurate segregation of homologous chromosome during meiosis (Ishiguro *et al.*, 2016; Agostinho *et al.*, 2016). While functional studies have reported *REC8*'s important role during meiosis, they have failed to identify causal mutations (Hann *et al.*, 2011)**.** Coincidentally, the same variant we found in patient M1809, c.91C>T, has already been reported in a single patient with NOA (Griffin *et al.*, 2009). When this variant was described, it was considered as polymorphism due to its high frequency of 0.5 in the European population (Griffin *et al.*, 2009) but, according to ESP, 1000genomes and gnomAD, its maximum population frequency is 0.005. As it is indeed a rare variant, described for the second time in a patient with NOA, we suppose this is a causal variant of male infertility.

We also identified in patient M1809 a homozygous variant, c.22C>G, in ***SYCE1L***. It is assumed that the ***SYNAPTONEMAL COMPLEX CENTRAL ELEMENT PROTEIN 1 LIKE*** **gene** (*SYCE1L*, GID: GC16P077233) has similar functions to its paralogue *SYCE1* (OMIM 611486) (https://www.uniprot.org). *SYCE1* is one of the central components of the SC, which is formed by lateral, transverse and central elements in mammals (Gómez-H *et al.*, 2016). Disruption of *SYCE1* also leads to infertility in mice due to failure in the SC formation and, consequently, meiosis arrest (Dunne *et al.*, 2019). The variant c.22C>G found in *SYCE1L* is predicted as pathogenic, but it has a relatively high frequency in the general

population (0.0386). Although mutations in this gene have not yet been reported, mutations in the paralogue, *SYCE1*, have been described in azoospermic brothers presenting meiotic arrest (Maor-Sagie *et al.*, 2015). Therefore, according to the "paralogue annotation" principle (Walsh *et al.*, 2014), we hypothesize that mutations in *SYCE1L* can also cause azoospermia. From this perspective, we think *SYCE1L* should be considered in further investigations of male infertility. Taken together, for patient M1809, the plausible causative variant of NOA is c.91C>T, identified in the *REC8* gene, but the variant in *SYCE1L* might produce a synergistic effect, as both genes are closely related and are required for correct formation of the synaptonemal complex during meiosis.

In conclusion, we analyzed 37 candidate genes for male infertility in the first WES study of 16 unrelated NOA patients from Brazil and identified variants in seven genes. One candidate gene, *DMRT1*, is already known to play a critical role in spermatogenesis, and the variant we found, c.671A>G, has previously been described in NOA patients. Another variant, c.91AC>T in the *REC8* gene, has also been described in an NOA patient, but the literature regarding this gene is still rare. Moreover, we identified new variants in two genes, *KLHL10* and *TEX15*, with moderate evidence of their association with spermatogenic failure, and in two genes, *DNMT3B* and *TEX14*, with limited evidence. In addition, we described, for the first time, a homozygous variant in *SYCE1L*, which might be a novel candidate gene for male infertility. Even though our study included a small number of patients, the rational selection of genes allowed us to detect rare potentially pathogenic variants, providing supporting evidence to validate candidate genes associated with azoospermia.

Acknowledgements

The authors thank all the patients who participated in this study and the physicians from Human Reproduction Division of Hospital das Clínicas of Ribeirão Preto (HCRP, Brazil) and the Centre of Reproductive Medicine and Andrology (Münster, Germany) who took care of them. We gratefully acknowledge Carolin Ruckert, Christina Burhöi and Nils Köckerling for the technical support, Dr. Albrecht Röpke for his scientific advice and Christian Ruckert for the great support in bioinformatic concerns.

Funding

This study was supported by CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de nível Superior, Brazil. Process number: 88881.186971/2018-01) and was carried out within the frame of the DFG Clinical Research Unit 'Male Germ Cells: from Genes to Function' (CRU326, grants TU298/4-1 and TU298/5-1 to FT).

Conflict of interest

The authors declared no conflict of interest.

Author contributions

TFA designed and performed the research, analyzed data and wrote the manuscript. CF designed and supported the research study and contributed to writing the manuscript. CHPG and LRM selected the azoospermic patients and performed the infertility protocol that includes physical examination, blood collection, cytogenetic analysis, AZF exclusion, and further clinical assessment. JE and MJW contributed with data analysis and lab work. SK selected the normozoospermic patients and collected their blood samples and clinical information. ALS assisted in the design of the study and correction of the manuscript. FT supervised the study, provided financial support and essential reagents. All authors revised and approved the final version of the manuscript.

Table 1. Clinical and routine genetic characterization of NOA patients.

ID: Identity, FSH: Follicle-stimulating hormone, LH: Luteinizing hormone, AZF: azoospermia factor, SCOS: Sertoli cell-only syndrome, Mat.A: germ cell maturation arrest. Hormone values outside the normal range are marked in bold.

Patient ID	Age (years)	Testosterone ng/mL (2.49-8.36)	FSH mIE/mL (<7.6)	LH mIE/mL (1.7-8.6)	Karyotype (GTG banding)	AZF deletions	Testicular histology
M1802	34	3.18	**16.7**	8.1	46, XY[100]	Negative	SCOS
M1803	33	4.20	3.7	2.0	46, XY[50]	Negative	Mat.A
M1804	32	6.81	**7.7**	3.0	46, XY[50]	Negative	SCOS
M1805	29	3.92	**23**	7.9	46, XY[50]	Negative	SCOS
M1806	35	**1.83**	**13.1**	4.2	46, XY[50]	Negative	SCOS
M1807	33	3.95	3.2	**1.0**	46, XY[50]	Negative	-
M1808	30	4.11	**21**	6.7	46, XY[50]	Negative	Mat.A
M1809	24	4.80	4.3	5.0	46, XY[50]	Negative	-
M1810	31	2.96	1.7	2.6	46, XY[50]	Negative	Mat.A
M1811	39	3.25	**19.7**	6.5	46, XY[100]	Negative	-
M1812	34	3.05	**11.5**	5.9	46, XY[50]	Negative	Mat.A
M1813	37	5.20	**7.7**	2.8	46, XY[50]	Negative	Mat.A
M1814	34	4.45	**7.7**	2.7	46, XY[50]	Negative	-
M1815	26	3.20	**9.4**	3.7	46, XY[100]	Negative	Mat.A
M1816	36	3.00	**17.5**	6.5	46, XY[50]	Negative	SCOS
M1817	31	3.50	**10.1**	5.5	46, XY[50]	Negative	SCOS

Table 2: Variants identified by WES and confirmed by Sanger sequencing.

ID: Patient Identity, Inh: inheritance pattern, SCOS: Sertoli cell-only syndrome, Mat.A: germ cell maturation arrest, AD: autosomal dominant inheritance, AR: autosomal recessive inheritance, 1/0: variant found in heterozygous status, 1/1: variant found in homozygous status, B: benign prediction, P: possibly or probably pathogenic, T: tolerated, D: deleterious or damaging, N: neutral. [1]ESP, 1000 Genomes, gnomAD. *Dominant variants with frequency > 0.01 (see text for reasons why they were included).

Patient		**Variant**						***In silico* programs**		**Maximum allele frequency**
ID	Pheno-type	Gene	Transcript	Inh.	cDNA	Protein	Geno-type	CADD ≥10 damage	PolyPhen/ SIFT/MutationTaster	in any subpopulation[1]
M1804	SCOS	*TEX15*	NM_031271.3	AR	c.8074G>A c.5969G>A	p.(Gly2692Arg) p.(Ser1990Asn)	1/0 1/0	24.9 9.1	P/-/N B/-/N	0.005 0.0257
M1809	NOA	*REC8* *SYCE1L*	NM_01048205.1 NM_01129979.1	AD AR	c.91C>T c.22C>G	p.(Arg31Cys) p.(Leu8Val)	1/0 1/1	35 6.4	P/-/D P/-/-	0.0052 0.0386
M1810	Mat.A	*TEX14*	NM_01201457.1	AR	c.4297G>A c.727C>G	p.(Glu1433Lys) p.(Gln243Glu)	1/0 1/0	26.9 25.9	B/D/D P/D/D	0.0039 0.012
M1811	NOA	*KLHL10*	NM_01329595.1	AD	c.242A>T	p.(Asn81Ile)	1/0	19.2	B/T/D	0.002
M1814	NOA	*DNMT3B*	NM_006892.3	AD	c.2452G>A	p.(Val818Met)	1/0	34	P/D/-	0.0001
M1816	SCOS	*KLHL10* *DMRT1*	NM_01329595.1 NM_021951.2	AD AD	c.887T>C c.671A>G	p.(Ile396Thr) p.(Asn224Ser)	1/0 1/0	23 25.4	B/T/D P/T/D	0.0102* 0.0124*

References

Agostinho A, Manneberg O, von Schendel R, Hernández-Hernández A, Kousznetsova A, Blom H, Brismar H & Höög C. (2016) High density of REC8 constrains sister-chromatid axes and prevents illegitimate synaptonemal complex formation. *EMBO Rep* 17, 901-913.

Barratt CLR, Björndahl L, Jonge CJ De, Lamb DJ, Martini FO, McLachlan R, Oates RD, van der Poel S, St John B, Sigman M, Sokol R & Tournaye H. (2017) The diagnosis of male infertility : an analysis of the evidence to support the development of global WHO guidance - challenges and future research opportunities. *Hum Reprod Update* 23, 660-680.

Belva F, Bonduelle M, Roelants M, Michielsen D, Steirteghem A Van, Verheyen G & Tournaye H. (2016) Semen quality of young adult ICSI offspring : the first results. *Hum Reprod* 31, 2811-2820.

Cocuzza M, Alvarenga C & Pagani R. (2013) The epidemiology and etiology of azoospermia. *Clinics* 68 (Suppl 1), 15-26.

Colombo R, Pontoglio A & Bini M. (2017) Two Novel TEX15 Mutations in a Family with Nonobstructive Azoospermia. *Gynecol Obstet Investestigation* 82(3), 283-286.

Dunne OM & Davies OR (2019). Molecular structure of human synaptonemal complex protein SYCE1. *Chromosoma*, 1-14.

Fakhro KA, Elbardisi H, Arafa M, Robay A, Rodriguez-Flores JL, Al-Shakaki A, Syed N, Mezey JG, Abi Khalil C, Malek JA, Al-Ansari A, Al Said S & Crystal RG. (2018) Point-of-care whole-exome sequencing of idiopathic male infertility. *Genet Med* 20, 1365-1373.

Fukuda T, Fukuda N, Agostinho A, Hernández-Hernández A, Kouznetsova A & Höög C. (2014) STAG3-mediated stabilization of REC8 cohesin complexes promotes chromosome synapsis during meiosis. *The EMBOjounal* 33, 1243-1256.

Gershoni M, Hauser R, Yogev L, Lehavi O, Azem F, Yavetz H, Pietrokovski S & Kleiman SE. (2017) Original research article A familial study of azoospermic men identifies three novel causative mutations in three new human azoospermia genes Original research article. *Genet Med* 19, 998-1006.

Gómez-HL, Felipe-Medina N, Sánchez-Martín M, Davies O, Ramos I, García-Tunón I, de Rooij DG, Dereli I, Tóth A, Barbero JL, Benavente R, Llano E & Pendas AM. (2016) C14ORF39/SIX6OS1 is a constituent of the synaptonemal complex and is essential for mouse fertility. *Nat Commun* 7, 13298.

Grangeiro CHP. (2018) Genomic assessment of idiopathic male infertility by nonobstructive azoospermia. PhD Thesis. Dpto. of Genetics, Medical Faculty of Ribeirão Preto, University of São Paulo.

Greenbaum MP, Yan W, Wu M, Lin Y, Agno JE, Sharma M, Braun RE, Rajkovic A & Matzuk MM. (2006) TEX14 is essential for intercellular bridges and fertility in male mice. *PNAS* 103, 4982-4987.

Griffin J, Emery BR, Christensen GL, & Carrell DT. (2008) Analysis of the Meiotic Recombination Gene REC8 for Sequence Variations in a Population with Severe Male Factor Infertility. *Syst Biol Reprod Med* 54, 163-165.

Hann MC, Lau PE & Tempest HG. (2011) Meiotic recombination and male infertility : from basic science to clinical reality ? *Asian J Androl* 13, 212-218.

Hook EB. (1977) Exclusion of Chromosomal Mosaicism : Tables of 90%, 95%, and 99% Confidence Limits and Comments on Use. *Am J Num Genet* 29, 94-97.

Ishiguro K & Watanabe Y. (2016) The cohesin REC 8 prevents illegitimate inter-sister synaptonemal complex assembly. *EMBO Rep* 17, 783-784.

Krausz C, Escamilla AR & Chianese C. (2015) Genetics of male infertility: From research to clinic. *Reproduction* 150, 159-174.

Krausz C, Giachini C, Lo Giacco D, Daguin F, Chianese C, Ars E, Ruiz-Castane E, Forti G & Rossi E. (2012) High Resolution X Chromosome-Specific Array-CGH Detects New CNVs in Infertile Males. *PLoS One* 7, e44887.

Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M & Tüttelmann F. (2013) EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: State-of-the-art 2013. *Andrology* 2, 5-19.

Krausz C & Riera-Escamilla A. (2018) Genetics of male infertility. *Nat Rev Urol* 15, 369-384.

Kumari A, Yadav SK, Misro MM, Ahmad J & Ali S. (2015) Copy number variation and microdeletions of the Y chromosome linked genes and loci across different categories of Indian infertile males. *Sci Rep* 5, 17780.

Li H & Durbin R. (2010) Fast and accurate long-read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics* 26, 589-595.

Li Z, Yi H, Li H, Hu J, Liu X, Jiang T, Sun G, Tang A, Sun X, Qian W, Zeng Y, Xie J, Zhao W, Xu Y, He T, Dong C, Liu Q, Mou L, Lu J, Lin Z *et al.*(2015) Excess of Rare Variants in Genes that are Key Epigenetic Regulators of Spermatogenesis in the Patients with Non-Obstructive Azoospermia. *Sci Rep* 5, 8785.

Lima A, Carvalho F, Gonçalves J, Fernandes S, Marques P, Sousa M, Barros A, Seixas S, Amorim A, Conrad DF & Lopes AM. (2015) Rare double sex and mab-3-related transcription factor 1 regulatory variants in severe spermatogenic failure. *Andrology* 3, 825-833.

Macdonald J, Kilcoyne KR, Sharpe RM, Kavanagh Á, Anderson RA, Brown P, Smith LB, Jørgensen A & Mitchell RT. (2018) DMRT1 repression using a novel approach to genetic manipulation induces testicular dysgenesis in human fetal gonads. *Hum Reprod* 33, 2107-2121.

Maor-Sagie E, Cinnamon Y, Yaacov B, Shaag A, Goldsmidt H, Zenvirt S, Laufer N, Richler C & Frumkin A. (2015) Deleterious mutation in SYCE1 is associated with non-obstructive azoospermia. *J Assist Reprod Genet* 32, 887-891.

Martin M. (2011) Cutadapt Removes Adapter Sequences From High-Throughput Sequencing Reads. *EMBnetjournal* 17, 10-12.

McKenna A, Hanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytsky A, Garimella K, Altshuler D, Gabriel S, Daly M & DePristo MA. (2010) The Genome Analysis Toolkit : A MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 20, 1297-1303.

McLaren W, Gil L, Hunt SE, Riat HS, Ritchie GRS, Thormann A, Flicek P & Cunningham F. (2016) The Ensembl Variant Effect Predictor. *Genome Biol* 17, 122.

Miyamoto T, Minase G, Shin T, Ueda H, Okada H & Sengoku K. (2016) Human male infertility and its genetic causes. *Reprod Med Biol* 16, 81-88.

Nakamura S, Miyado M, Saito K, Katsumi M, Nakamura A, Kobori Y, Tanaka Y, Ishikawa H, Yoshida A, Okada H, Hata K, Nakabayashi K, Okamura K, Ogata H, Matsubara Y, Ogata T, Nakai H & Fukami M. (2017) Next-generation sequencing for patients with non-obstructive azoospermia : implications for significant roles of monogenic/oligogenic mutations. *Andrology* 5, 824-831.

Okano M, Bell DW, Haber DA & Li E. (1999) DNA Methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b Are Essential for De Novo Methylation and Mammalian Development. *Cell* 99, 247-257.

Okutman O, Muller J, Baert Y, Serdarogullari M, Gultomruk M, Piton A, Rombaut C, Benkhalifa M, Teletin M, Skory V, Bakircioglu E, Goossens E, Bahceci M & Viville S. (2015) Exome sequencing reveals a nonsense mutation in TEX15 causing spermatogenic failure in a Turkish family. *Hum Mol Genet* 24, 5581-5588.

Oud MS, Volozonoka L, Smits RM, Vissers LELM, Ramos L & Veltman JA. (2019) A systematic review and standardized clinical validity assessment of male infertility genes. *Hum Reprod* 34, 932-941.

Riera-Escamilla A, Enguita-Marruedo A, D.Moreno-Mendoza, Chianese C, Sleddens-Linkels E, Contini E, Benelli M, Natali A, Colpi GM, Ruiz-Castañé E, Maggi M, Baarends WM & Krausz C. (2019) Sequencing of a ‘ mouse azoospermia ’ gene panel in azoospermic men : identification of RNF212 and STAG3 mutations as novel genetic causes of meiotic arrest. *Hum Reprod* 34, 978-988.

Röpke A, Tewes AC, Gromoll J, Kliesch S, Wieacker P & Tüttelmann F. (2013) Comprehensive sequence analysis of the NR5A1 gene encoding steroidogenic factor 1 in a large group of infertile males. *Eur J Hum Genet* 21, 1012-1015.

Tewes AC, Ledig S, Tüttelmann F, Kliesch S & Wieacker P. (2014) DMRT1 mutations are rarely associated with male infertility. *Fertil Steril* 102, 816-820.

Tüttelmann F, Ruckert C & Röpke A. (2018) Disorders of spermatogenesis. *Med Genet* 30, 12-20.

Tüttelmann F, Simoni M, Kliesch S, Ledig S, Dworniczak B, Wieacker P & Röpke A. (2011) Copy Number Variants in Patients with Severe Oligozoospermia and Sertoli-Cell-Only Syndrome. *PLoS One* 6, e19426.

Uysal F, Akkoyunlu G & Ozturk S. (2019) Decreased expression of DNA methyltransferases in the testes of patients with non-obstructive azoospermia leads to changes in global DNA methylation levels. *Reprod Fertil Dev*.

Walsh R, Peters NS, Cook SA & Ware JS. (2014) Paralogue annotation identifies novel pathogenic variants in patients with Brugada syndrome and catecholaminergic polymorphic ventricular tachycardia. *J Med Genet* 51, 35-44.

Wang X, Jin HR, Cui YQ, Chen J, Sha YW & Gao ZL. (2018) Case study of a patient with cryptozoospermia associated with a recessive TEX15 nonsense mutation. *Asian J Androl* 20, 101-102.

World Health Organization (2010) *WHO Laboratory Manual for Examination and Processing of Human Semen*, 5th edn, WHO Press. Geneva.

Yan W, Ma L, Burns KH & Matzuk MM. (2004) Haploinsufficiency of kelch-like protein homolog 10 causes infertility in male mice. *Proc Natl Acad Sci USA* 101, 7793-7798.

Yang F, Eckardt S, Leu NA, Mclaughlin KJ & Wang PJ. (2008) Mouse TEX15 is essential for DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis during male meiosis. *J Cell*

Biol 180, 673-679.

Yatsenko AN, Roy A, Chen R, Ma L, Murthy LJ, Yan W, Lamb DJ & Matzuk MM. (2006) Non-invasive genetic diagnosis of male infertility using spermatozoal RNA: KLHL10 mutations in oligozoospermic patients impair homodimerization. *Hum Mol Genet* 15, 3411-3419.

Zarrabi AD & Kruger TF. (2018) The challenges of supporting male infertility treatment in South Africa. *Nat Rev Urol* 15, 719-720.

Legend

Figure 1. Exon localization of variants identified in six NOA patients (adapted from http://www.ensembl.org).

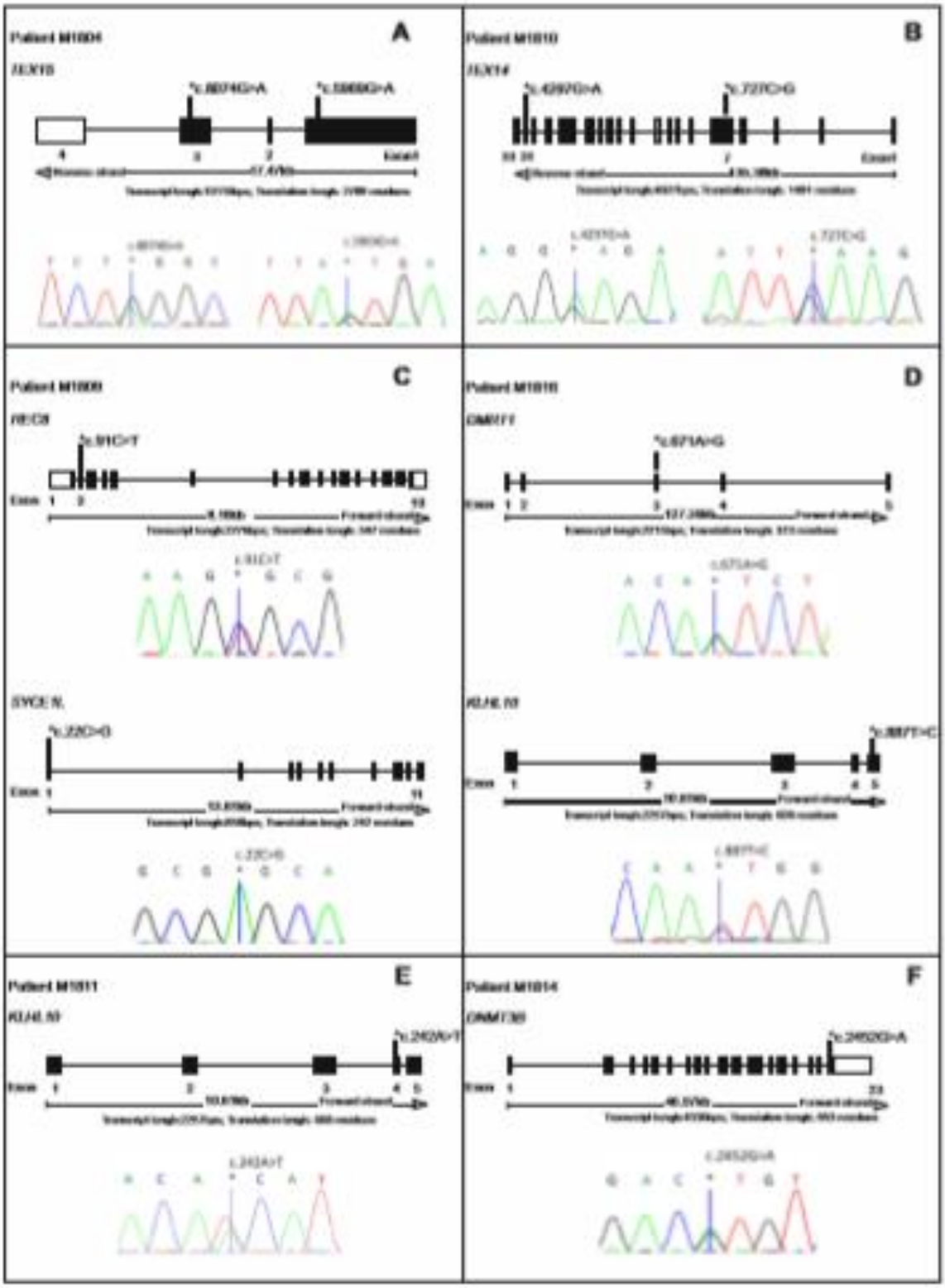
A
B
C
D
E
F

Table S1. Set of candidate genes analyzed in this study. We included three genes with robust evidence of association to NOA (Tüttelmann, Ruckert and Röpke, 2018) (*NR5A1*, *DMRT1*, *TEX11*), one gene of our interest (*SYCE1L*) and thirty three genes related to NOA, SCOS and germ cell meiotic arrest, filtered by disease category* from Table S5 (Oud *et al.*, 2018). The genes in bold are those within we found variants.
*disease categories selected: Leydig cell dysfunction/ SCOS/ premeiotic arrest/ meiotic arrest; SCOS; SCOS/ premeiotic arrest; SCOS/ premeiotic arrest/ meiotic arrest; SCOS/ premeiotic defect/ meiotic defect; meiotic arrest; meiotic arrest/ spermiogenesis defect; premeiotic arrest; premeiotic arrest/ meiotic arrest; premeiotic arrest/ meiotic arrest/ spermiogenesis defect.

Gene	Inheritance pattern in humans	Association to NOA, SCOS or maturation arrest	References
APOA1	AD	moderate evidence	Oud et al., 2018
AR	X	definitive association	Oud et al., 2018
CCDC155	AR	limited evidence	Oud et al., 2018
CDC14A	AR	moderate evidence	Oud et al., 2018
CFTR	AR	limited evidence	Oud et al., 2018
DMC1	AR	limited evidence	Oud et al., 2018
DMRT1	AD	moderate evidence, validated	Oud et al., 2018; Tüttelmann et al., 2018
DNMT3B	AD	limited evidence	Oud et al., 2018
E2F1	AD	limited evidence	Oud et al., 2018
FANCA	AR	moderate evidence	Oud et al., 2018
FANCM	AR	limited evidence	Oud et al., 2018
FSHR	AR	moderate evidence	Oud et al., 2018
HAUS7	X	limited evidence	Oud et al., 2018
HSF2	AD	limited evidence	Oud et al., 2018
KLHL10	AD	moderate evidence	Oud et al., 2018
MAGEB4	X	limited evidence	Oud et al., 2018
MEI1	AR	limited evidence	Oud et al., 2018
MEIOB	AR	limited evidence	Oud et al., 2018
NANOS2	AR	limited evidence	Oud et al., 2018
NR5A1	AD	strong evidence, validated	Oud et al., 2018; Tüttelmann et al., 2018,
PDHA2	AR	limited evidence	Oud et al., 2018
PLK4	AD	limited evidence	Oud et al., 2018
PSMC3IP	AR	limited evidence	Oud et al., 2018
RBMXL2	AD	limited evidence	Oud et al., 2018
REC8	AD	limited evidence	Oud et al., 2018
SPO11	AR	limited evidence	Oud et al., 2018
STX2	AR	limited evidence	Oud et al., 2018
SYCE1	AR	limited evidence	Oud et al., 2018
SYCE1L	AR	not described	----
SYCP3	AD	moderate evidence	Oud et al., 2018
TAF4B	AR	limited evidence	Oud et al., 2018
TEX11	X	strong evidence,	Oud et al., 2018; Tüttelmann et al.,

		validated	2018,
TEX14	AR	limited evidence	Oud et al., 2018
TEX15	AR	moderate evidence	Oud et al., 2018
TRIM37	AR	moderate evidence	Oud et al., 2018
UBR2	AD	limited evidence	Oud et al., 2018
USP26	X	limited evidence	Oud et al., 2018

Table S2: List of primer sequences used in Sanger sequencing for validation of variants found by WES.

Primer name (Gene_exon_variant)	Primer Forward	Primer Reverse
*DMRT1*_3_(c.671A>G)	TTTGGCTATAGGAGAAGCAACAG	TGTGTGTCACCTGTGTGTGC
*DNMT3B*_23_(c.2452G>A)	GCCAAGAGTATGGTGCTAGG	CTGATTTGTGCACAAGGAGGC
*KLHL10*_4_(c.242A>T)	GCACCCCACTTTCTCAGACC	TCCAAGCACAGCTCTGACTTG
*KLHL10*_5_(c.887T>C)	GGCCTCAAGTGATCCACCTG	GACATAGCAACGTCTGGAGT
*TEX14*_7_(c.727C>G)	AGGATCATCTGGCCAAAAATGG	TAGCCAGGTGTGGTGGTG
*TEX14*_31_(c.4297G>A)	TGATGATGAGACTGGGCAAAAG	AGTCTAGCTCTAGGAATTATTAGGTGT
*TEX15*_1_(c.5969G>A)	TGACTTTCCTAATGTGGGCCA	TCAGGCTGAATTTGCAGACC
*TEX15*_3_(c.8074G>A)	ACCCTCTCTGCCCAATCC	ACTTTTGGAGCATCTGGGCA
*REC8*_2_(c.91C>T)	CACCTTGCCACCAGAGAAG	CACACCGATCTGAAGTTGGG
*SYCE1L*_1_(c.22C>G)	ACTACCCTCACTCCCCAACT	CACCGCCCCACTTTTGTTTG

11. ANEXO

11.1. TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos convidando você a participar de um projeto de pesquisa do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, intitulado "**Caracterização genômica de homem inférteis**". O objetivo deste estudo é avaliar a constituição genética do paciente para buscar possíveis causas da infertilidade. Este projeto tem como pesquisadores responsáveis Juliana Dourado Grzesiuk e Carlos Henrique Paiva Grangeiro. Informamos que:

1. Sua participação é espontânea e opcional;
2. Caso você decida não participar, ou desista de participar da pesquisa a qualquer momento, você não perderá nenhum benefício ou tratamento que estiver fazendo neste Hospital;
3. Caso haja alguma dúvida ética, você poderá a qualquer momento entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) no telefone (16) 36022228 ou no endereço Campus Universitário, Bairro Monte Alegre, CEP 14048900, Ribeirão Preto – SP.
4. Você estará colaborando para aumentar nosso conhecimento sobre as alterações genéticas que podem afetar a fertilidade;

Se você concordar em participar da pesquisa, informamos que:

1. Será necessária a coleta de duas amostras de sangue, de 5mL cada, que pode causar algum desconforto no momento da coleta, em alguns casos pode gerar a formação de pequenos hematomas, porém sem nenhum prejuízo para a saúde;
2. Será necessária a coleta de uma amostra de esperma, idêntica a coleta para o exame espermograma, a qual não trará risco para a sua saúde;
3. Os resultados de nosso estudo podem não trazer benefício imediato para seu tratamento;
4. Os resultados demoram algumas semanas ou meses para ficarem prontos e serão adicionados ao seu prontuário médico;
5. O material genético extraído das amostras será utilizado exclusivamente para este fim e sua identidade será mantida em absoluto sigilo.

Eu.....tendo sido esclarecido sobre as condições que constam neste documento, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida relativa aos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa.
2. A liberdade de retirar meu consentimento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuidade do atendimento.
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação.
4. A garantia de receber uma cópia deste termo de consentimento livre e esclarecido devidamente assinado pelo pesquisador responsável.

Declaro que concordo com as condições que me foram apresentadas e aceito participar do referido projeto.

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 20___.

_____

Assinatura do paciente

Pesquisadores responsáveis:

_____	_____	_____
Juliana Dourado Grzesiuk	Carlos Henrique P. Grangeiro CRM: 147.428	Prof[a]. Dr[a]. Lúcia Regina Martelli CRM: 40.569
(16) 3315-3081	(16) 3602-2598	(16)3602-2598

11.2. APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA – Colaboradores

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FMRP-USP

Ribeirão Preto, 25 de setembro de 2013

Ofício nº 3537/2013
CEP/FC

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado **"CARACTERIAÇÃO GENÔMICA DE PACIENTES OLIGOZOOSPÉRMICOS" – versão 3, de 17/09/2013,** foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 374ª Reunião Ordinária realizada em 23/09/2013 e enquadrado na categoria: **APROVADO,** bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – versão 3, de 17/09/2013,** de acordo com o Processo HCRP nº 8715/2013.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

PROF.DR. FABIO CARMONA
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras
JULIANA DOURADO GRZESIUK
PROFª.DRª. LÚCIA REGINA MARTELLI
Depto. de Genética da FMRP-USP

Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733;IRB-00002186 e Registro PB/CONEP n 5440
(16) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br

11.2. APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA – Colaboradores

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FMRP-USP
RIBEIRÃO PRETO

Ribeirão Preto, 04 de outubro de 2017

Ofício nº 3014/2017
CEP/MGV

Prezados Senhores,

O trabalho intitulado **"ANÁLISE DE MICRODELEÇÕES NO CROMOSSOMO Y EM PACIENTES COM SUSPEITA DE INFERTILIDADE"**, foi analisado "AD REFERENDUM" pelo Comitê de Ética em Pesquisa, e enquadrado na categoria: **APROVADO,** bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 11930/2017.

De acordo com Carta Circular nº 003/2011/CONEP/CNS, datada de 21/03/2011, o sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última do referido Termo; o pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE – apondo sua assinatura na última página do referido Termo.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.

DRª. MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimos Senhores
THAIS FENZ ARAUJO
PROF.DR.AGUINALDO LUIZ SIMÕES(Orientador)
Depto. de Genética-FMRP-USP

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Campus Universitário – Monte Alegre
14048-900 Ribeirão Preto SP
Comitê de Ética em Pesquisa do HCRP e FMRP-USP
FWA-00002733; IRB-00002186 e Registro PB/CONEP nº 5440
(16) 3602-2228
cep@hcrp.usp.br

www.hcrp.usp.br