

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA**

Juliana Dourado Grzesiuk

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA MOLECULAR DE REARRANJOS
CROMOSSÔMICOS APARENTEMENTE EQUILIBRADOS ASSOCIADOS AO
FENÓTIPO DE INFERTILIDADE**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2012

JULIANA DOURADO GRZESIUK

**CARACTERIZAÇÃO CITOGENÉTICA MOLECULAR DE REARRANJOS
CROMOSSÔMICOS APARENTEMENTE EQUILIBRADOS ASSOCIADOS AO
FENÓTIPO DE INFERTILIDADE**

Dissertação apresentada à Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre pelo curso de Pós-graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Orientadora: Dra. Lúcia Regina Martelli

RIBEIRÃO PRETO - SP

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Grzesiuk, Juliana Dourado

Caracterização citogenética molecular de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados associados ao fenótipo de infertilidade. Ribeirão Preto, São Paulo, 2012.

102p.: il.; 30cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP – Área da concentração: Genética.

Orientadora: Martelli, Lúcia.

1. Infertilidade; 2. Translocação; 3. Cariótipo; 4. FISH; 5. *array*-CGH.

Data da defesa: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

AOS MEUS PAIS, ALICE E FRANCISCO

AOS MEUS IRMÃOS, MARIANA E JOÃO VICTOR

AO MEU NAMORADO E COMPANHEIRO, RAFAEL

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Lúcia Regina Martelli pela orientação, pelo incentivo, pelo carinho, por ter me recebido de braços abertos e aceitado comigo esse desafio.

Ao técnico Silvio Avelino dos Santos pela ajuda com os experimentos deste trabalho, pela disposição e cooperação. Ao Ciro Silveira por me ensinar e me auxiliar em todos os experimentos, pelos conselhos e discussões científicas. Pela realização da técnica de *array*-CGH no Canadá, agradeço ao Ciro assim como ao professor Jeremy Squire e à Dra. Maisa Yoshimoto. Aos colegas de laboratório Flávia Gaona, Alexandra Galvão e Viviane Santana, pela troca de experiências e pela amizade.

Aos médicos residentes do Ambulatório de Genética Médica do HCFMRP-USP, especialmente à Clarissa e ao Carlos, pelo auxílio nos atendimentos clínicos e coleta de dados dos pacientes. À enfermeira Fátima, pela realização das coletas de sangue. À secretária e amiga Márcia Delfino.

Aos técnicos Lucimar e Rinaldo, pelo auxílio nos experimentos práticos e disponibilidade do laboratório de Citogenética do HCFMRP-USP. À técnica Cristiana e à Dra. Juliana Meola, pelo auxílio nas técnicas de extração de DNA no laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do HCFMRP-USP.

Ao Prof. Dr. João Monteiro de Pina-Neto, por ter me aberto as portas e me ensinado muito. Ao técnico Luiz Fernando, por me ensinar grande parte do que sei das práticas de citogenética. À colega de laboratório e amiga Ludmila, por ter me recebido em Ribeirão e me ajudado com tudo que precisei sempre. Assim como Aline, Luciene e Carlos.

Ao departamento de Genética da FMRP-USP, pela disponibilidade de todas as instalações.

Às agências de fomento à pesquisa CAPES e CNPq.

Aos pacientes envolvidos nesta pesquisa, por toda a colaboração e atenção.

Aos meus amigos próximos e distantes. Especialmente à Priscila e Mayara.

Obrigada por todo o apoio, e tantos bons momentos juntas.

Ao Rafael, por estar sempre ao meu lado, por acreditar em mim, por me renovar as forças a cada dia, a cada gesto. Agradeço também à toda sua família, sua mãe Lourdes, seu pai José, suas irmãs Camila e Fabíola e também à Renata.

Aos meus irmãos queridos Mariana e João Victor. Obrigada Mariana, pelas revisões de português, pelas risadas com suas confusões com o conteúdo, pela amizade, pelo carinho, pelo exemplo de pessoa que você é e sempre vai ser para mim. Obrigada João pelo carinho, pelas brincadeiras e pela inspiração, sinto muito não poder estar tão presente.

Aos meus pais, meus guias, Alice e Francisco, por todos os ensinamentos, investimentos e incentivos para que eu chegasse até aqui, por todo carinho, amor e paciência.

Por fim à Deus e guias espirituais, por tantas oportunidades de aprendizado e por colocar na minha vida pessoas tão especiais.

RESUMO

Grzesiuk, J.D. **Caracterização citogenética molecular de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados associados ao fenótipo de infertilidade.** 2012, Dissertação (Mestrado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

A translocação recíproca é o rearranjo equilibrado mais comum em humanos. Frequentemente, indivíduos com rearranjos equilibrados não apresentam manifestações clínicas, entretanto, na meiose, o pareamento entre cromossomos translocados forma uma figura quadrivalente em forma de cruz que torna a disjunção cromossômica incerta e dependendo do rearranjo, o indivíduo pode vir a ser infértil, apresentar um risco aumentado de abortamento espontâneo e/ou da prole apresentar alterações fenotípicas. Neste projeto, investigamos duas famílias de pacientes inférteis, portadores de translocações cromossômicas. O objetivo foi caracterizar as alterações citogenéticas e citogenômicas relacionadas à infertilidade masculina em pacientes portadores de rearranjos aparentemente equilibrados, associando técnicas de citogenética clássica (bandeamento GTG), citogenética molecular (FISH) e citogenômica (*array*-CGH). Foram estudados sete indivíduos da família 1, sendo diagnosticados três portadores da translocação (X;22), sendo um deles azoospérmico. Nesta família foram ainda detectados dois casos de mosaicismo para síndrome de Turner. A família 2 foi composta por dois irmãos oligozoospérmicos, portadores de translocação (8;13). Com a aplicação da técnica de FISH, definimos o cariótipo final dos portadores dos rearranjos como 46,XX ou 46,XY,t(X;22)(p22.3;q11.2) para a família 1 e 46,XY,t(8;13)(q13;q14) para a família 2. A técnica de *array*-CGH (plataforma 2x400K, Agilent) detectou alterações no número de cópias de algumas sequências candidatas relacionados ao fenótipo de infertilidade, sendo 132 sequências de piRNAs, os genes *DDX11*, *Jag 2* e *ADAM18* na família 1 e o gene candidato *ADAM18* nos pacientes 8 e 9 e *POTE* no paciente 9.

Palavras-chave: infertilidade, translocação, cariótipo, FISH, *array*-CGH.

ABSTRACT

Grzesiuk, J.D.. **Molecular cytogenetic characterization of apparently balanced chromosomal rearrangements associated with infertility.** 2012, Master's degree in Science, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2012.

Reciprocal translocations are the most common balanced rearrangement in humans. Often individuals with balanced rearrangements show no clinical findings. However, in meiosis, the pairing between translocated chromosomes forms a quadrivalent cross-shaped figure which has the effect of making chromosome disjunction uncertain and, depending on the rearrangement, and on the segregation of the unbalanced chromosomes, the individual can be infertile, can present with an increased risk of spontaneous abortions or can have an offspring with abnormal phenotype. We have studied two families of infertile patients, who were carriers of chromosomal translocations. The objective was to characterize the cytogenetic and cytogenomic alterations related to male infertility in patients with apparently balanced rearrangements using classical cytogenetic techniques (GTG banding), molecular cytogenetics (FISH) and cytogenomics (*array*-CGH). Seven subjects of the family 1 were studied, including three carriers of translocation (X;22), one azoospermic. Two cases of mosaicism for Turner syndrome were detected in this family. The second family consisted of two oligozoospermic brothers with translocation (8;13). FISH was used to characterize the karyotypes as 46, XX or 46,XY, t(X;22)(p22.3;q11.2) for the members of the family 1 and 46,XY,t(8;13)(q13;q14) for family 2. Array-CGH was also performed using the Agilent platform 2x400K, to detect associated copy number variations of some of the candidate genes that could be related to infertility. In the family 1 the candidate genes were 132 piRNAs sequences and *DDX11*, *Jag 2* and *ADAM18* genes. The candidate genes were *ADAM18* for patients 8 e 9 and *POTE* for patient 9.

Keywords: infertility, translocation, karyotype, FISH, array-CGH.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema da segregação meiótica em portadores de translocações recíprocas (BENET et al., 2005).....	14
Figura 2. Heredograma da família 1.....	33
Figura 3. Heredograma da família 2.....	34
Figura 4. Cariótipo em bandamento GTG do paciente 1, com resultado 46,Y,t(X;22)(p22.3;q11.2), mostrando a translocação entre os cromossomos X e 22, com o ideograma do cromossomo correspondente ao lado dos cromossomos alterados.....	45
Figura 5. Cariótipo da paciente 5 em bandamento GTG evidenciando 45,X cromossomos.....	45
Figura 6. Cariótipo da paciente 7 em bandamento GTG evidenciando 47,XXX cromossomos.....	46
Figura 7. Metáfase e cariótipo da paciente 5 em bandamento GTG mostrando 48,XXXX cromossomos.....	46
Figura 8. Cariótipo do paciente 8 em bandamento GTG, com resultado 46,XY,t(8;13)(q13;q14).....	47
Figura 9. FISH mostrando a translocação (X;22) da paciente 3, por meio do uso de sondas WCP para os cromossomos X, em vermelho, e 22, em verde.....	48
Figura 10. FISH mostrando a translocação (8;13) do paciente 8, por meio do uso de sondas WCP para os cromossomos 8, em vermelho, e 13, em verde.....	49
Figura 11. FISH realizado na paciente 3, com o uso da sonda LSI para Kallmann/Steroid Sulphatase, a qual marca em vermelho o gene <i>KAL1</i> e DNA flanqueador e em verde a região do gene <i>STS</i> e DNA flanqueador, ambos presentes na região Xp22.31, marcando também a região centromérica em verde, como controle.....	50
Figura 12. FISH realizado no paciente 1 com o uso da sonda LSI para DiGeorge/VCFS a qual marca em vermelho o gene <i>TUPLE1</i> e DNA flanqueador na região 22q11.21 e em verde a região subtelomérica do cromossomo 22 (N85A3)...	50
Figura 13. Esquema ilustrado dos resultados finais da família 1 à esquerda e da família 2 à direita. No retângulo à esquerda, o cromossomo à esquerda é o der(X) e à direita o der(22) com seus respectivos ideogramas. A seta representa o ponto de quebra aproximado e em vermelho, as regiões cromossômicas translocadas. No retângulo à direita, o cromossomo à esquerda é o der(8) e à direita o der(13) com seus respectivos ideogramas, com a seta representando o ponto de quebra aproximado e em vermelho, as regiões cromossômicas translocadas.....	52

Figura 14. Heredograma final da família 1.....	52
Figura 15. Gráfico em Zoom do cromossomo 22 da paciente 3, mostrando uma deleção de 57Kb na banda q11.22.....	56
Figura 16. Gráfico em Zoom da região telomérica do cromossomo X do paciente 3, mostrando uma deleção de 40Kb na banda p22.33.....	57
Figura 17. Gráfico comparativo das alterações encontradas em todo o genoma entre os pacientes da família 1, ilustrando em cima as alterações em conjunto e abaixo as alterações individuais de cada paciente.....	65
Figura 18. Gráfico em Zoom da região centromérica do cromossomo 8 do paciente 8, mostrando uma duplicação 0,16Mb na banda p11.21.....	66
Figura 19. Gráfico em Zoom da região centromérica do cromossomo 8 do paciente 9, mostrando uma deleção de 2,9Mb na banda p11.21 e centrômero.....	68

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. TRANSLOCAÇÕES RECÍPROCAS.....	12
1.2. TRANSLOCAÇÕES X-AUTOSSOMO	16
1.3. CITOGENÉTICA CLÁSSICA.....	19
1.4. CITOGENÉTICA MOLECULAR	19
1.5. TÉCNICA DE HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA (CGH).....	21
1.6. TÉCNICA DE HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA EM ARRAY (ARRAY-CGH).....	22
1.7. INFERTILIDADE RELACIONADA A ALTERAÇÕES GENÉTICAS.....	24
2. JUSTIFICATIVA	30
3. OBJETIVOS	31
3.1. OBJETIVO GERAL	31
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	31
4. METODOLOGIA	32
4.1. CASUÍSTICA.....	32
4.2. MATERIAL	34
4.3. MÉTODOS.....	35
4.3.1. Citogenética Clássica	35
4.3.2. Citogenética Molecular	37
4.3.3. Citogenômica	39
5. RESULTADOS	44
5.1. CITOGENÉTICA CLÁSSICA.....	44
5.2. TÉCNICA DE FISH:	47
5.3. CITOGENÔMICA:	53
6. DISCUSSÃO	70
7. CONCLUSÕES	84
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	85
ANEXOS	93
ANEXO I.....	97
ANEXO II.....	102
ANEXO III.....	98

1. INTRODUÇÃO

1.1. TRANSLOCAÇÕES RECÍPROCAS

A estabilidade do número e da estrutura dos cromossomos é fundamental para o desenvolvimento normal dos organismos. Porém, na espécie humana, existe uma frequência considerável de indivíduos com alterações cromossômicas. Como os genes estão dispostos ao longo do cromossomo, modificações em sua estrutura ou número podem alterar a expressão gênica, produzindo um indivíduo fenotipicamente inviável ou anormal. Estima-se que aproximadamente 0,65%, ou seja, um em cada 153 nascidos vivos, possuam anormalidades cromossômicas. Nos casos de aborto espontâneo, esse número chega a representar aproximadamente 48,8%. As alterações numéricas são as mais comuns, como é o caso da síndrome de Down causada pela trissomia do cromossomo 21, com incidência de um a cada 729 nascidos vivos. Alterações estruturais são menos frequentes e podem ser equilibradas, quando não ocorre nem perda nem ganho de material genético, ou não equilibradas, quando ocorre perda ou ganho (BENN, 2010). Rearranjos equilibrados são encontrados em aproximadamente três a cada 1000 adultos, sendo a translocação recíproca a aberração mais frequente, presente em um a cada 600 nascidos vivos (JACKSON, 2002) e caracterizada pela quebra em dois cromossomos distintos com posterior troca de segmentos (MERGENER et al., 2011).

A maioria das alterações na estrutura cromossômica, aproximadamente 80%, não é originada *de novo*, mas, sim, transmitida por um dos pais (JACOBS, 1992). Em 84,4% dos casos originados *de novo*, sua origem é predominantemente decorrente de erros da espermatogênese (OLSON; MAGENIS, 1988), o que pode

ser explicado pelo grande número de divisões celulares da espermatogônia durante a vida reprodutiva masculina e pela ausência de mecanismos de reparo nos estágios tardios da espermatogênese (TEMPLADO et al., 2005).

Na gametogênese de indivíduos portadores de translocação recíproca, o pareamento entre os cromossomos translocados durante a meiose I ocorre por meio da formação de uma figura quadrivalente, em forma de cruz. Como este pareamento envolve quatro centrômeros, que podem ou não ser distribuídos coordenadamente para os polos opostos, a disjunção cromossômica é muito incerta, podendo produzir gametas aneuplóides, portadores do cromossomo translocado ou com alterações derivadas do rearranjo parental, como ilustrado na Figura 1 (p.14) (BENET et al., 2005). De acordo com a literatura, a produção de espermatozoides não equilibrados em portadores de translocação recíproca varia de 20 a 77%, com um risco teórico de 50%. Nestes casos, a segregação pode ocorrer pelos diferentes mecanismos de segregação 2:2 (alternado, adjacente 1 e adjacente 2), segregação 3:1 ou raramente 4:0. Na disjunção alternada, os cromossomos translocados segregam para um dos polos, enquanto os normais segregam para o outro, produzindo gametas equilibrado e normal, respectivamente. Gametas não equilibrados são produzidos pelo mecanismo adjacente 1 e 2, e pelas segregações 3:1 e 4:0. Na disjunção adjacente 1, os centrômeros homólogos se movem para polos opostos, enquanto na adjacente 2 se movem para o mesmo polo. Em ambos os casos, os gametas serão aneuplóides, pois, alguns segmentos cromossômicos serão deletados e outros serão duplicados (EGOZCUE et al., 2000).

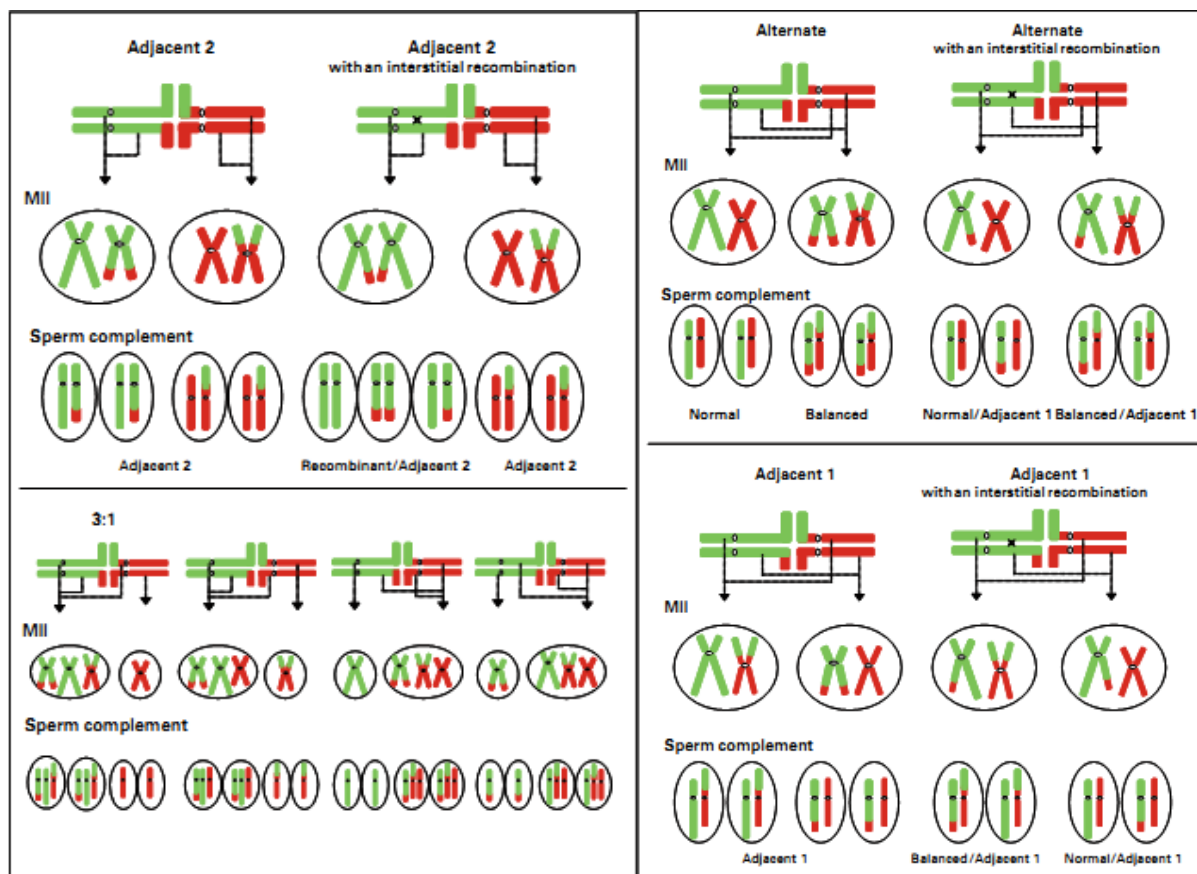


Figura 1. Esquema da segregação meiótica em portadores de translocações recíprocas (BENET et al., 2005).

A reorganização cromossômica de uma alteração familiar pode dar origem a deleções e duplicações de extensões variadas, dependendo do comportamento do cromossomo alterado durante a meiose (SYBENGA, 1972). Esse comportamento depende da morfologia e do tamanho dos fragmentos cromossômicos envolvidos, da presença ou da ausência de heterocromatina agregada (JALBERT; SÉLE, 1979), da localização dos pontos de quebra (ASHLEY, 1988) e da frequência de *crossing-over* no pareamento das regiões (LAURIE; HULTÉN, 1985). Estudos cromossômicos em espermatozoides demonstram que a proporção de gametas normais e equilibrados e gametas não equilibrados é muito variável entre as diferentes translocações, mas não varia muito entre indivíduos com translocações envolvendo os mesmos cromossomos (HONDA et al., 1999). Em homens normais, a frequência

de espermatozoides com cromossomos anômalos é estimada em 8,6%, sendo 1,8% aneuplóides, 0,2% diplóides e 6,6% com aberrações estruturais (TEMPLADO et al., 2005). Entre indivíduos portadores de translocações, a porcentagem de gametas não-equilibrados é geralmente muito maior. Estudos por cariotipagem de espermatozoides mostraram resultados variando entre 19 a 77%, enquanto que estudos citogenéticos moleculares utilizando a técnica de FISH, descreveram resultados variando de 37 a 91% de gametas não equilibrados (MARTIN, 2008).

Shi e Martin (2001) realizaram uma revisão sobre alterações da espermatogênese em pacientes portadores de anormalidades cromossômicas constitucionais e relataram que a segregação alternada ocorreu em 44 a 51% das divisões na espermatogênese de portadores de translocações cromossômicas, seguida pela adjacente em 16 a 40% dos casos, enquanto que a adjacente 2 apresentou frequência média de 9% (entre 3 e 16%). Por fim, a segregação 3:1 ocorreu em média de 11%, variando entre 2 a 40%. Entretanto, sob certas circunstâncias, este típico padrão de segregação não foi evidenciado, como, por exemplo, nos casos em que houve participação de cromossomos acrocêntricos na reorganização ou uma configuração muito assimétrica da figura quadrivalente. Os autores também analisaram a literatura sobre a possível ocorrência de efeitos intercromossômicos em portadores de translocações recíprocas, ou seja, o efeito da translocação na segregação de cromossomos não envolvidos no rearranjo. Entre 29 portadores de translocações recíprocas estudados na literatura, 58% apresentaram um aumento da frequência de pelo menos um tipo de dissomia, sendo os cromossomos 1 e 21 os cromossomos mais afetados pela presença de uma translocação. Os autores relataram alguns estudos que não detectaram qualquer

efeito intercromossômico, porém, o pequeno número de espermatozoides analisados por doador poderia resultar em falha na detecção das alterações.

Quando uma translocação recíproca se estabelece, pequenos desequilíbrios genômicos podem ser detectados, mesmo em indivíduos com um fenótipo normal, sendo as regiões dos pontos de quebra mais complexas do que o esperado. Gajecka e colaboradores (2008) sequenciaram as regiões de oito pontos de quebra em quatro indivíduos fenotipicamente normais portadores da translocação $t(1;22)(p36;q13)$, e observaram a presença de pequenas adições, deleções, duplicações e até triplicações de poucos nucleotídeos em 85,7% dos casos. Este estudo também mostrou que todos os pontos de quebra avaliados interrompiam algum gene. Os autores sugeriram que essas alterações nas regiões de quebra poderiam ser consequência do envolvimento de múltiplos mecanismos no processo de quebra e reparo do DNA, porém o processo de formação de translocações recíprocas constitucionais permaneceria desconhecido.

1.2. TRANSLOCAÇÕES X-AUTOSSOMO

Translocações envolvendo cromossomos sexuais são diferentes e devem ser consideradas separadamente. As translocações X-autossomo podem estar presentes tanto em homens quanto em mulheres, porém, as implicações para cada sexo são distintas. O mecanismo epigenético de inativação do cromossomo X faz com que exista uma compensação de dose genética entre homens (XY) e mulheres (XX). Este processo é iniciado ainda em estágio inicial da embriogênese, ao fim do estágio de blastocisto (BUSQUE et al., 1996). Em cada célula, o cromossomo X a ser inativado é escolhido aleatoriamente e todas as células descendentes mantêm a

mesma inativação (LYON, 1961). O silenciamento do cromossomo X tem início no centro de inativação do X (XIC) (RASTAN; BROWN, 1990), na região Xq13, e, a partir deste ponto, a inativação se espalha por todo o cromossomo (BROWN et al., 1991a). Nesta região está o gene XIST, expresso exclusivamente pelo cromossomo X inativo (BROWN et al., 1991b) o qual é transcrito, porém não traduzido em proteína, sendo as moléculas de RNA capazes de cobrir o cromossomo X (BROCKDORFF et al., 1992), influenciando possivelmente modificações nas histonas, metilação das ilhas CpGs, condensação da cromatina (OKAMOTO et al., 2004) e replicação tardia (SCHMIDT; MIGEON, 1990).

Mulheres portadoras de translocações X-autossomo equilibradas possuem dois cromossomos recombinados, o derivativo (der) (X) e o der(autossomo). O segmento X portador do XIC geralmente permanece no der(X), mas também pode se encontrar translocado no der(autossomo). Em ambos os casos, a inativação do cromossomo translocado causaria um desequilíbrio genético, uma vez que genes autossômicos estariam também sendo silenciados, ao mesmo tempo que genes do cromossomo X, que deveriam estar silenciados, não estariam sob influência do gene XIST. Sendo assim, a única maneira de uma mulher portadora de translocação X-autossomo ser cariotipicamente equilibrada seria utilizar como cromossomo ativo os dois segmentos X translocados, que juntos seriam equivalentes ao cromossomo íntegro. A teoria mais aceita é que o mecanismo capaz de gerar essa inativação assimétrica é simplesmente a seleção celular, onde o desequilíbrio provocado pela inativação do cromossomo X íntegro nas células faz com que elas sejam eliminadas, selecionando então a linhagem de células com o cromossomo X normal inativo. Este mecanismo ocorre de forma eficiente em boa parte das mulheres portadoras de translocações cromossômicas, e, desconsiderando possíveis efeitos reprodutivos,

são fenotipicamente normais. Entretanto, alterações fenotípicas causadas por falha do mecanismo de seleção não são raras, ocorrendo em aproximadamente 25% dos casos, geralmente quando pequenos fragmentos cromossômicos estão envolvidos na translocação (SCHMIDT; DU SART, 1992).

Translocações X-autossomo são geralmente de origem materna ou surgem *de novo*. A maioria dos portadores não possui alterações fenotípicas e os efeitos na fertilidade dependem do sexo do portador, posição dos pontos de quebra (KALZFULLER et al., 1999) e mecanismos de inativação do X (WATERS et al., 2001). Nas mulheres, existem duas regiões críticas onde interrupções gênicas têm sido relacionadas com falência ovariana precoce, as regiões correspondentes ao intervalo Xq13-Xq21 e Xq23-Xq27 (SALA et al., 1997; THERMAN et al., 1990). Nos homens, quase invariavelmente, portadores hemizigotos de translocações equilibradas X-autossomo são inférteis devido à interrupção da espermatogênese, sendo na maioria das vezes azoospérmicos e algumas vezes oligospérmicos severos (FRACCARO et al., 1997).

As translocações *de novo* X-autossomo equilibradas descritas até hoje foram sempre originadas de erros na espermatogênese, o que pode ser explicado pela possibilidade de pareamento entre o cromossomo X e outros cromossomos durante a meiose masculina, uma vez que o cromossomo X e Y se pareiam apenas por uma pequena região homóloga. Tal pareamento pode permitir o *crossing* entre cromossomos heterólogos, acarretando em translocação de segmentos cromossômicos. Uma vez estabelecida a translocação associada a um fenótipo normal em heterozigotos, a frequente infertilidade masculina permite apenas a transmissão matrilinear (GARDNER et al., 2011).

1.3. CITOGENÉTICA CLÁSSICA

Inversões e translocações são úteis para o mapeamento e subsequente isolamento de genes específicos que possam estar relacionados a um determinado fenótipo (GRIFFITHS et al., 2008). Hoje existem várias técnicas disponíveis que permitem investigação citogenética e molecular. A cariotipagem foi uma das primeiras técnicas citogenéticas e o uso da solução de tripsina na coloração cromossômica (SEABRIGHT, 1971) levou à descoberta de diferentes padrões de bandas claras e escuras ao longo dos cromossomos, permitindo precisa identificação de cada cromossomo, assim como o reconhecimento de uma enorme variedade de alterações estruturais como deleções, duplicações, inversões e translocações. Esta técnica ainda é largamente utilizada por ser extremamente confiável na identificação de aberrações cromossômicas numéricas e alterações estruturais grandes. O bandeamento para análise, no entanto, se limita a uma resolução de 5 a 10 Mb, dependendo da qualidade da preparação. Outra importante limitação é a necessidade de multiplicação do material em cultura celular para análise, que pode levar de três dias a duas semanas para atingir uma quantidade adequada de células em metáfase, dependendo do tipo de tecido utilizado. Tais limitações exigiram o desenvolvimento de técnicas mais rápidas e eficientes, de maior resolução (GOUAS et al., 2008).

1.4. CITOGENÉTICA MOLECULAR

A técnica de hibridação *in situ* surgiu paralelamente às técnicas de bandeamento da citogenética clássica, sendo que sua primeira aplicação foi baseada na observação que sequências complementares de nucleotídeos poderiam

se parear para formarem complexos mais estáveis que suas formas não complementares (GALL; PARDUE, 1969). No início, a técnica dependia da detecção de radiativos e só em 1977 foi introduzida a utilização de anticorpos marcados por fluorescência capazes de reconhecer hibridações RNA-DNA específicas (RUDKIN; STOLLAR, 1977). Logo após, foram desenvolvidas sondas de DNA ou RNA quimicamente acopladas a fluorocromos, permitindo uma visualização direta e rápida, conhecida por Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH) (BAUMAN, 1980). A síntese de derivados de nucleotídeos modificados e marcados com biotina, os quais podem ser incorporados a sondas através das polimerases, foi instrumento para o desenvolvimento de técnicas de marcação indireta (LANGER et al., 1981).

A FISH possibilita a detecção de sequências específicas de DNA e RNA em cromossomos metafásicos e núcleos interfásicos sendo, ainda hoje, uma importante ferramenta no diagnóstico de inúmeras aberrações, na determinação de pontos de quebra em rearranjos estruturais como inversões e translocações e na identificação da origem de material adicional (BEATTY et al., 2002). Durante a técnica, as sondas marcadas por fluorescência e os cromossomos ou núcleos alvos, são desnaturados permitindo o pareamento das sequências complementares das sondas. Após lavagem e incubação em reagentes de afinidade aos marcadores fluorescentes, uma marcação fluorescente é visualizada nos locais de hibridação indicando a presença da sequência alvo a ser analisada. Dependendo da complexidade da sonda utilizada, pode-se avaliar todo o genoma de uma espécie, cromossomos inteiros, sub-regiões cromossômicas ou sequências de cópia única (TRASK, 1991).

Todo tipo de sequências de DNA humano podem ser utilizados como sondas, como sequências únicas, sequências de DNA repetitivo (α -satélite e telômero), sequências loco-específicas obtidas por Reação em Cadeia da Polimerase (PCR),

grandes sequências de DNA genômico obtidos por clonagem, bandas cromossômicas e sequências braço específicas geradas por microdissecção e até cromossomos inteiros (FAN, 2002). Sondas de cromossomos inteiros (WCP – *whole chromosome painting*) são constituídas por uma combinação de várias sequências nucleotídicas únicas e DNA repetitivo e são indicadas para a determinação da composição de cromossomos marcadores e detecção de translocações e rearranjos complexos (TRASK, 1991; WOLFF; SCHWARTZ, 2005).

Um importante avanço da técnica de FISH foi o surgimento de sondas com várias marcações diferentes. Isso se tornou possível com a utilização de combinações de fluorocromos para a marcação, seguida pela avaliação da presença ou ausência de cada fluorocromo (NEDERLOF et al., 1989) ou da razão de intensidade entre eles (NEDERLOF et al., 1992). Técnicas como cariótipo espectral (SKY)(SCHROCK et al., 1996) e a FISH-multicolor (M-FISH)(SPEICHER et al., 1996) utilizam estas estratégias, o que permite a visualização simultânea de todos os 24 cromossomos humanos, cada um de uma cor diferente em uma única hibridação. A técnica de bandeamento multicolor (m-banding) também é baseada na utilização de sondas de diferentes razões de intensidade de marcação, diferenciando, porém, regiões de um mesmo cromossomo através da sobreposição de uma biblioteca de microdissecção (CHUDOBA, et al., 1999).

1.5. TÉCNICA DE HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA (CGH)

A obtenção de metáfases de boa qualidade muitas vezes é difícil, especialmente em células de tumor sólido (MITELMAN et al., 2004). Para resolver esse problema, foi desenvolvida a técnica de Hibridação Genômica Comparativa

(CGH) (KALLIONIEMI, 1992). A técnica permite a detecção de ganhos e perdas de material cromossômico e é baseada na hibridação do DNA do paciente e de um DNA controle marcados com fluorescências distintas, em lâminas com metáfases controle obtidas de um voluntário saudável. Os fragmentos de DNA marcados em verde e vermelho competem pela hibridação em seus *loci* de origem na metáfase controle. Para cada cromossomo, um padrão de fluorescência é gerado e são analisadas de cinco a 20 metáfases. A hibridação diferencial entre o DNA controle e o DNA do paciente indicará perdas (razão < 0,8 de sondas do paciente/sondas controle) ou ganhos (razão > 1,2 de sondas do paciente/sondas controle) de material cromossômico em todo o genoma (DU MANOIR et al., 1993; KALLIONIEMI, 1992).

Uma das principais vantagens do CGH é o uso da técnica como uma ferramenta de investigação que não exige conhecimento prévio dos desequilíbrios cromossômicos. Entre as desvantagens, estão a não detecção de alterações estruturais equilibradas assim como a não detecção de alterações referentes à ploidia. Apesar destas limitações, a técnica de CGH tornou-se uma das mais usadas técnicas citogenéticas, tanto para pesquisa quanto para diagnóstico (SPEICHER, CARTER, 2005).

1.6. TÉCNICA DE HIBRIDAÇÃO GENÔMICA COMPARATIVA EM ARRAY (*array*-CGH ou aCGH)

Esta técnica difere da convencional por utilizar como alvo da hibridação um grande número de clones genômicos de interesse, dispostos em uma lâmina padrão ao invés de metáfases controle. Essa mudança não só permitiu um aumento da resolução da técnica, como uma automatização do processo de análise (LICHTER et al., 2000). Os primeiros estágios dos experimentos utilizando a técnica de *array*-

CGH foram baseados em plataforma de cromossomo artificial bacteriano (BAC) produzido pelo próprio laboratório, o qual consiste de grandes clones de inserção, que inicialmente tinham uma cobertura de aproximadamente um clone por Mb. Avanços tecnológicos permitiram o desenvolvimento de uma nova geração de plataformas de *array*-CGH, disponíveis comercialmente, contendo um grande número de pequenos oligonucleotídeos. A grande vantagem da técnica é a habilidade de explorar centenas, até milhares de locos distintos em uma única reação com resolução muito maior que o cariótipo ou CGH metafásica. Porém, é importante que a escolha da plataforma a ser utilizada seja cuidadosa, levando em consideração que a resolução da técnica é definida não só pelo número e tamanho das sondas, mas principalmente pelo espaçamento entre elas, além da sensibilidade de hibridação e da razão sinal/ruído de cada sonda (ZHANG et al., 2008).

As plataformas de *array*-CGH podem ser utilizadas para investigação de variações do número de cópias (CNVs) em regiões distintas do material genético, como cromossomos inteiros, segmentos cromossômicos, regiões cromossômicas relacionadas a doenças específicas, todas as regiões subteloméricas, ou mesmo o genoma inteiro. Esta técnica tem sido muito utilizada na análise de ganhos e perdas genômicas em tumores, e também vem sendo cada vez mais utilizada, com significantes contribuições, para caracterização e delimitação precisa de desequilíbrios genômicos e para associação entre anormalidades cromossômicas e manifestações clínicas, assim como na definição de variações genômicas normais na população. A plasticidade da técnica permite a construção de *arrays* específicos para regiões de interesse, o que melhora a resolução por permitir uma cobertura mais completa de clones para a região alvo, reduzindo os custos de produção e de hibridação (SPEICHER; CARTER, 2005).

Foram desenvolvidas diversas variações da técnica de *array*-CGH, como o *array* de cDNA que permite a análise da expressão gênica (POLLACK et al., 1999) e os *arrays* de polimorfismo de nucleotídeo único (Single Nucleotide Polymorphism–SNP*arrays*) que são baseados em uma alta densidade de oligonucleotídeos capaz de identificar além de CNVs, perdas de heterozigosidade de um único nucleotídeo. No SNP *array*, diferente do CGH, a hibridação do DNA em estudo e o DNA controle são hibridados independentemente e alterações no número de cópias são identificadas por comparação da intensidade entre elas (BIGNELL et al., 2004).

1.7. INFERTILIDADE RELACIONADA A ALTERAÇÕES GENÉTICAS

A infertilidade afeta aproximadamente 15% dos casais e é definida como a incapacidade de conceber um filho depois de um ou mais anos de relações sexuais regulares sem o uso de métodos de anticoncepção. A infertilidade pode ser causada por vários fatores, femininos ou masculinos, como fatores relacionados à idade, obesidade, doenças infecciosas, alterações imunológicas, hormonais, psicológicas, físicas ou alterações nos gametas. É difícil definir com precisão o grau de contribuição da genética na redução da fertilidade, uma vez que a maioria dos fatores associados, se não todos, são possivelmente influenciados ou determinados por algum componente genético. Porém, existem várias alterações gênicas e cromossômicas associadas ao fenótipo de infertilidade, que incluem as aneuploidias como a síndrome de Down (47,XX ou XY +21), a síndrome de Klinefelter (47,XXY) em homens, e a síndrome de Turner (45,X) em mulheres, as alterações estruturais como translocações robertsonianas, translocações recíprocas e inversões, várias

microdeleções do cromossomo Y e mutações em genes como o da fibrose cística (CFTR) (SHAN et al., 2003).

A maioria dos portadores de rearranjos equilibrados não manifesta nenhum sinal ou sintoma clínico, salvo se o ponto de quebra tenha alterado a expressão de um gene. Porém, dependendo do rearranjo, o indivíduo pode vir a ser infértil, apresentar aumento do risco de abortamentos espontâneos e/ou da prole apresentar manifestações clínicas resultantes da segregação não equilibrada da alteração cromossômica (MERGENER et al., 2011).

A frequência de anormalidades cromossômicas em homens inférteis varia de 2,2 a 15,2%, sendo as translocações recíprocas presentes em aproximadamente 1% dos homens inférteis e a azoospermia mais comum que a oligospermia. Abortamentos de repetição também estão diretamente associados a alterações cromossômicas, sendo a frequência de abortos em casais com translocação 20 vezes maior do que a população geral (GOEL; PHADKE, 2010).

O processo de segregação dos cromossomos na gametogênese de indivíduos portadores de translocações recíprocas pode levar à infertilidade de diversas maneiras. O mecanismo e o tempo consumido para a formação da figura quadrivalente no pareamento entre os cromossomos translocados pode impedir o processo meiótico, além de tornar a disjunção propensa à produção de gametas não equilibrados (FOREJT, 1982). Regiões sem sinapse entre os pareamentos em cruz são comuns e podem acarretar em falhas na meiose e consequente eliminação da célula germinativa (MIKLOS, 1974). Estudos ainda evidenciaram a tendência de segmentos translocados não homólogos de se parearem com o cromossomo X e Y durante a meiose (LYON; MEREDITH, 1966), o que interfere no mecanismo de

inativação do X, podendo levar a uma dosagem gênica letal para a célula germinativa (FOREJT, 1982).

Os cromossomos X e Y possuem morfologia e tamanho muito diferentes, com apenas duas pequenas regiões homólogas, as regiões pseudoautosômicas 1 e 2, sendo o pareamento e a recombinação restritos a essas regiões (BERGERO, R.; CHARLESWORTH, 2009). Durante a prófase I da espermatogênese, os cromossomos sexuais são inativados, formando juntos um domínio de cromatina sub-nuclear visível apenas no paquíteno. As proteínas deste domínio possivelmente agem como um escudo que impede o acesso da maquinaria de transcrição aos genes localizados nos cromossomos sexuais. Estudos mostram que as figuras quadrivalentes formadas pelo pareamento entre cromossomos translocados possuem regiões assinápticas entre os pontos de quebra, maiores ou menores conforme sua configuração. Na fase de paquíteno da divisão celular, existe um *checkpoint* responsável pela detecção de anormalidades de recombinação e sinapses. Sem pareamento, as formações abertas detectadas podem acarretar na interrupção da divisão celular e apoptose. Para fugir da morte celular, a única opção é o completo pareamento por sinapse heteróloga da figura quadrivalente. Se o pareamento entre os cromossomos envolvidos na translocação não for possível, a figura quadrivalente pode tentar se ligar a outras regiões assinápticas, geralmente a cromatina sexual, para fugir da ativação da apoptose pelo *checkpoint*. Porém, mesmo que a célula tenha sucesso em mascarar o erro neste primeiro momento, eventualmente ela será destruída por outros mecanismos. Dessa forma, essa associação foi sugerida como importante causa de infertilidade em portadores de translocações, especialmente em casos de translocações recíprocas envolvendo

cromossomos sexuais (X ou Y) e cromossomos autossômicos (OLIVER-BONET et al., 2005).

Em 1972, Lifschytze Lindsley sugeriram que a associação de um cromossomo autossômico à cromatina sexual gerava reversão da inativação dos cromossomos sexuais, alterando a dosagem gênica da célula de forma letal. Outros autores, no entanto propuseram que a inativação da cromatina sexual, em vez de ser revertida, poderia se espalhar pelos segmentos autossômicos ligados a ele (JAAFAR et al., 1993). A observação dessas associações mostrou uma gradual “heterocromatização” dos braços cromossômicos autossômicos envolvidos, mimetizando o comportamento dos cromossomos sexuais, corroborando com a hipótese de espalhamento da inativação (OLIVER-BONET et al., 2005). Acredita-se que a repressão da transcrição não seja um mecanismo exclusivo dos cromossomos sexuais, estando envolvida no silenciamento de quaisquer regiões assinápticas da meiose (BAARENDS; GROOTEGOED, 2003). Porém, se genes críticos para a correta progressão da meiose forem silenciados, a célula será sinalizada a entrar em apoptose. Mesmo que nenhum gene essencial seja afetado e a prófase I da meiose seja completada, a disposição anormal da figura quadrivalente possivelmente será detectada pelo próximo *checkpoint*, o da metáfase I (OLIVER-BONET et al., 2005). Neste ponto, a transição metáfase-anáfase é bloqueada quando defeitos do fuso ou do alinhamento cromossômico são detectados. Acredita-se que este *checkpoint* esteja relacionado à falta de tensão nas proteínas do cinetócoro durante a metáfase I (EAKER et al., 2001).

A resposta para as alterações genéticas durante a meiose é muito diferente em homens e mulheres. Anormalidades durante a espermatogênese geralmente acarretam em suspensão da divisão e morte celular. Já nas mulheres, problemas na

oogênese geralmente não acarretam em interrupção da divisão, formando gametas alterados. Essa diferença pode explicar porque a mesma alteração cromossômica pode gerar infertilidade masculina, enquanto pode não interferir na fertilidade feminina (PAOLONI-GIACOBINO et al., 2000).

Análises em camundongos com genes nocauteados indicam que a inativação de mais de 200 genes envolvidos em diversas funções (como a dinâmica da divisão celular, o reparo de DNA, a estrutura e mobilidade dos espermatozóides e muitas outras) culmine no fenótipo de infertilidade. Outros grupos de pesquisa sugerem que a base genética da infertilidade em humanos também seja extremamente heterogênea. Schultz e colaboradores (2003) realizaram uma análise da transcrição em células germinativas, a qual indicou que a expressão correta de aproximadamente 2.000 genes, correspondente a 7% do genoma humano, pode ser essencial para a completa fertilidade masculina. A dificuldade em definir as causas genéticas da infertilidade se dá não só pela influência de um grande número de genes envolvidos em todo o complexo processo de espermatogênese, mas também por fatores ambientais e comportamentais. Ou seja, a infertilidade é resultado da soma de diferentes fatores genéticos que contribuem para o fenótipo do indivíduo e de sua parceria, influenciado pela exposição a fatores ambientais (CRAM et al., 2004).

A literatura indica a investigação genética em casos de severa oligozoospermia e azoospermia, uma vez que pode identificar casos em que a coleta de espermatozóides é viável para estudo específico e pode também auxiliar no aconselhamento dos casais quanto a possibilidade de alterações fenotípicas e recorrência da infertilidade na prole (ESTEVES et al., 2011). O estudo das causas genéticas da infertilidade permite indicar o melhor tratamento entre as técnicas de

reprodução assistida, além de possibilitar o surgimento de novas tecnologias e abordagens de futuras investigações no campo da infertilidade masculina.

2. JUSTIFICATIVA

A associação entre rearranjos cromossômicos e o fenótipo de infertilidade é bem reconhecida na literatura, porém os mecanismos envolvidos permanecem desconhecidos, o que dificulta o processo de aconselhamento genético. Translocações recíprocas equilibradas, mesmo quando associadas a um fenótipo normal, podem provocar forte impacto sobre o processo de espermatogênese, podendo levar à oligospermia ou mesmo à azoospermia. A oogênese é relativamente preservada em mulheres portadoras de translocações recíprocas, porém alterações cromossômicas não equilibradas no embrião podem resultar em abortos de repetição.

A investigação citogenética clássica e molecular de pacientes portadores desses rearranjos possibilita a determinação do diagnóstico citogenético definitivo, assim como o direcionamento de estudos citogenômicos, visando o refinamento diagnóstico e possível correlação entre o cariótipo e o genótipo dos pacientes. Sendo assim, nossa proposta é caracterizar as aberrações cromossômicas estruturais detectadas em duas famílias com histórico de infertilidade, para definição diagnóstica e aconselhamento genético adequado, utilizando diferentes metodologias.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste trabalho foi caracterizar as alterações citogenéticas e citogenômicas relacionadas à infertilidade masculina em pacientes portadores de translocações cromossômicas aparentemente equilibradas.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 3.2.1. Determinar o diagnóstico citogenético dos pacientes e seus familiares, associando técnicas de citogenética clássica (bandeamento GTG) e citogenética molecular (FISH);
- 3.2.2. Identificar os pontos de quebra cromossômica e as regiões envolvidas nos rearranjos, para detecção de possíveis perdas ou ganhos genômicos por meio da técnica de *array* CGH;
- 3.2.3. Estabelecer a correlação entre o cariótipo, genótipo e fenótipo dos pacientes para orientação do prognóstico reprodutivo e aconselhamento genético para suas famílias.

4. METODOLOGIA

O projeto de pesquisa foi desenvolvido no Laboratório de Citogenética Molecular (Grupo de Genética Reprodutiva) do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, da Universidade de São Paulo (FMRP – USP) em parceria com o Laboratório de Citogenética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (HCFMRP-USP).

4.1. CASUÍSTICA

A amostra total foi composta por nove indivíduos, membros de duas famílias acompanhadas no setor de Genética Médica do HCFMRP - USP. Os critérios iniciais de seleção foram fenótipo de infertilidade e cariótipo apresentando rearranjo cromossômico estrutural do tipo translocação aparentemente equilibrada em dois pacientes do sexo masculino (pacientes 1 e 8), sendo posteriormente avaliados seus familiares. Todos os pacientes foram informados e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (Apêndice I) referente à participação no projeto de pesquisa, aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP-HCRP nº 5465/2008) (Anexo I). Os pacientes foram avaliados no Ambulatório de Genética Médica pela Prof^a. Dr^a. Lúcia Regina Martelli, com a colaboração dos médicos assistentes e residentes do setor. Informações sobre exames subsidiários como espermograma, níveis hormonais e dados da anamnese, como antecedentes pessoais, foram obtidos a partir de pesquisa autorizada no prontuário HCFMRP dos pacientes (Apêndice II).

A tabela 1 resume a amostra selecionada nas família 1 e 2. As figuras 2 e 3 (p.33 e 34) correspondem aos heredogramas de cada família.

Tabela 1: Descrição dos pacientes investigados.

Paciente	Idade	Sexo	Descrição
1	28 anos	M	Infértil por azoospermia. Portador de translocação X;22
2	25 anos	F	Portadora de translocação X;22.
3	50 anos	F	Portadora de translocação X;22.
4	54 anos	M	Fenótipo normal
5	41 anos	F	Três abortos espontâneos e um filho saudável
6	60 anos	M	Fenótipo normal
7	82 anos	F	Quatro filhos saudáveis e nenhum histórico de aborto
8	47 anos	M	Infértil por oligozoospermia. Portador de translocação 8;13.
9	48 anos	M	Infértil por oligozoospermia. Portador de translocação 8;13.

Legenda: "F": feminino; "M": masculino.

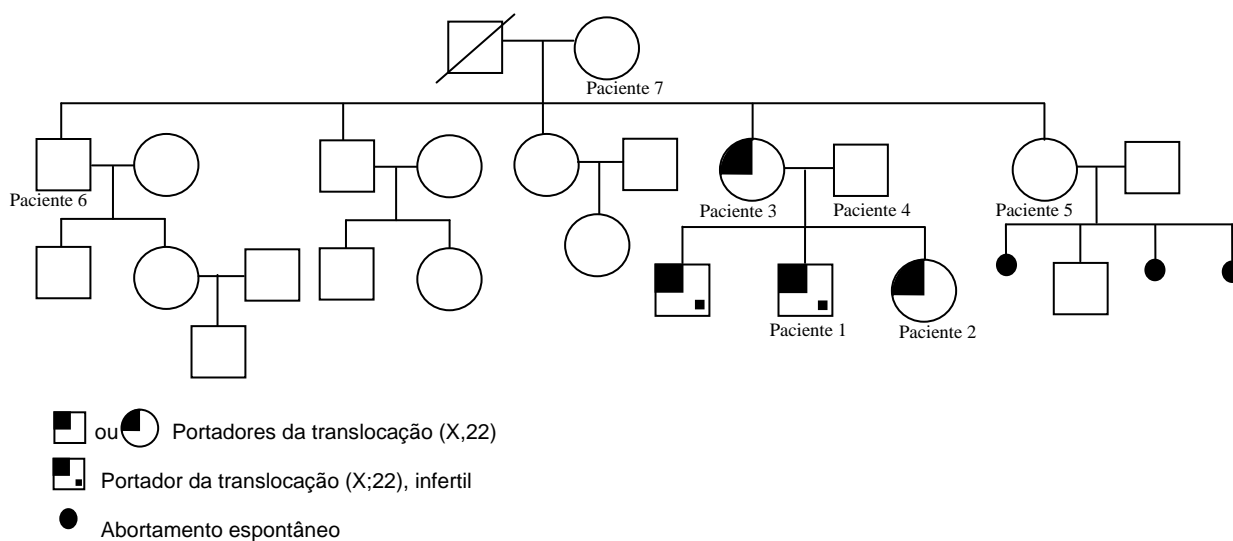


Figura 2. Heredograma da família 1.

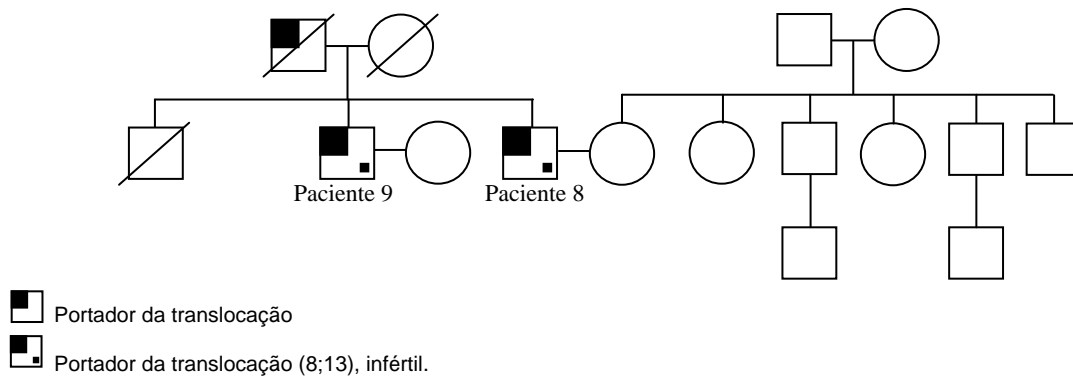


Figura 3. Heredograma da família 2

4.2. MATERIAL

De todos os pacientes foram coletadas três amostras de sangue periférico:

- Uma amostra colhida em tubo Vacutainer® de 5mL contendo heparina sódica, destinada à cultura temporária de linfócitos para obtenção de células metafásicas para estudo citogenético e análise por FISH.
- Duas amostras colhidas em tubo Vacutainer® de 5mL contendo EDTA, destinadas à extração de DNA e posterior análise pela técnica de *array*-CGH.

4.3. MÉTODOS

4.3.1. Citogenética Clássica

4.3.1.1. Cultura temporária de linfócitos (MOORHEAD et al., 1960, modificada):

Foram cultivados 500µL de sangue, coletado dos pacientes, em 5ml de meio RPMI 1640 (cat n° 11875, GIBCO, Invitrogen) com L-glutamina suplementado com 2% de fitohemaglutinina (cat n° 10576-015, GIBCO, Invitrogen), estreptomicina / penicilina (cat n°15140-148, GIBCO, Invitrogen) e 20% de soro bovino fetal (cat n° 12657-029, GIBCO, Invitrogen) em estufa a 37°C, por 72 horas. Meia hora antes de completar o tempo de cultura, foram adicionados ao meio 250µL de colchicina a 0,0016% (cat n° C3915-1G, Sigma), retornando assim à estufa pelo tempo restante, etapa em que as células são bloqueadas na fase de metáfase da divisão celular. Após meia hora, foi realizada a centrifugação a 1000 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e foram adicionados 5mL de solução hipotônica (KCl 0,075M) a 37°C. O material foi então incubado por 10 minutos em banho-maria a 37°C. No tubo foram adicionadas 10 gotas de solução Carnoy (3 metanol:1 ácido acético) para interromper a ação da hipotônica e, após homogeneização, foi realizada nova centrifugação por 10 minutos a 1000 RPM. O sobrenadante foi retirado e o material fixado pela adição de 5mL de solução Carnoy. O material foi homogeneizado e mantido por 10 minutos em repouso em temperatura ambiente. Em seguida, centrifugado a 1000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante removido. Esta etapa de lavagem pela adição de solução Carnoy foi repetida mais duas vezes, agora sem o tempo de repouso, e a suspensão celular resultante foi utilizada para a confecção de lâminas.

4.3.1.2. Coloração convencional:

As lâminas foram preparadas a partir de suspensão celular obtidas de cultura temporária de linfócitos descrita acima. Uma gota do material foi pingada em cada lâmina e esta corada por cinco minutos com Giemsa (Merck) em tampão fosfato 0,06M pH=6,8 (1:30) e lavadas com água corrente. Foram analisadas 20 metáfases de cada paciente para determinação do número total de cromossomos e em casos de suspeita de mosaicismo, o número foi aumentado para 100 metáfases de acordo com o protocolo de Hook e colaboradores (1983) para exclusão de mosaicismo com nível de confiabilidade de 3%.

4.3.1.3. Bandamento GTG (SCHERES, 1972):

As lâminas foram preparadas a partir de suspensão celular obtidas de cultura temporária de linfócitos. Uma ou duas gotas do material foram pingadas em cada lâmina, as quais, após mantidas em temperatura ambiente por três a 15 dias, foram mergulhadas em tripsina (DIFCO 1:250) diluída a 0,1% em tampão fosfato (0,06M pH6,8) por um a 20 segundos, dependendo do tempo de envelhecimento. A ação da tripsina foi neutralizada com água destilada e, em seguida, foram coradas com Giemsa (Merck), por 10 minutos.

Foram analisadas 20 metáfases de cada paciente para determinação do cariótipo. A análise microscópica foi realizada em microscópio Axio Imager.D2 (Zeiss), em objetiva Plan APO 100x, acoplado a sistema computadorizado de análise MetaSystems, utilizando o *software* IKARO para a documentação dos resultados.

4.3.2. Citogenética Molecular

4.3.2.1. Hibridação *In situ* Fluorescente –FISH:

Para a realização da técnica, foram utilizadas sondas Whole Chromosome Painting (WCP) para os cromossomos X (cat. n°LPP 0XR, Cytocell, UK) e 22 (cat. n° LPP 22G, Cytocell, UK) para os pacientes da família 1 e para os cromossomos 8 (cat. n° LPP 08R, Cytocell, UK) e 13 (cat. n°LPP 13G, Cytocell, UK) para os pacientes da família 2. Para os pacientes da família 1 também foram utilizadas sondas LSI DiGeorge/ VCFS TUPLE 1 (cat. n° LPU 004, Cytocell, UK) e Kallmann/ Steroid Sulphatase (cat. n° LPU 016, Cytocell, UK). O conjunto de sondas DiGeorge/ VCFS inclui duas sondas. A primeira marca em vermelho uma região de aproximadamente 120kb que cobre toda a região do gene *TUPLE1* e DNA flanqueador presente na região 22q11.2. A segunda sonda marca em verde a região subtelomérica do cromossomo 22, o que permite a identificação da maioria das deleções distais na região 22q13.3, utilizada como controle. O conjunto de sondas Kallmann/ Steroid Sulphatase possui uma sonda que marca em vermelho todo o gene *KAL1* e DNA flanqueador e outra que marca em verde a região do gene *STS* e DNA flanqueador, ambas presentes na região Xp22.3. A sonda centromérica DXZ1 (Xp11.1-q11.1), marcada em verde, foi utilizada como controle.

A técnica foi aplicada de acordo com protocolo do fornecedor, com pequenas modificações. As lâminas, contendo uma ou duas gotas de suspensão celular obtida de cultura temporária de linfócitos, foram deixadas em repouso por três dias para envelhecimento. Foram então lavadas em solução 2xSSC em temperatura ambiente por dois minutos. Em seguida, foram desidratadas em etanol 70%, 90% e 100%, em

temperatura ambiente, por dois minutos cada, e deixadas para secar. Após a secagem das lâminas, foram aplicados 10µl de sonda, previamente denaturada em banho-maria a 37°C por 10 minutos, em cada lâmina pré-aquecida a 42°C, coberta por lamínula e selada com *rubber cement* (Elmer's, USA). A hibridação ocorreu em *ThermoBrite* (Abbot Molecular, USA) mantendo temperatura inicial de 75°C por dois minutos e, então, reduzida para 37°, sendo o programa manualmente interrompido após aproximadamente 14 a 16 horas.

Após hibridação, as lamínulas foram retiradas e as lâminas submetidas a lavagem com 2x SSC / 0,3% Igepal CA-630 (Sigma), em banho-maria a 72°C, por dois minutos, com agitação. Posteriormente, as mesmas foram lavadas em solução 2xSSC por dois minutos. Finalmente, foram então aplicados 15µl de DAPI/*antifade* 1:1 (Vector Laboratories, CA, USA) sobre o material de interesse, coberto com lamínula e armazenado a -20°C, em recipiente escuro, por pelo menos duas horas antes da análise.

4.3.2.2. Metodologia de Análise:

Foram analisadas e documentadas dez metáfases por experimento, utilizando-se microscópio de fluorescência Axio Imager.D2 (Zeiss), objetiva Plan APO 100x, acoplado a um sistema computadorizado de análise (MetaSystems, Germany) do Laboratório de Citogenética do HCFMRP, por meio do software ISIS. Os critérios de análise de células metafásicas foram descritos por Bayani e Squire (2004). As metáfases foram selecionadas quando a marcação de hibridação era facilmente identificada, ou seja, quando sua intensidade era consistentemente maior que a intensidade de ligações não específicas ao citoplasma e restos celulares. Foram selecionadas apenas metáfases isoladas, sem sobreposições.

4.3.3. Citogenômica

4.3.3.1. Extração de DNA:

A extração de DNA foi realizada no laboratório de Ginecologia e Obstetrícia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. A técnica foi realizada por meio do método QIAamp DNA Blood Mini Kit – Qiagen (US), a partir de sangue total coletado dos pacientes. Na primeira etapa de lise das células sanguíneas, foram aliqüotados 200µL de amostra em um tubo de 1,5mL e adicionados 20µL de proteinase K e 200µL de tampão AL. O tubo então foi incubado por 10 minutos a 56°C e aplicada rotação de 30 segundos a 1200rpm, para remover gotas da tampa do tubo. Após esta etapa, foram adicionados 200µL de etanol 100%, homogeneizado no vórtex e novamente rotação de 30 segundos a 1200rpm. O material foi então transferido para a coluna e centrifugado a 8600rpm durante um minuto. Após o término da centrifugação, a coluna foi transferida para um tubo de 2mL limpo, sendo o sujo descartado. Foram adicionados 500µL do tampão AW1 e centrifugado a 8600rpm, por um minuto. Novamente a coluna foi transferida para um tubo limpo e adicionados 500µL de tampão AW2 e centrifugado à 13200rpm, por três minutos. Após nova troca de tubos, a coluna foi centrifugada a 14000rpm durante cinco minutos para secagem. Com novo tubo, foram adicionados à coluna 100µL de água Mili-Q, a 60°C, incubada durante cinco minutos em temperatura ambiente e centrifugada a 8600rpm durante cinco minutos. A eluição foi repetida, adicionando mais 100µL de água Mili-Q. Então, o volume total foi transferido para microtubos de 1,5mL, sendo estocados a -20°C após quantificação por NanoDrop, utilizando 2µL de cada amostra.

4.3.3.2. Array-CGH

A técnica de *array*-CGH foi realizada no Departamento de Patologia e Medicina Molecular da Queen's University, em Kingston, Canadá, no laboratório coordenado pelo Prof. Dr. Jeremy Squire.

Para a realização da técnica de *array*-CGH, foi utilizado o *chip* Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA). Essa plataforma possui 420.288 sondas em regiões não-variantes do genoma, em espaçamento médio de 5,3kb. Desta forma, a técnica permite a detecção de variações de número de cópias (CNVs), bem como sequências não relacionadas aCNVs em todo o genoma.

A primeira etapa após a extração de DNA foi a de fragmentação, realizada com o kit Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit (Agilent, USA). A solução de digestão foi preparada segundo protocolo para 16 reações, sendo oito para o DNA dos pacientes e oito para os DNAs controles feminino ou masculino, adquiridos da mesma empresa. Sendo assim, foram adicionados 34µL de água *nuclease-free*, 44,2µL de tampão 10x, 3,4µL de BSA acetilado (10mg/µL) e 8,5µL de cada uma das enzimas de restrição Alu I (10 U/µL) e Rsa I (10U/µL). 5,8µL deste mix foram adicionados a cada tubo de reação contendo 20,2µL de DNA genômico, completando um volume de 26µL. Os tubos foram então levados ao termociclador, programado para manter as amostras a 37°C por duas horas, em seguida a 65°C por 20 minutos, para inativação das enzimas, e então manter a 4°C até a finalização manual do programa. A verificação do tamanho dos fragmentos gerados foi feita com 2µL em gel de agarose 1%, devendo apresentar entre 200 a 800 bp.

Na segunda etapa, foi realizada a marcação do DNA teste e DNA controle com fluoróforos. Inicialmente, foram adicionados às amostras 5µL de *random primere* novamente submetidas ao termociclador, programado com dois passos: o primeiro de três minutos a 95°C e o segundo a 4°C até a finalização manual. Então, uma mistura de 8 reações para cada fluoróforo foi preparada segundo o protocolo. Foram adicionados 50µL de água *nuclease-free*, 250µL de tampão de reação 5x, 125µL de dNTPs 10x, 75µL do fluoróforo Cyanine 3-dUTP em um dos tubos e, no restante, 75µL do fluoróforo Cyanine 5-dUTP, e finalmente 25µL de ExoKlenow. Foram adicionados, então, 21µL do Mix de marcação em cada tubo de reação contendo o DNA genômico, totalizando um volume de 50µL cada. As amostras foram levadas ao termociclador, utilizando o mesmo programa da etapa de fragmentação.

A terceira etapa foi a de purificação, realizada com filtros Amicon 30kDa. Primeiramente, foram adicionados, a cada amostra, 430µL de TE 1x (pH 8.0). Os filtros foram posicionados em tubos de microcentrifuga e carregados com cada DNA marcado. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 14.000xg, em temperatura ambiente. Após o descarte do filtrado, foram adicionados mais 480µL de TE 1x, repetindo a centrifugação e o descarte do filtrado. O retido, juntamente com o filtro, foi vertido em novo tubo de microcentrifuga de 1,5mL e centrifugado por um minuto a 1.000x g, em temperatura ambiente, para coletar a amostra purificada. Então, foram coletados 1,5µL de cada amostra para a determinação do rendimento e da atividade específica. Para equiparar a marcação de todas as amostras, estas foram diluídas em TE 1x, conforme as concentrações de cada amostra, para finalizar um volume de 40µL cada, com níveis de marcações semelhantes. Finalmente, as amostras teste e controle, devidamente marcadas com cyanine-5 e cyanine-3, foram

combinadas em um único Mix, com adição de 2 μ L de TE 1x, completando um volume total final de 79 μ L.

A etapa seguinte foi a de preparação do DNA marcado para a hibridação. Nesta etapa, foi preparada uma solução de hibridação com 212,5 μ L de Cot-1 DNA (1,0mg/mL), 221 μ L de 10x aCGH Blocking Agent e 1.105 μ L de tampão de hibridação 2x HI-RPM. Um volume de 181 μ L foi adicionado em cada tubo contendo o DNA marcado, totalizando um volume de 260 μ L. Após mistura por pipetagem, as amostras foram levadas ao termociclador com um programa de três minutos a 95°C e 30 minutos a 37°C.

Na etapa de hibridação, 245 μ L do mix de hibridação misturados ao DNA foram depositados nos poços da lamínula, que foi unida virada para baixo a uma lâmina de hibridação e envolvida por uma câmara. Esta câmara foi colocada em prateleira rotatória em forno de hibridação a 65°C, 20rpm, por 40 horas.

Na etapa seguinte, foram feitas as pós-lavagens. Inicialmente, a lâmina e lamínula foram separadas manualmente e mergulhadas em tampão de lavagem OligoCGH I em temperatura ambiente. A lâmina teste foi então lavada, sendo a primeira lavagem feita com tampão OligoCGH I limpo, em temperatura ambiente por cinco minutos, com agitação magnética. A segunda lavagem foi feita com o tampão OligoCGH 2, a 37°C com agitação magnética por um minuto. Em seguida, as lâminas foram lavadas em acetonitrila, também em agitação magnética, por 10 segundos. As lâminas foram então mergulhadas em solução de estabilização e secagem, com a mesma agitação por 30 segundos.

Após as lavagens, as lâminas foram imediatamente posicionadas no suporte SureScan para serem escaneadas em seguida. Para o escaneamento das lâminas

de microarray, utilizamos o Agilent SureScan C Scanner e o *The Feature Extraction software* v10.5 foi usado para a análise das imagens.

4.3.3.3. Metodologia de Análise:

Os dados gerados foram interpretados pelo programa Nexus6.0, utilizando o *Fast Adaptive States Segmentation Technique* (FASST2) com um limiar de significância de $5.0e-6$ e um espaço máximo entre sondas adjacentes de 10.000kb. Sinais alterados incluindo quatro ou mais sondas adjacentes foram considerados como variações no número de cópias (CNVs). Foi considerado ganho um limiar de 0,5; alto ganho, limiares de 1,14; perdas, -0,5; e perdas em homozigose, 1,1.

A análise dos dados foi realizada por meio de pesquisa nos bancos de dados Gene Browser, PubMed e OMIM. Também foi utilizado o programa FatiGO, disponível online na plataforma Babelomics (Functional Analysis of Genome-scale Experiments)¹, para a identificação dos genes relacionadas à infertilidade por meio de busca baseada na participação dos mesmos em processos biológicos, funções moleculares e vias metabólicas, no banco de dados Gene Ontology e KEGG. Para a pesquisa, foram utilizadas as seguintes palavras-chave: *chromosome instability, spermatogenesis, infertility, fertility, reproduction*.

¹www.babelomics3.bioinfo.cipf.es

5. RESULTADOS

5.1. CITOGENÉTICA CLÁSSICA

Entre os membros da família 1, o cariótipo dos pacientes 1, 2 e 3 evidenciou translocação entre os cromossomos X e 22 (Figura 4, p.45) definidos como:

-Paciente 1: cariótipo

46,Y,t(X;22)(22qter→22q11.2::Xp22.3→Xqter;22pter→22q11.2::Xp22.3→Xpter)mat

-Paciente 2: cariótipo

46,X,t(X;22)(22qter→22q11.2::Xp22.3→Xqter;22pter→22q11.2::Xp22.3→Xpter)mat

-Paciente 3: cariótipo

46,X,t(X;22)(22qter→22q11.2::Xp22.3→Xqter;22pter→22q11.2::Xp22.3→Xpter)

O cariótipo do paciente 4 foi compatível com normalidade, assim como o resultado do paciente 6:

-Paciente 4: cariótipo 46,XY

-Paciente 6: cariótipo 46,XY

O cariótipo das pacientes 5 e 7 revelou um baixo grau de mosaicismo de síndrome de Turner, definido como:

- Paciente 5: cariótipo 45,X[09] / 46,XX[91] (Figura 5, p.45).

- Paciente 7: cariótipo 45,X[13] / 47,XXX[05] / 46,XX[82] (Figuras 6p.46).

Durante a análise e documentação fotográfica da paciente 5 observamos também uma célula 47,XXX e uma célula 48,XXXX mostrada na Figura 7 (p.46)

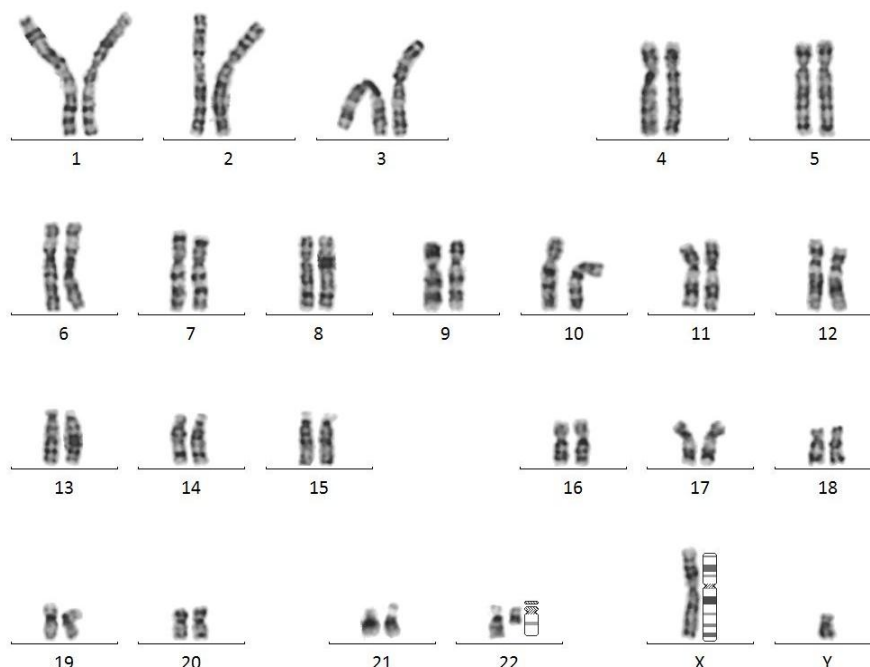


Figura 4. Cariótipo em bandamento GTG do paciente 1, com resultado 46,Y,t(X;22)(p22.3;q11.2), mostrando a translocação entre os cromossomos X e 22, com o ideograma do cromossomo correspondente ao lado dos cromossomos alterados.

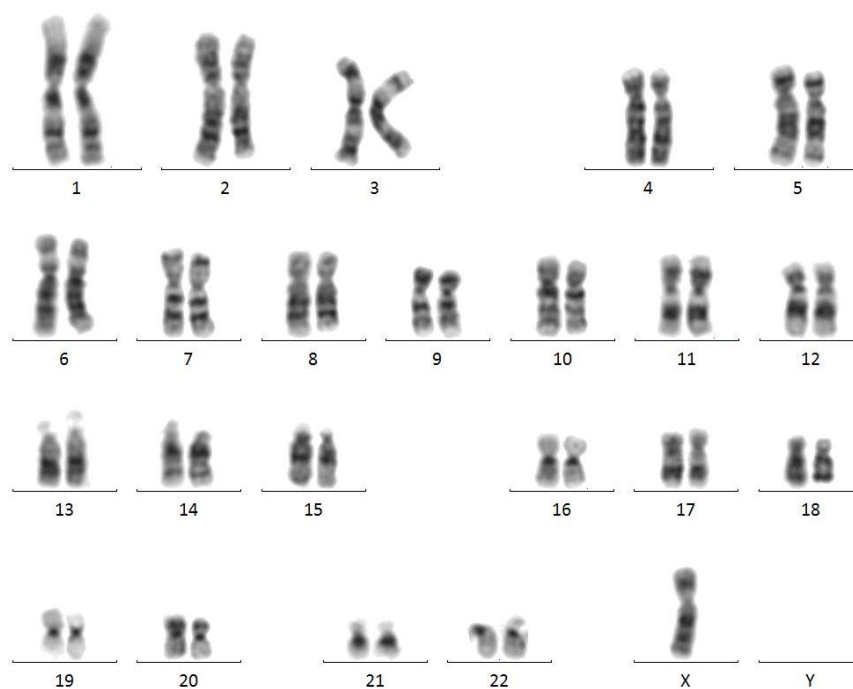


Figura 5. Cariótipo da paciente 5 em bandamento GTG evidenciando 45,X cromossomos.

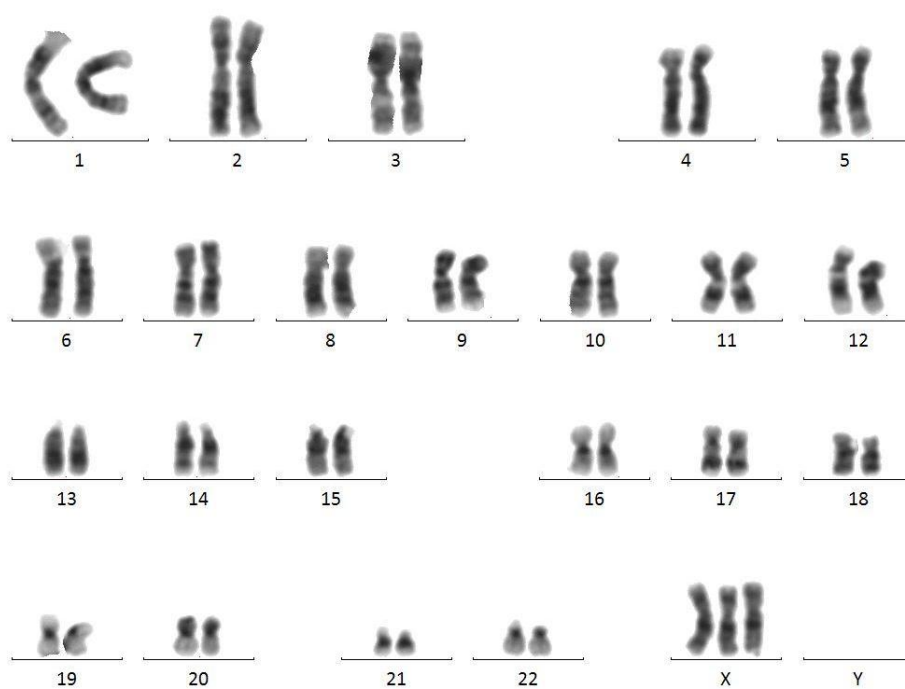


Figura 6. Cariótipo da paciente 7 em bandamento GTG evidenciando 47,XXX cromossomos.

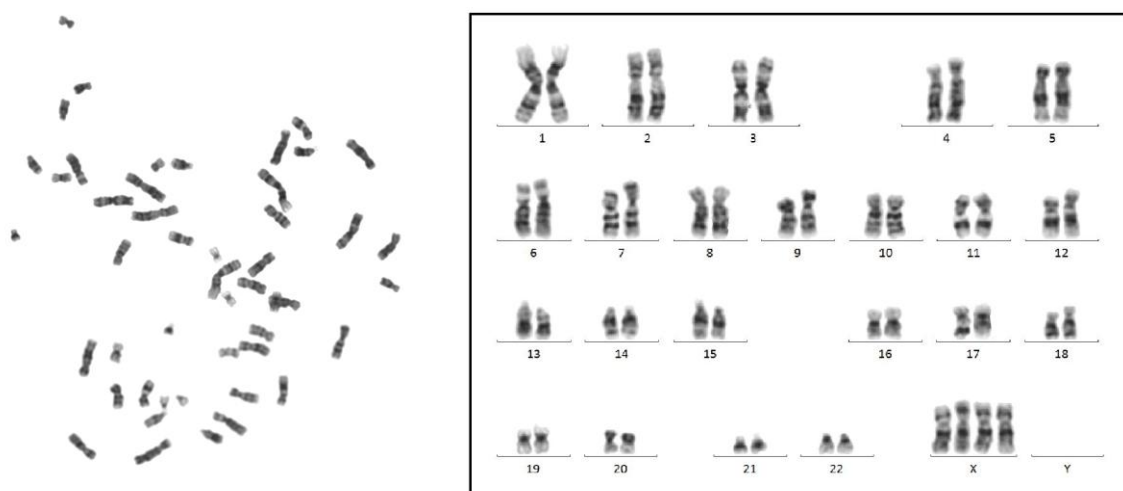


Figura 7. Metáfase e cariótipo da paciente 5 em bandamento GTG mostrando 48,XXXX cromossomos.

Nos indivíduos da família 2 (pacientes 8 e 9), o estudo citogenético evidenciou translocação entre os cromossomos 8 e 13 (Figura 8), com cariótipo 46,XY,t(8;13)(8pter→8q13::13q14→13qter;13pter→13q14::8q13→8qter)Pat.

Exames realizados anteriormente ao falecimento do pai mostraram que a translocação foi herdada, sendo seu cariótipo idêntico.

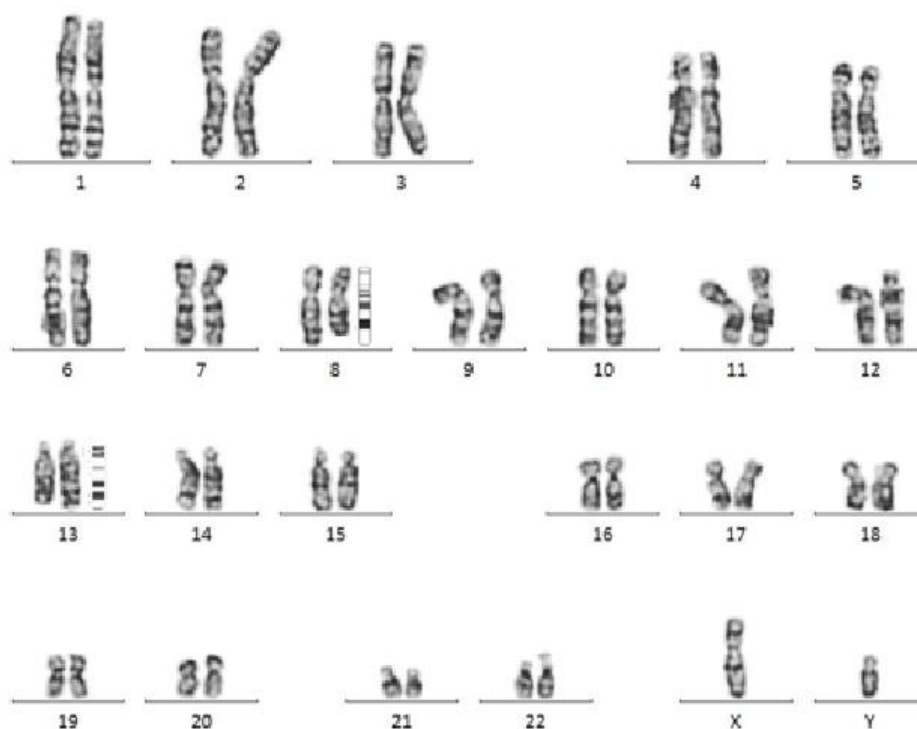


Figura 8. Cariótipo do paciente 8 em bandamento GTG, com resultado 46,XY,t(8;13)(q13;q14).

5.2. TÉCNICA DE FISH:

A técnica de FISH aplicada a metáfases do paciente 1, utilizando as sondas WCP 22 (marcada em verde) e WCP X (marcada em vermelho) evidenciou uma marcação vermelha única ao longo do cromossomo X normal e uma marcação vermelha ao longo do cromossomo X translocado além de uma marcação verde correspondente ao cromossomo 22. Observam-se uma marcação única, em verde,

ao longo do cromossomo 22 normal e um segundo sinal, de menor tamanho ao longo do cromossomo 22 translocado.

A investigação citogenética molecular por FISH aplicada a metáfases do paciente 8, utilizando as sondas WCP 8 (marcada em vermelho) e WCP 13 (marcada em verde) diagnosticou translocação recíproca entre os dois pares cromossômicos, evidenciado pela detecção de uma marcação vermelha única ao longo do cromossomo 8 normal e uma marcação vermelha ao longo do cromossomo 8 translocado além de uma marcação verde correspondente ao cromossomo 13. Observaram-se também uma marcação única, em verde, ao longo do cromossomo 13 normal e uma marcação verde ao longo do cromossomo 13 translocado além de uma marcação vermelha correspondente ao cromossomo 8.

Os resultados desta técnica estão ilustrados a seguir, nas figuras 9 e 10 (p.48 e 49), caracterizando os rearranjos (X;22) e (8;13), respectivamente.

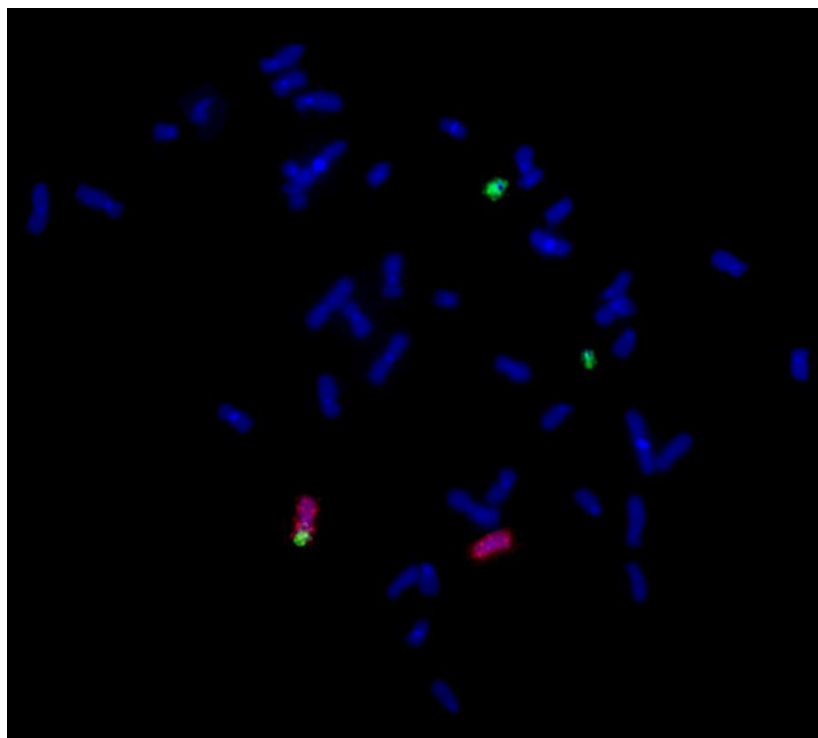


Figura 9. FISH mostrando a translocação (X;22) da paciente 3, por meio do uso de sondas WCP para os cromossomos X, em vermelho, e 22, em verde.

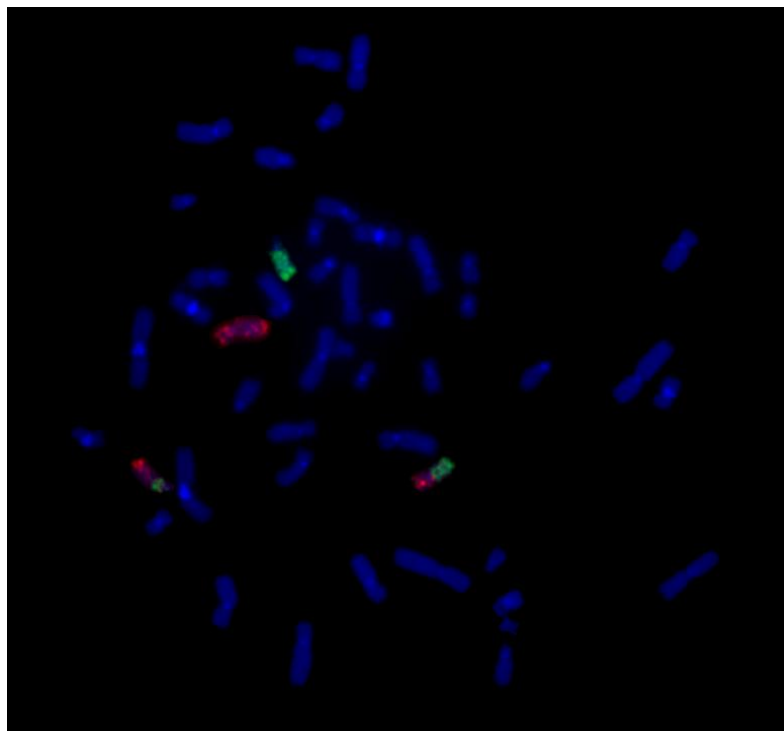


Figura 10. FISH mostrando a translocação (8;13) do paciente 8, por meio do uso de sondas WCP para os cromossomos 8, em vermelho, e 13, em verde.

Os experimentos de FISH com a sonda LSI para Kallmann/Steroid Sulphatase marcaram em vermelho o gene *KAL1* e DNA flanqueador e em verde a região do gene *STS* e DNA flanqueador, ambos presentes na região Xp22.3, marcando também a região centromérica em verde, como controle. Todas as sondas permaneceram marcadas no cromossomo X (Figura 11, p.50).

Já o experimento de FISH, em que foi utilizada a sonda LSI para DiGeorge/VCFS, evidenciou o rearranjo cromossômico ao marcar a sonda da região subteloamérica (N85A3) de um dos cromossomos 22 translocado para o braço curto do cromossomo X, mantendo a marcação para o gene *TUPLE1* e DNA flanqueador da região 22q11.21 no cromossomo 22 (Figura 12, p.50).

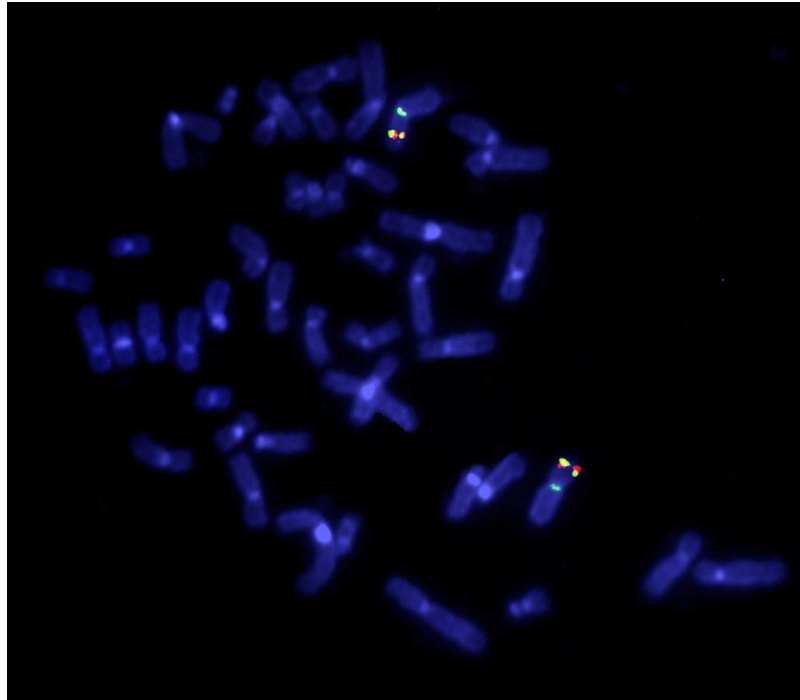


Figura 11. FISH realizado na paciente 3, com o uso da sonda LSI para Kallmann/Steroid Sulphatase, a qual marca em vermelho o gene *KAL1* e DNA flangeador e em verde a região do gene *STS* e DNA flangeador, ambos presentes na região Xp22.31, marcando também a região centromérica em verde, como controle.



Figura 12. FISH realizado no paciente 1 com o uso da sonda LSI para DiGeorge/VCFS a qual marca em vermelho o gene *TUPLE1* e DNA flangeador na região 22q11.21 e em verde a região subtelomérica do cromossomo 22 (N85A3).

Os resultados finais das técnicas de citogenética clássica e molecular aplicadas para diagnóstico citogenético dos pacientes das duas famílias analisadas estão listados na Tabela 3 e esquematizados na Figura 13 (p.52). A Figura 14 (p.52) mostra o heredograma final da família 1 com todos os resultados obtidos pela técnica de citogenética.

Tabela 3. Resultado dos cariótipos finais após aplicação das técnicas de bandamento GTG e FISH, de acordo coma ISCN 2009.

Paciente	Diagnóstico citogenético definitivo
1	46,Y,t(X;22)(p22.3;q11.2)mat[20].ish t(X;22)(N85A3+,wcpX+,wcp22+KAL1+,STS+;wcpX-,wcp22+,TUPLE1+)[10]
2	46,Y,t(X;22)(p22.3;q11.2)mat[20].ish t(X;22)(N85A3+,wcpX+,wcp22+KAL1+,STS+;wcpX-,wcp22+,TUPLE1+)[10]
3	46,Y,t(X;22)(p22.3;q11.2)[20].ish t(X;22)(N85A3+,wcpX+,wcp22+KAL1+,STS+;wcpX-,wcp22+,TUPLE1+)[10]
4	46,XY
5	45,X[09] / 46,XX[91]
6	46,XY
7	45,X[13] / 47,XXX[05] / 46,XX[82]
8	46,XY,t(8;13)(q13;q14)pat[20].ish t(8;13)(wcp8+wcp13+;wcp8+wcp13+)[10]
9	46,XY,t(8;13)(q13;q14)pat [20].ish t(8;13)(wcp8+wcp13+;wcp8+wcp13+)[10]

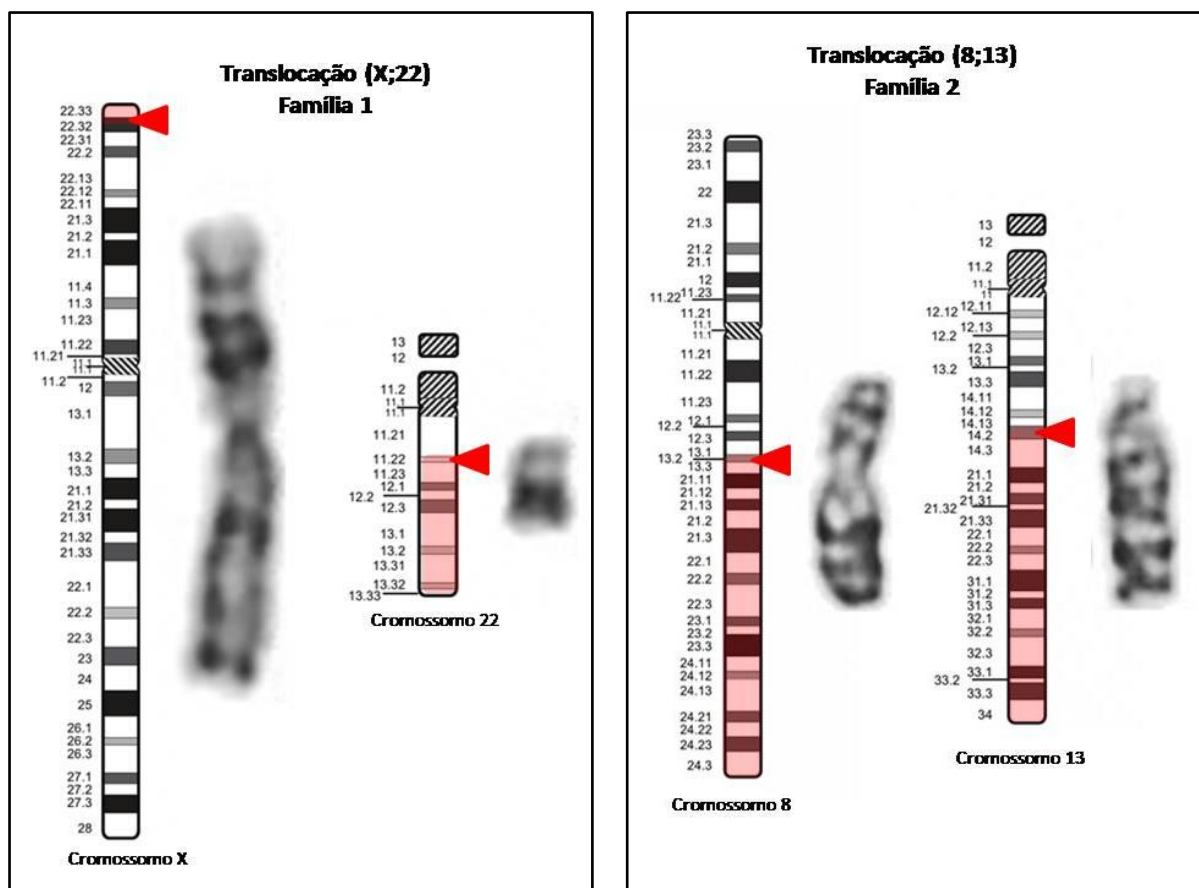


Figura 13. Esquema ilustrado dos resultados finais da família 1 à esquerda e da família 2 à direita. No retângulo à esquerda, o cromossomo à esquerda é o der(X) e à direita o der(22) com seus respectivos ideogramas. A seta representa o ponto de quebra aproximado e em vermelho, as regiões cromossômicas translocadas. No retângulo à direita, o cromossomo à esquerda é o der(8) e à direita o der(13) com seus respectivos ideogramas, com a seta representando o ponto de quebra aproximado e em vermelho, as regiões cromossômicas translocadas.

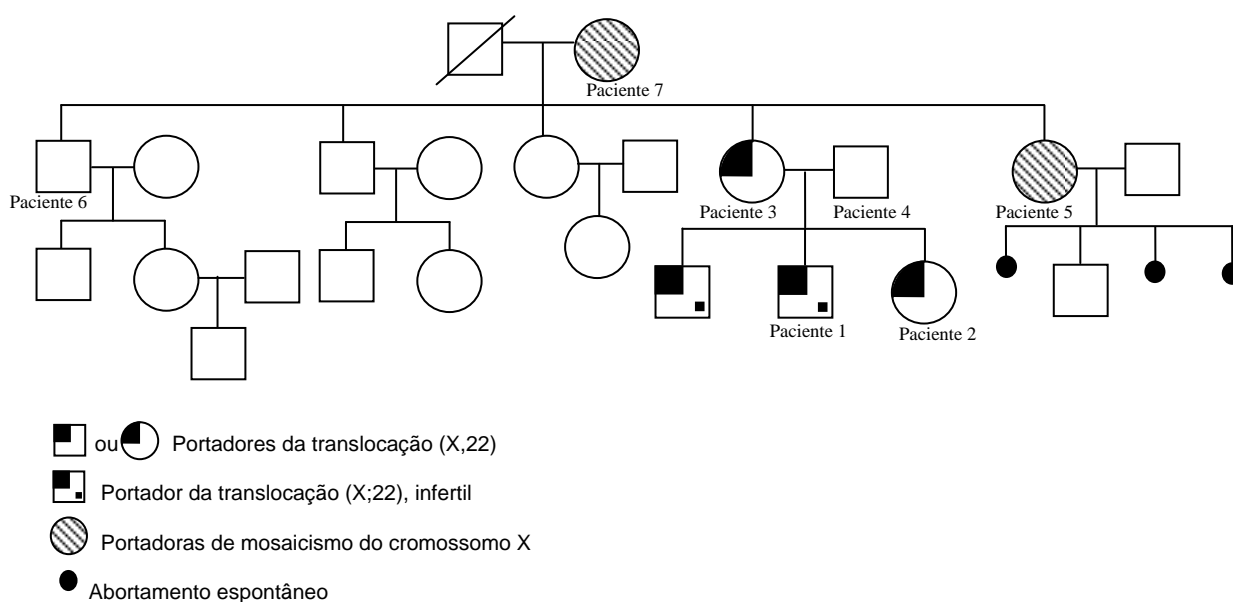


Figura 14. Heredograma final da família 1.

5.3. CITOGENÔMICA:

A técnica de *array*-CGH não foi realizada na paciente 2 por indisponibilidade de coleta do material, tendo sido realizada nos demais oito pacientes.

Na análise preliminar, foram detectadas 12 possíveis alterações no paciente 1. Dois altos ganhos: um de 39412bp no cromossomo 1 na região cromossômica 72,539,464-72,578,875 e outro de 51697bp, na região 17,600,000-19,493,856. Cinco ganhos: um no cromossomo 2 de 849573bp na região 89,630,201-90,479,773, um no cromossomo 12 de 21365bp na região 10,468,135-10,489,499, um no cromossomo 14 de 1893857bp na região 17,600,000-19,493,856, um no cromossomo 15 de 2283390bp na região 100,248,003-102,531,392 e um no cromossomo 16 de 692518bp na região 21,753,133-22,445,650. Quatro perdas: uma no cromossomo 6 de 218300bp na região 78,889,119-79,107,418, uma no cromossomo 8 de 147133bp na região 39,355,401-39,502,533, uma no cromossomo 11 de 63889bp na região 55,121,501-55,185,389 e a última no cromossomo 12 de 146771bp na região 31,151,042-31,297,812. As alterações detectadas pela técnica no paciente 1 seguem descritas na Tabela 4 (p.54 e 55), sendo relacionadas também ao grau de sobreposição à regiões de CNV e aos genes envolvidos em cada alteração.

Tabela 4. Alterações encontradas no paciente 1 pela técnica de *array*-CGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA).

Região Cromossômica	Evento	Tamanho (bp)	Banda cromossômica	% de sobreposição com CNV	Número de genes envolvidos	Símbolo dos genes
chr1:72,539,464-72,578,875	Alto ganho	39412	p31.1	0,0	1	<i>NEGR1</i>
chr2:89,630,201-90,479,773	Ganho	849573	p11.2	100,0	6	<i>AY685359, IGKV, IGVK-A2, IgK, O1/O11 and JK2, X63945</i>
chr6:78,889,119-79,107,418	Perda	218300	q14.1	100,0	0	
chr8:39,355,401-39,502,533	Perda	147133	p11.22	100,0	4	<i>ADAM18, ADAM3A, tMDC, tMDC III</i>
chr11:55,121,501-55,185,389	Perda	63889	q11	100,0	1	<i>OR4A15</i>
chr12:10,468,135-10,489,499	Ganho	21365	p13.2	0,0	2	<i>CD94 alt, KLRD1</i>
chr12:31,151,042-31,297,812	Perda	146771	p11.21	100,0	5	<i>AK096360, DDX11, DKFZp434C0631, LOC100506660, OVOS1</i>
chr14:17,600,000-19,493,856	Ganho	1893857	q11.1 - q11.2	26,06	1	<i>OR11H12</i>
chr14:20,430,890-20,492,106	Ganho	61217	q11.2	100,0	2	<i>OR4K14, OR4K15</i>
chr14:105,599,956-105,651,652	Alto ganho	51697	q32.33	100,0	3	<i>JAG2, NUDT14, UGPP</i>

Tabela 4. (Continuação) Lista das alterações encontradas no paciente 1, pela técnica de *array*-CGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA).

Região Cromossômica	Evento	Tamanho (bp)	Banda cromossômica	% de sobreposição com CNV	Número de genes envolvidos	Símbolo dos genes
chr15:100,248,003-102,531,392	Ganho	2283390	q26.3	9,09	126	ADAMTS17, AK126286, ALDH1A3, ASB7, BC032026, BC073817, CERS3, CHSY1, DDX11L9, DJ031154, DKFZp434I1020, DKFZp434K1323, DNM1P46, DQ570043, DQ570600, DQ570772, DQ570802, DQ570882, DQ570906, DQ571273, DQ571896, DQ573432, DQ573799, DQ573820, DQ574071, DQ574073, DQ574074, DQ574757, DQ574768, DQ575101, DQ575740, DQ576545, DQ576886, DQ576895, DQ576896, DQ576999, DQ577132, DQ577738, DQ578289, DQ578297, DQ578299, DQ580168, DQ582116, DQ582117, DQ582247, DQ582460, DQ582462, DQ582485, DQ582588, DQ582666, DQ583483, DQ583578, DQ584631, DQ585237, DQ585239, DQ586020, DQ586021, DQ586244, DQ586245, DQ586246, DQ586526, DQ587117, DQ587118, DQ588066, DQ588124, DQ588329, DQ588362, DQ588388, DQ588396, DQ588406, DQ588415, DQ588417, DQ588479, DQ588582, DQ588584, DQ591026, DQ591414, DQ592653, DQ593353, DQ593367, DQ593540, DQ593627, DQ593628, DQ593630, DQ593864, DQ594240, DQ595216, DQ596239, DQ596604, DQ596816, DQ597391, DQ597461, DQ597597, DQ597692, DQ597703, DQ597735, DQ598064, DQ598276, DQ599787, DQ600537, DQ601396, DQ601694, FAM138E, FLJ00038, FLJ42289, GPCRLTM7, KIAA1790, LASS3, LINS, LINS1, LOC100507472, LRRK1, LYSMD4, MEF2A, OR4F15, OR4F4, OR4F6, PACE4C, PCSK6, SELS, SNRPA1, TARSL2, TM2D3, WASH2P, WASH3P, WINS1
chr16:21,753,133-22,445,650	Ganho	692518	p12.2	100,0	22	AF086142, AK095585, C16orf52, C16orf65, CDR2, DKFZp779K0112, DQ584116, DQ596887, EEF2K, KIAA1452, LOC100131998, LOC23117, LOC730092, NPIPL3, NR_024104, OTOA, PDZD9, POLR3E, RRN3P1, RRN3P3, UQCRC2, VWA3A

Na paciente 3 foram detectadas 11 alterações. Três altos ganhos: um no cromossomo 1 de 39412bp na região 72,539,464-72,578,875, um no cromossomo 6 de 59245bp na região 29,956,856-30,016,100 e um no cromossomo 12 de 53334bp na região 9,549,012-9,602,345. Dois ganhos: um no cromossomo 14 de 51697bp na região 106,218,284-106,253,819 e um no cromossomo 16 de 692518bp na região 21,753,133-22,445,650. Cinco perdas: uma no cromossomo 1 de 320608bp na região 147,255,946-147,576,553, uma no cromossomo 8 de 153073bp na região 39,355,401-39,508,473, uma no cromossomo 14 de 35536bp na região 39,355,401-39,508,473, uma no cromossomo 22 de 57485bp na região 22,672,813-22,730,297 (ilustrada na Figura 15) e uma no cromossomo X de 40277bp na região 18,801-59,077 (ilustrada na Figura 16, p.57). As alterações detectadas pela técnica na paciente 3 seguem descritas na Tabela 5 (p.58).

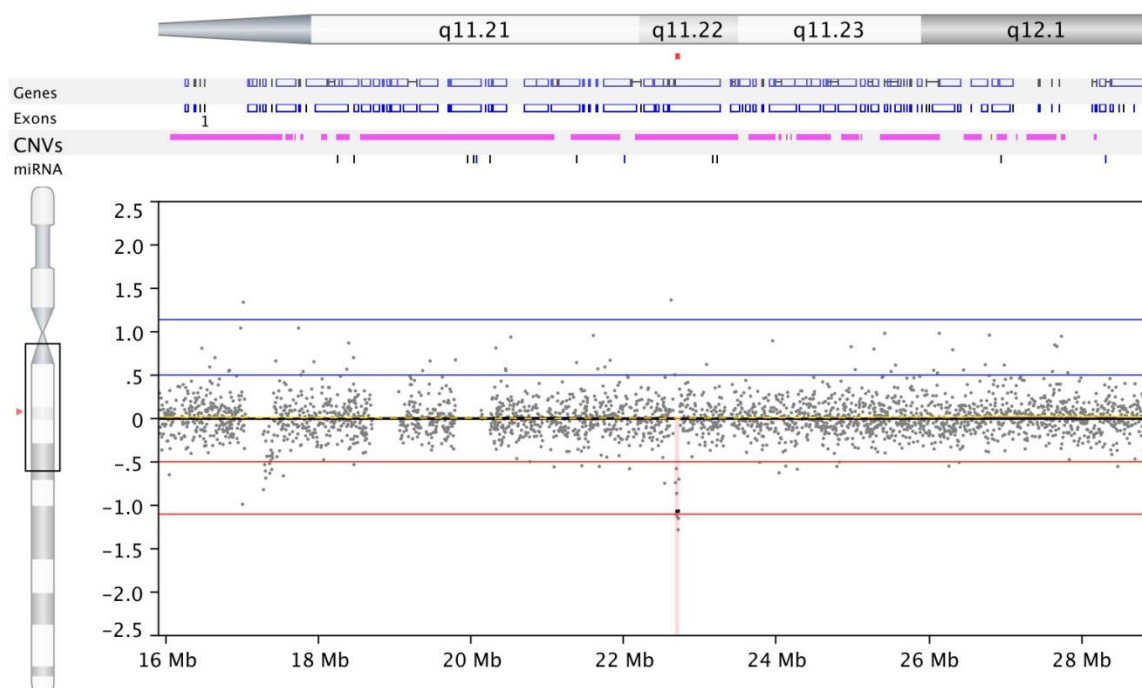


Figura 15. Gráfico em Zoom do cromossomo 22 da paciente 3, mostrando uma deleção de 57Kb na banda q11.22.

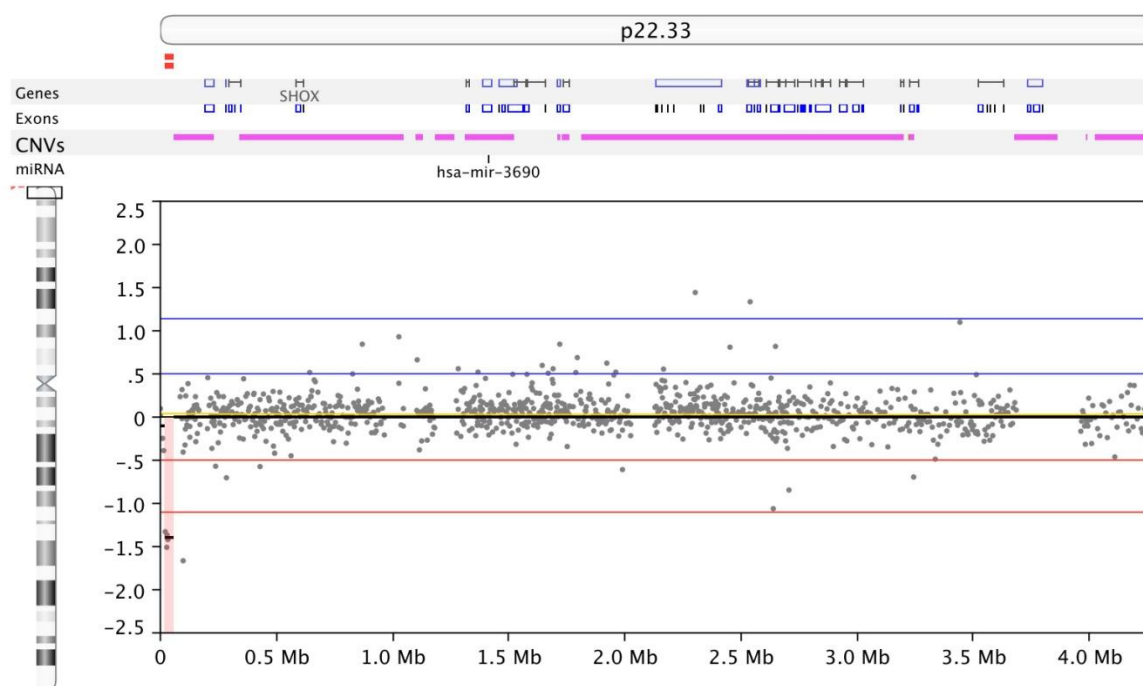


Figura 16. Gráfico em Zoom da região telomérica do cromossomo X do paciente 3, mostrando uma deleção de 40Kb na banda p22.33.

No paciente 4, foram detectadas 10 alterações. Quatro altos ganhos: um no cromossomo 1 de 39412bp na região 72,539,464-72,578,875, um no cromossomo 12 de 27264bp na região 11,114,771-11,142,034, um no cromossomo 14 de 51697bp na região 105,599,956-105,651,652 e um no cromossomo 22 de 30735bp na região 37,686,316-37,717,050. Quatro ganhos: um no cromossomo 2 de 1074415bp na região 89,405,359-90,479,773, dois no cromossomo 12 de 1893857bp e 66583bp nas regiões 17,600,000-19,493,856 e 20,425,524-20,492,106 respectivamente, e um no cromossomo 17 de 80395bp na região 41,568,555-41,648,949. Duas perdas: uma no cromossomo 6 de 135311bp na região 78,938,879-79,074,189 e uma no cromossomo 11 de 59726bp na região 55,121,501-55,181,226. As alterações detectadas no paciente 4 seguem descritas na Tabela 6 (p.59).

Tabela 5. Lista das alterações encontradas no paciente 3, pela técnica de *array*-CGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA).

Região Cromossômica	Evento	Tamanho (bp)	Banda cromossômica	% de sobreposição com CNV	Número de genes envolvidos	Símbolo dos genes
chr1:72,539,464-72,578,875	Alto ganho	39412	p31.1	0,0	1	<i>NEGR1</i>
chr1:147,255,946-147,576,553	Perda	320608	q21.2	100,0	8	<i>DKFZp434H1228, DKFZp451B1418, GJA8, GPR89A, GPR89B, GPR89C, NBPF1, NBPF11</i>
chr6:29,956,856-30,016,100	Alto ganho	59245	p22.1	4,67	6	<i>HLA-F, HLA-G, HTEX4, NCRNA00171, UNQ6501, ZNRD1-AS1</i>
chr8:39,355,401-39,508,473	Perda	153073	p11.22	100,0	4	<i>ADAM18, ADAM3A, tMDC, tMDC III</i>
chr12:9,549,012-9,602,345	Alto ganho	53334	p13.31	100,0	5	<i>BC047234, CHLR1, DDX11, DDX12, DDX12P</i>
chr14:17,600,000-19,493,856	Ganho	1893857	q11.1 - q11.2	26,06	1	<i>OR11H12</i>
chr14:105,599,956-105,651,652	Alto ganho	51697	q32.33	100,0	3	<i>JAG2, NUDT14, UGPP</i>
chr14:106,218,284-106,253,819	Perda	35536	q32.33	100,0	6	<i>DKFZp686O16217, FLJ00385, IGH@, IGHE, SNC73, abParts</i>
chr16:21,753,133-22,445,650	Ganho	692518	p12.2	100,0	22	<i>AF086142, AK095585, C16orf52, C16orf65, CDR2, DKFZp779K0112, DQ584116, DQ596887, EEF2K, KIAA1452, LOC100131998, LOC23117, LOC730092, NPIPL3, NR_024104, OTOA, PDZD9, POLR3E, RRN3P1, RRN3P3, UQCRC2, VWA3A</i>
chr22:22,672,813-22,730,297	Perda	57485	q11.22	100,0	2	<i>LOC96610, abParts</i>
chrX:18,801-59,077	Perda	40277	p22.33	0,0	0	

Tabela 6. Lista das alterações encontradas no paciente 4, pela técnica de *array*-CGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA).

Região Cromossômica	Evento	Tamanho (bp)	Banda cromossômica	% de sobreposição com CNV	Número de genes envolvidos	Símbolo dos genes
chr1:72,539,464-72,578,875	Alto ganho	39412	p31.1	0,0	1	<i>NEGR1</i>
chr2:89,405,359-90,479,773	Ganho	1074415	p11.2	100,0	7	<i>AY685359, IGKV, IGVK-A2, IgK, O1/O11 and JK2, X63945, abParts</i>
chr6:78,938,879-79,074,189	Perda	135311	q14.1	100,0	0	
chr11:55,121,501-55,181,226	Perda	59726	q11	100,0	1	<i>OR4A15</i>
chr12:11,114,771-11,142,034	Alto ganho	27264	p13.2	100,0	5	<i>PRB4, PRH1-PRR4, PROL4, PRR4, TAS2R50</i>
chr14:17,600,000-19,493,856	Ganho	1893857	q11.1 - q11.2	26,06	1	<i>OR11H12</i>
chr14:20,425,524-20,492,106	Ganho	66583	q11.2	100,0	2	<i>OR4K14, OR4K15</i>
chr14:105,599,956-105,651,652	Alto ganho	51697	q32.33	100,0	3	<i>JAG2, NUDT14, UGPP</i>
chr17:41,568,555-41,648,949	Ganho	80395	q21.31	100,0	2	<i>DHX8, ETV4</i>
chr22:37,686,316-37,717,050	Alto ganho	30735	q13.1	100,0	3	<i>CYTH4, FLJ00017, PSCD4</i>

Nove alterações foram encontradas na paciente 5. Quatro altos ganhos: um no cromossomo 5 de 17155bp na região 180,347,018-180,364,172, dois no cromossomo 6 de 59245bp e 65088bp nas regiões 29,956,856-30,016,100 e 79,025,925-79,091,012 respectivamente, e um no cromossomo 12 de 96011bp na região 9,522,358-9,618,368. Um ganho no cromossomo 14 de 201380bp na região 19,292,477-19,493,856. Quatro perdas: uma no cromossomo 1 de 320608bp na região 147,255,946-147,576,553, uma no cromossomo 14 de 35536bp na região 106,218,284-106,253,819, uma no cromossomo 15 de 1194005bp na região 19,000,000-20,194,004 e uma no cromossomo 19 de 34314bp na região 58,211,320-58,245,633. As alterações detectadas no paciente 5 seguem descritas na Tabela 7 (p.61).

No paciente 6 foram detectadas 11 alterações. Seis altos ganhos: dois no cromossomo 2 de 39412bp e 25804bp nas regiões 72,539,464-72,578,875 e 167,488,547-167,514,350 respectivamente, um no cromossomo 5 de 95558bp na região 180,268,615-180,364,172, um no cromossomo 6 de 59245bp na região 29,956,856-30,016,100, um no cromossomo 20 de 29410bp na região 1,509,076-1,538,485 e um no cromossomo 22 de 49967bp na região 22,672,813-22,722,779. Quatro ganhos: um no cromossomo 3 de 114983bp na região 163,992,372-164,107,354, um no cromossomo 4 de 324281bp na região 69,080,292-69,404,572, um no cromossomo 14 de 1893857bp na região 17,600,000-19,493,856 e um no cromossomo 17 de 41725bp na região 19,440,092-19,481,816. Uma única perda no cromossomo 12 de 35208bp na região 11,106,827-11,142,034. As alterações detectadas no paciente 6 seguem descritas na Tabela 8 (p.62).

Tabela 7. Lista das alterações encontradas no paciente 5 pela técnica de *array*-CGH, plataforma Huma Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA).

Região Cromossômica	Evento	Tamanho	Banda cromossômica	% de sobreposição com CNV	Número de genes envolvidos	Símbolo dos genes
chr1:147,255,946-147,576,553	Perda	320608	q21.2	100,0	8	<i>DKFZp434H1228, DKFZp451B1418, GJA8, GPR89A, GPR89B, GPR89C, NBPF1, NBPF11</i>
chr5:180,347,018-180,364,172	Alto ganho	17155	q35.3	100,0	1	<i>BTNL8</i>
chr6:29,956,856-30,016,100	Alto ganho	59245	p22.1	4,67	6	<i>HLA-F, HLA-G, HTEX4, NCRNA00171, UNQ6501, ZNRD1-AS1</i>
chr6:79,025,925-79,091,012	Alto ganho	65088	q14.1	100,0	0	
chr12:9,522,358-9,618,368	Alto ganho	96011	p13.31	100,0	5	<i>BC047234, CHLR1, DDX11, DDX12, DDX12P</i>
chr14:19,292,477-19,493,856	Ganho	201380	q11.2	100,0	1	<i>OR11H12</i>
chr14:106,218,284-106,253,819	Perda	35536	q32.33	100,0	6	<i>DKFZp686O16217, FLJ00385, IGH@, IGHE, SNC73, abParts</i>
chr15:19,000,000-20,194,004	Perda	1194005	q11.1	1,62	1	<i>AF245314</i>
chr19:58,211,320-58,245,633	Perda	34314	q13.43	0,0	3	<i>ZNF154, ZNF671, ZNF776</i>

Tabela 8. Lista das alterações encontradas no paciente 6 pela técnica de *array*-CGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA).

Região Cromossômica	Evento	Tamanho	Banda cromossômica	% de sobreposição com CNV	Número de genes envolvidos	Símbolo dos genes
chr1:72,539,464-72,578,875	Alto ganho	39412	p31.1	0,0	1	<i>NEGR1</i>
chr1:167,488,547-167,514,350	Alto ganho	25804	q24.2	5,69	1	<i>CREG1</i>
chr3:163,992,372-164,107,354	Ganho	114983	q26.1	16,9	0	
chr4:69,080,292-69,404,572	Ganho	324281	q13.2	7,28	5	<i>FLJ41562, TMPRSS11B, TMPRSS11BNL, TMPRSS11E, YTHDC1</i>
chr5:180,268,615-180,364,172	Alto ganho	95558	q35.3	100,0	2	<i>BTNL8, ZFP62</i>
chr6:29,956,856-30,016,100	Alto ganho	59245	p22.1	4,67	6	<i>HLA-F, HLA-G, HTEX4, NCRNA00171, UNQ6501, ZNRD1-AS1</i>
chr12:11,106,827-11,142,034	Perda	35208	p13.2	100,0	5	<i>PRB4, PRH1-PRR4, PROL4, PRR4, TAS2R50</i>
chr14:17,600,000-19,493,856	Ganho	1893857	q11.1 - q11.2	26,06	1	<i>OR11H12</i>
chr17:19,440,092-19,481,816	Ganho	41725	p11.2	0,0	1	<i>SLC47A1</i>
chr20:1,509,076-1,538,485	Alto ganho	29410	p13	100,0	1	<i>SIRPD</i>
chr22:22,672,813-22,722,779	Alto ganho	49967	q11.22	100,0	2	<i>LOC96610, abParts</i>

A paciente 7 apresentou 17 alterações. Quatro altos ganhos: dois no cromossomo 6 de 59245bp e 51251bp nas regiões 29,956,856-30,016,100 e 32,591,604-32,642,854 respectivamente, um no cromossomo 11 de 23915bp na região 5,740,514-5,764,428 e um no cromossomo 12 de 79988bp na região 9,522,358-9,602,345. Três ganhos: um no cromossomo 14 de 1893857bp na região 17,600,000-19,493,856, um no cromossomo 16 de 692518bp na região 21,753,133-22,445,650 e um no cromossomo 17 de 41725bp na região 19,440,092-19,481,816. Dez perdas: uma no cromossomo 1 de 320608bp na região 147,255,946-147,576,553, uma no cromossomo 2 de 40912bp na região 34,546,752-34,587,663, uma no cromossomo 3 de 114983bp na região 163,992,372-164,107,354, duas no cromossomo 12 de 35208bp e 57767bp nas regiões 11,106,827-11,142,034 e 31,240,046-31,297,812 respectivamente, uma no cromossomo 14 de 35536bp na região 106,218,284-106,253,819, uma no cromossomo 19 de 34314bp na região 58,211,320-58,245,633, uma no cromossomo 20 de 29410bp na região 1,509,076-1,538,485, uma no cromossomo 22 de 56836bp na região 17,340,027-17,396,862 e uma no cromossomo X de 40277bp na região 18,801-59,077. As alterações detectadas no paciente 7 seguem descritas na Tabela 9 (p.64).

Um gráfico comparativo das alterações encontradas em todo o genoma entre os pacientes da família 1 está ilustrado na Figura 17 (p.64).

Tabela 9. Lista das alterações encontradas no paciente 7 pela técnica de *array*-CGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA).

Região Cromossômica	Evento	Tamanho	Banda cromossômica	% de sobreposição com CNV	Número de genes envolvidos	Símbolo dos genes
chr1:147,255,946-147,576,553	Perda	320608	q21.2	100,0	8	<i>DKFZp434H1228, DKFZp451B1418, GJA8, GPR89A, GPR89B, GPR89C, NBPF1, NBPF11</i>
chr2:34,546,752-34,587,663	Perda	40912	p22.3	1,73	0	
chr3:163,992,372-164,107,354	Perda	114983	q26.1	16,9	0	
chr6:29,956,856-30,016,100	Alto ganho	59245	p22.1	4,67	6	<i>HLA-F, HLA-G, HTEX4, NCRNA00171, UNQ6501, ZNRD1-AS1</i>
chr6:32,591,604-32,642,854	Alto ganho	51251	p21.32	100.0	3	<i>HLA-DQ, HLA-DQA1, HLA-DQB1</i>
chr11:5,740,514-5,764,428	Alto ganho	23915	p15.4	100.0	3	<i>OR56B1, TRIM22, TRIM5</i>
chr12:9,522,358-9,602,345	Alto ganho	79988	p13.31	100.0	5	<i>BC047234, CHLR1, DDX11, DDX12, DDX12P</i>
chr12:11,106,827-11,142,034	Perda	35208	p13.2	100.0	5	<i>PRB4, PRH1-PRR4, PROL4, PRR4, TAS2R50</i>
chr12:31,240,046-31,297,812	Perda	57767	p11.21	100.0	3	<i>DDX11, DKFZp434C0631, OVOS1</i>
chr14:17,600,000-19,493,856	Ganho	1893857	q11.1 - q11.2	26,06	1	<i>OR11H12</i>
chr14:106,218,284-106,253,819	Perda	35536	q32.33	100.0	6	<i>DKFZp686O16217, FLJ00385, IGH@, IGHE, SNC73, abParts</i>
chr16:21,753,133-22,445,650	Ganho	692518	p12.2	100.0	22	<i>AF086142, AK095585, C16orf52, C16orf65, CDR2, DKFZp779K0112, DQ584116, DQ596887, EEF2K, KIAA1452, LOC100131998, LOC23117, LOC730092, NPIPL3, NR_024104, OTOA, PDZD9, POLR3E, RRN3P1, RRN3P3, UQCRC2, VWA3A</i>
chr17:19,440,092-19,481,816	Ganho	41725	p11.2	0.0	1	<i>SLC47A1</i>
chr19:58,211,320-58,245,633	Perda	34314	q13.43	0.0	3	<i>ZNF154, ZNF671, ZNF776</i>
chr20:1,509,076-1,538,485	Perda	29410	p13	100.0	1	<i>SIRPD</i>
chr22:17,340,027-17,396,862	Perda	56836	q11.1	100.0	1	<i>DQ841025</i>
chrX:18,801-59,077	Perda	40277	p22.33	0.0	0	

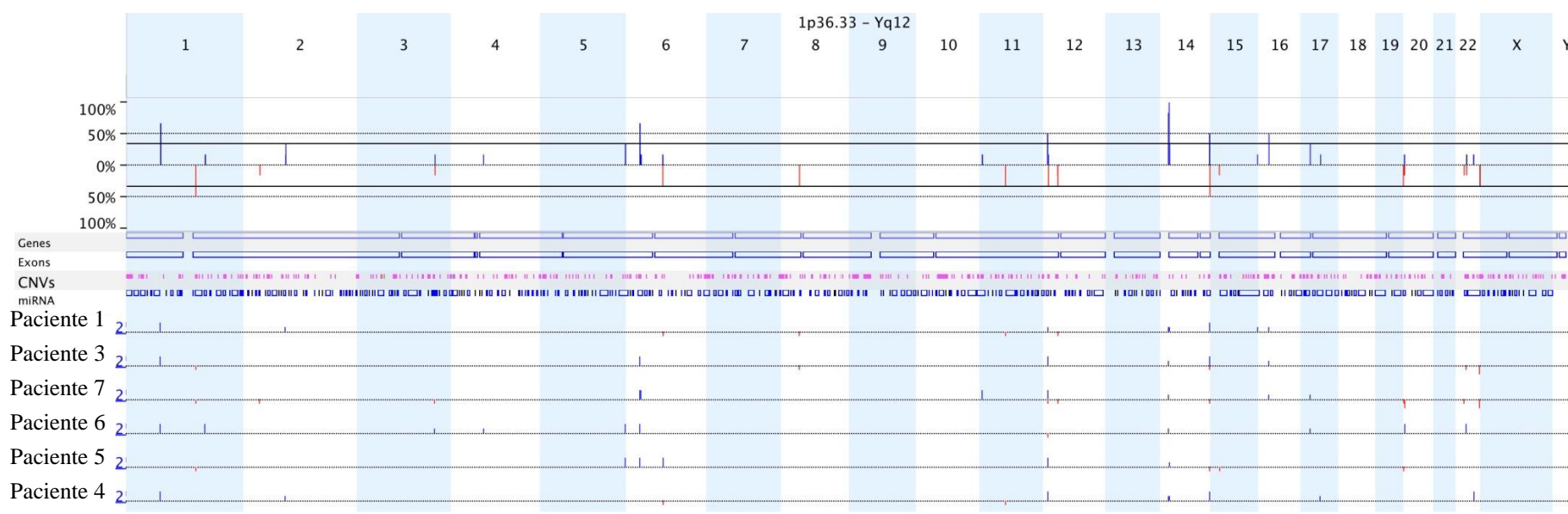


Figura 17. Gráfico comparativo das alterações encontradas em todo o genoma entre os pacientes da família 1, ilustrando em cima as alterações em conjunto e abaixo as alterações individuais de cada paciente.

Foram detectadas 6 alterações no paciente 8. Um alto ganho no cromossomo 8 de 158628bp na região 39,349,846-39,508,473 (ilustrado na Figura 18). Três ganhos: um no cromossomo 15 de 143632bp na região 32,485,744-32,629,375, um no cromossomo 17 de 125591bp na região 41,551,251-41,676,841 e um no cromossomo 22 de 255489bp na região 23,995,864-24,251,352. Uma perda no cromossomo 22 de 38845bp na região 22,691,453-22,730,297. Uma perda em homozigose no cromossomo 12 de 79988bp na região 9,522,358-9,602,345. As alterações detectadas no paciente 8 seguem descritas na Tabela 10 (p.67).

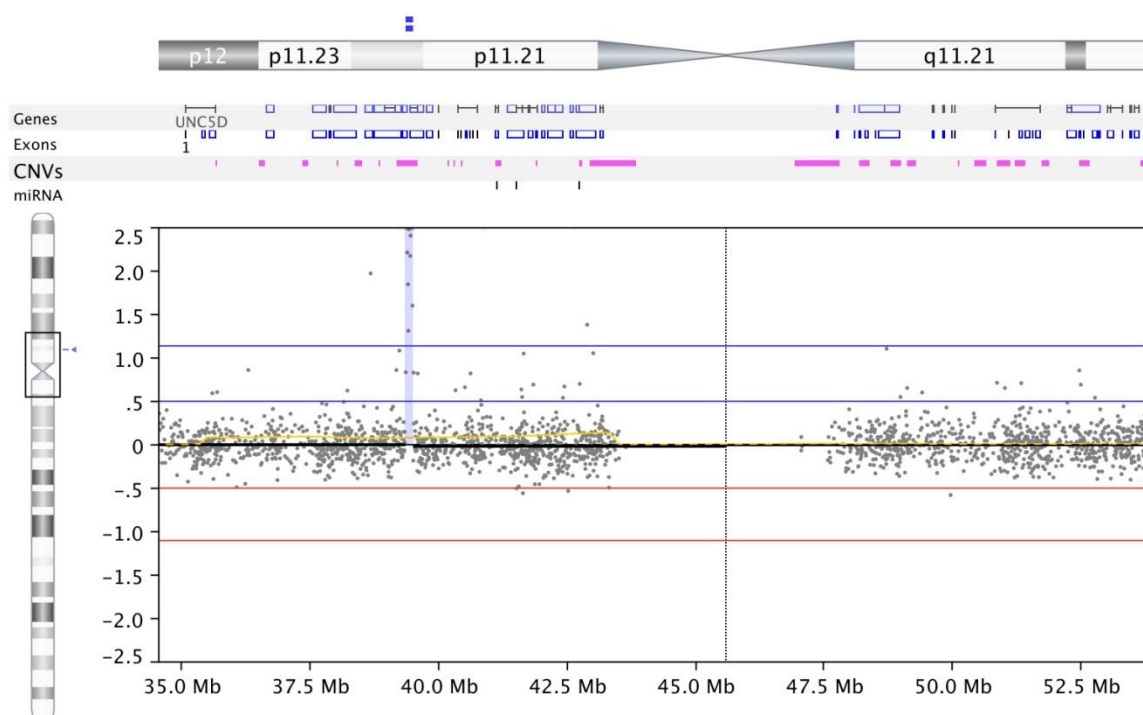


Figura 18. Gráfico em Zoom da região centromérica do cromossomo 8 do paciente 8, mostrando uma duplicação 0,16Mb na banda p11.21.

Tabela 10. Lista das alterações encontradas no paciente 8, pela técnica de *array*-CGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA).

Região Cromossômica	Evento	Tamanho (bp)	Banda cromossômica	% de sobreposição com CNV	Número de genes envolvidos	Símbolo dos genes
chr8:39,349,846-39,508,473	Alto ganho	158628	p11.22	100,0	4	<i>ADAM18, ADAM3A, tMDC, tMDC III</i>
chr12:9,522,358-9,602,345	Perda em homozigose	79988	p13.31	100,0	5	<i>BC047234, CHLR1, DDX11, DDX12, DDX12P</i>
chr15:32,485,744-32,629,375	Ganho	143632	q13.3	100,0	1	<i>DKFZp434L187</i>
chr17:41,551,251-41,676,841	Ganho	125591	q21.31	100,0	2	<i>DHX8, ETV4</i>
chr22:22,691,453-22,730,297	Perda	38845	q11.22	100,0	1	<i>abParts</i>
chr22:23,995,864-24,251,352	Ganho	255489	q11.23	20,44	19	<i>AK126511, BC036909, C22orf15, CHCHD10, DDT, DERL3, DQ579704, DQ595330, GUSBP11, Ini1, LOC284889, LOC91316, MIF, MMP11, RGL4, SLC2A11, SMARCB1, VPREB3, ZNF70</i>

Seis alterações foram detectadas também no paciente 9. Três ganhos: um no cromossomo 1 de 94927bp na região 246,781,814-246,876,740, um no cromossomo 3 de 76116bp na região 164,031,239-164,107,354 e um no cromossomo 22 de 258034bp na região 23,993,319-24,251,352. Duas perdas: uma no cromossomo 8 de 2906198bp na região 42,693,803-45,600,000 e outra no cromossomo 22 de 57485bp na região 22,672,813-22,730,297 (ilustrada na Figura 19). Uma perda em homozigose no cromossomo 12 de 96011bp na região 9,522,358-9,618,368. As alterações detectadas no paciente 9 seguem descritas na Tabela 11 (p.69).

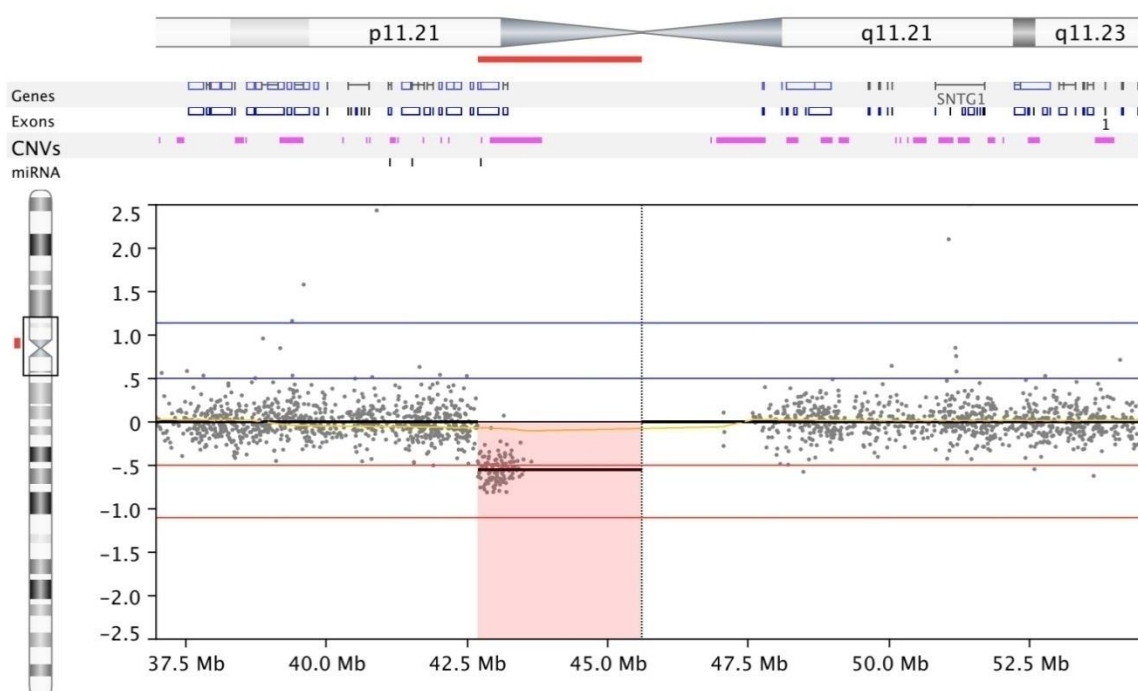


Figura 19. Gráfico em Zoom da região centromérica do cromossomo 8 do paciente 9, mostrando uma deleção de 2,9Mb na banda p11.21 e centrômero.

Tabela 11. Lista das alterações encontradas no paciente 9, pela técnica de *array*-CGH, plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K (Agilent, USA).

Região Cromossômica	Evento	Tamanho	Banda cromossômica	% de sobreposição com CNV	Número de genes envolvidos	Símbolo dos genes
chr1:246,781,814-246,876,740	Ganho	94927	q44	11,53	2	<i>C1orf71, CNST</i>
chr3:164,031,239-164,107,354	Ganho	76116	q26.1	0,95	0	
chr8:42,693,803-45,600,000	Perda	2906198	p11.21 - q11.1	3,23	8	<i>FNTA, HGSNAT, HOOK3, MIR4469, POTEA, RNF170, SGK196, THAP1</i>
chr12:9,522,358-9,618,368	Perda em homozigose	96011	p13.31	100,0	5	<i>BC047234, CHLR1, DDX11, DDX12, DDX12P</i>
chr22:22,672,813-22,730,297	Perda	57485	q11.22	100,0	2	<i>LOC96610, abParts</i>
chr22:23,993,319-24,251,352	Ganho	258034	q11.23	2,02	19	<i>AK126511, BC036909, C22orf15, CHCHD10, DDT, DERL3, DQ579704, DQ595330, GUSBP11, Ini1, LOC284889, LOC91316, MIF, MMP11, RGL4, SLC2A11, SMARCB1, VPRESB3, ZNF70</i>

6. DISCUSSÃO

O presente estudo descreve as alterações cromossômicas encontradas em duas famílias portadoras de translocações aparentemente equilibradas em pacientes com fenótipo de infertilidade masculina, relacionando também alterações genômicas que possam estar envolvidas no fenótipo de infertilidade.

Foram avaliados sete indivíduos da família 1, sendo que o paciente 1 apresentava infertilidade, com azoospermia. A investigação citogenética dos familiares detectou que a translocação (22;X) presente neste paciente, também foi evidenciada em sua irmã (paciente 2) sendo de herança materna (paciente 3). Inesperadamente, foi encontrado nas pacientes 5 e 7 (irmã e mãe da paciente 3, respectivamente) um mosaicismismo cromossômico caracterizado por linhagem celular normal, linhagem 45,X e linhagem 47,XXX, com diagnóstico citogenético compatível com síndrome de Turner.

Mosaicismismo cromossômico é definido como a coexistência de duas ou mais linhagens celulares geneticamente diferentes em um mesmo organismo, desenvolvido a partir de um único zigoto. Sendo assim, a condição não é herdável, ocorrendo sempre a partir de alterações pós-zigóticas. Hoje sabe-se que, em casos de mosaicismismo, linhagens celulares geneticamente alteradas podem surgir a partir de erros mitóticos em células normais, mas também existem casos em que uma nova linhagem de células, normais ou não, surge a partir de múltiplos eventos de resgate trissômico ou monossômico em células alteradas. Os eventos de resgate, tanto trissômicos como monossômicos, são bastante reconhecidos como causas de dissomias uniparentais (KAGAMI et al., 2012; KOTZOT, 2001; SHAFFER et al., 2001;) e têm sido associados também à origem de marcadores cromossômicos em casos de resgate trissômico incompleto (VETRO et al. 2012).

Recentemente, uma grande instabilidade cromossômica tem sido detectada por estudos da embriogênese humana (MANTZOURATOU; DELHANTY, 2011; VENNESTE et al. 2009; VOET et al. 2011), evidenciando a possibilidade de eventos independentes de resgate trissômico ou monossômico acontecerem em um único indivíduo. Venneste e colaboradores (2009) analisaram a constituição genética de blastômeros de 23 embriões de mulheres jovens submetidas à fertilização *in vitro* por riscos genéticos não relacionados à infertilidade. Desequilíbrios de cromossomos inteiros foram detectados em 19 embriões. Entre eles, três mostraram a mesma aneuploidia em todos os blastômeros, sugerindo que a alteração tenha sido causada por não-disjunção meiótica. Todos os demais embriões mostraram aneuploidias em mosaicismo com ou sem linhagens normais, com uma ou mais linhagens alteradas.

Apesar de haver descrições de casos de mosaicismo em que a linhagem alterada foi a herdada, e não a normal (ROBBERECHT et al., 2012), não foram encontrados na literatura relatos de recorrência de mosaicismos idênticos entre membros de uma mesma família. Em ambas pacientes 5 e 7, é provável que o cariótipo mosaico com linhagens normal, monossômica e trissômica para o cromossomo X tenha surgido por não disjunção cromossômica, a partir de um zigoto cromossomicamente normal. Porém, sendo as pacientes 7 e 5 mãe e filha, respectivamente, é improvável que o erro pós-zigótico, supostamente casual, tenha ocorrido por coincidência. É possível que, ao menos na paciente 5, o desequilíbrio genético tenha sido herdado, mais provavelmente a trissomia do X, sendo as duas linhagens celulares, normal e monossômica, decorrentes de eventos independentes de resgate cromossômico. A detecção de uma célula 48,XXXX sugere a possibilidade de um dos eventos de resgate de uma célula triplo X ter desencadeado

o surgimento de uma linhagem celular 46,XX e outra 48,XXXX, sendo a linhagem normal fortemente selecionada, e a linhagem alterada, reprimida. A detecção de apenas uma célula trissômica para o cromossomo X sugere que essa linhagem tenha sido fortemente reprimida, uma vez que a mesma aneuploidia foi detectada em sua mãe, paciente 7.

Provavelmente, a translocação (X;22) encontrada na paciente 3 teve também origem de um gameta alterado de sua mãe (a paciente 7). Os cromossomos 21 e 22 são os dois menores cromossomos autossômicos e, em média, cada um se liga ao seu homólogo por apenas um ou dois quiasmas durante a meiose. Assim, diferentemente dos cromossomos maiores, a perda de um único quiasma entre os cromossomos 21 ou 22 é passível de causar erros de pareamento e migração cromossômica durante a meiose (HALL et al., 2007). Estudos também mostram que o pareamento entre cromossomos trissômicos é mais lento do que entre dissômicos. Além disso, o pareamento entre cromossomos maiores por si só ocorre mais lentamente (ROBLES et al., 2007). Desta forma, é provável que o não pareamento correto entre os cromossomos 22 em um gameta da paciente 7 tenha induzido o pareamento com um cromossomo X único ou extra, não pareado de forma trivalente, seguido por recombinação não homóloga dando origem assim à translocação.

Já a transmissão das alterações cromossômicas da paciente 3, mãe dos pacientes 1 e 2 ocorreu de forma direta, por produção de gametas portadores das translocações de forma equilibrada, semelhante à própria constituição genômica do progenitor.

A técnica de FISH confirmou o rearranjo X;22 na família 1, com detecção de região cromossômica do 22 no cromossomo X, porém, não foi possível visualizar qualquer marcação de segmento do cromossomo X translocado no cromossomo 22,

provavelmente por se tratar de um fragmento muito pequeno. Possivelmente, a translocação envolveu as bandas mais distais do cromossomo X, como p22.32 ou p22.33, uma vez que nenhum dos genes *KAL1* e *STS* presentes na banda p22.31 foram visualizados translocados no cromossomo 22 quando utilizamos a sonda de cópia única, LSI Kallmann/Steroid Sulphatase. Já o ponto de quebra no cromossomo 22 dos pacientes portadores da translocação ocorreu entre a banda cromossômica q11.21 e a região subtelomérica uma vez que a sonda marcadora da região subtelomérica do cromossomo 22 foi visualizada na porção terminal do braço curto do cromossomo X translocado, enquanto a sonda para o gene *TUPLE1*, presente na banda q11.21, permaneceu no cromossomo 22 translocado. Assim o diagnóstico citogenético definitivo para os pacientes 1, 2 e 3 foram:

Paciente 1: 46,Y,t(X;22)(22qter→22q11.2::Xp22.3→Xqter;22pter→22q11.2::Xp22.3→Xpter)mat[20].ish t(X;22)(N85A3+, wcpX+, wcp22+, KAL1+, STS+; wcpX-,wcp22+,TUPLE1+)[10]

Paciente 2: 46,X,t(X;22)(22qter→22q11.2::Xp22.3→Xqter;22pter→22q11.2::Xp22.3→Xpter)mat[20].ish t(X;22)(N85A3+,wcpX+,wcp22+,KAL1+,STS+;wcpX-,wcp22+,TUPLE1+)[10]

Paciente 3: 46,X,t(X;22)(22qter→22q11.2::Xp22.3→Xqter;22pter→22q11.2::Xp22.3→Xpter)[20].ish t(X;22)(N85A3+,wcpX+,wcp22+,KAL1+,STS+;wcpX-,wcp22+,TUPLE1+)[10]

Para confirmação precisa dos pontos de quebra cromossômica do rearranjo, sugerimos posterior realização da técnica de Mbanding-FISH (Multicolor-banding fluorescence *in situ* hybridization).

Foram avaliados dois pacientes (8 e 9) da família 2, sendo ambos oligozoospermicos, portadores de rearranjo aparentemente equilibrado entre os

cromossomos 8 e 13. Infelizmente, por motivo de falecimento, não foi possível a realização da técnica de *array*-CGH nos progenitores dos pacientes 8 e 9. Entretanto, a realização prévia da técnica de bandeamento GTG revelou que a translocação (8;13) detectada em ambos apresentava herança paterna. As técnicas de FISH realizadas confirmaram a presença da translocação, permitindo boa visualização dos grandes segmentos envolvidos e confirmando a translocação recíproca entre os pares 8 e 13, com diagnóstico citogenético definitivo de 46,XY,t(8;13)(8pter→8q13::13q14→13qter; 13pter→13q14::8q13→8qter)pat[20].ish t(8;13)(wcp8+wcp13+;wcp8+wcp13+)[10].

Para a técnica de *array*-CGH, a plataforma Human Genome CGH Microarray Kit, 2x400K da Agilent (USA) foi escolhida a partir de relatos da literatura como o de Zhang e colaboradores (2008). Neste trabalho, os autores comparam a performance de 4 plataformas de *array*-CGH com resoluções teoricamente semelhantes, classificando a plataforma da empresa Agilent como sendo de boa performance, assim como as demais plataformas, mas destacando-se por possuir um pacote de software preciso e fácil de usar.

Os resultados não evidenciaram perdas ou ganhos genômicos nas regiões cromossômicas envolvidas nas translocações detectadas nos pacientes inférteis de ambas as famílias.

No entanto, na paciente 3, mãe do paciente 1, foram detectadas pequenas perdas genômicas nas regiões cromossômicas envolvidas na translocação. No cromossomo X, houve uma perda em homozigose de 40kb na extremidade do braço curto, banda p22.33. No cromossomo 22 houve uma perda de 57Kb na banda q.11.22. As alterações podem não ter sido detectadas no paciente 1 em decorrência do DNA controle ser diferente em relação a sua mãe, que, apesar de serem ambos

provenientes de indivíduos normais, homem e mulher respectivamente, apresentam variações normais no número de cópias, gerando detecções algumas vezes levemente diferenciadas. Desta forma, as alterações encontradas podem inferir os pontos de quebra na família 1, como sendo p22.33 no cromossomo X e 22q.11.22 no cromossomo 22.

Nos pacientes 8 e 9, não foram encontradas alterações nos pontos de quebra, porém, foram detectadas alterações em outras regiões do cromossomo 8, envolvido na translocação. Uma perda de 2,9Mb no cromossomo 8 foi detectada na região p11.21-q11.1 no paciente 9, deletando grande parte da região centromérica, a aproximadamente 25Mb de distância do provável ponto de quebra. Já no paciente 8, foi detectada uma duplicação de 159Kb na região p11.22 do mesmo cromossomo, aproximadamente 30Mb distante do provável ponto de quebra.

Das doze alterações encontradas no paciente 1, três foram *de novo* e as demais nove foram herdadas, sete de seu pai e duas de sua mãe. As alterações herdadas do pai, o qual não apresenta problemas de fertilidade, tratam-se provavelmente de alterações benignas, sem significado. As alterações *de novo* foram: um ganho e uma perda no cromossomo 12, nas regiões 10,468,135-10,489,499 e 31,151,042-31,297,812, respectivamente, e um ganho no cromossomo 15, na região 100,248,003-102,531,392.

A alteração *de novo*, encontrada no cromossomo 15, foi caracterizada por uma duplicação de 2,3Mb na extremidade terminal do braço longo, banda q26.3, sendo a região apenas 9,1% sobreposta a uma região de CNV. Entre os genes e transcritos envolvidos estão 132 piRNAs (Piwi-interacting RNAs). Se tratam de RNAs não codificantes presentes nas células germinativas que se associam a proteínas Piwi (*P-element induced wimpy testis*) para formar um complexo ativo, capaz de

reconhecer e induzir o silenciamento de elementos transponíveis complementares. Os elementos transponíveis são parasitas genômicos que colocam em risco a integridade do genoma hospedeiro. Eles podem se mover e se inserir em locos por transposição, podendo causar a disrupção de genes.

A literatura mostra que existem milhares, se não milhões, de sequências individuais de piRNAs. Apesar da diversidade, a maioria dos piRNAs são mapeados em um número relativamente reduzido de locos no genoma, sendo que as sequências codificadoras podem se sobrepor umas às outras dentro de um cluster. Gu e colaboradores (2010) evidenciaram que alterações genéticas em genes da via piRNA podem contribuir para prejuízos na espermatogênese. Os autores, porém, estudaram as alterações nos genes Piwi apenas na população chinesa e a literatura não aborda alterações em sequências de piRNAs. Sendo os genes Piwi funcionais em interação com os piRNAs, é possível que as alterações em regiões codificadores dos piRNAs também tragam consequências à fertilidade. A duplicação da região genômica codificadora de piRNAs no paciente 1 claramente não representou uma melhoria na produção espermática. Porém, duplicações não representam necessariamente um aumento da expressão dos genes envolvidos. Vários autores relataram raros casos de correlação negativa entre o número de cópias e a expressão gênica (HENRICHSEN et al., 2009; SCHLATT et al., 2011; STRANGER et al., 2007). Sendo assim, posterior estudo de expressão dos genes envolvidos nesta duplicação do paciente 1 poderá trazer informações em relação à influência destes genes sob a espermatogênese.

A perda *de novo* do número de cópias no cromossomo 12, envolveu, entre outros, o gene *DDX11*. Este gene codifica a helicase ChIR1, envolvida na manutenção da correta transmissão cromossômica durante a mitose (GERRING et

al., 1990). Parish e colaboradores (2006) mostraram que a depleção da proteína ChIR1 por RNA de interferência resulta em interrupção mitótica, pela falha de segregação resultante da coesão anormal entre as cromátides irmãs. Desta forma, os autores mostraram a importante função desta proteína na manutenção da fidelidade genética, como concluem também Hirota e Lahti (2000), ao caracterizarem a atividade enzimática da proteína ChIR1 em humanos.

Van der Lelij e colaboradores (2010), em relato de caso, revelaram duas mutações deletérias no gene *DDX11*, uma no gene de origem materna e outra no de origem paterna, em um paciente com microcefalia grave, retardo no crescimento pré e pós natal e pigmentação anormal da pele. Foram observadas anormalidades na coesão entre as cromátides irmãs e excessivas quebras cromossômicas induzidas por drogas, características revertidas pela introdução do cDNA *DDX11* nos linfócitos do indivíduo afetado. Os autores deram ao quadro clínico descrito o nome de síndrome de Warsaw Breakage. O relato também descreve a ocorrência de vários casos de câncer na família do afetado. Mãe e avó, portadoras de uma das mutações do gene *DDX11*, desenvolveram linfoma de Hodgkin e adenocarcinoma de endométrio, respectivamente. Sua bisavó materna também desenvolveu um câncer cervical e a irmã desta, câncer uterino. Os autores sugerem que o gene *DDX11* possa estar envolvido na supressão tumoral.

A perda cromossômica no paciente 1, porém, ocorreu em hemizigose, mantendo provavelmente a expressão normal de uma das cópias do gene. O paciente nega casos de câncer na família, como encontrado na família do portador da síndrome de Warsaw Breakage. A literatura não relaciona este gene com alterações na meiose. No entanto, Amann e colaboradores (1997) mostraram sua alta expressão em tecidos que apresentavam uma alta taxa de divisão celular ou de

recombinação, especialmente no timo, pâncreas, intestino delgado, testículos e ovários. Desta forma, sugerimos a possível participação deste gene na estabilidade cromossômica e correta divisão meiótica, assim como mitótica. A instabilidade da divisão meiótica causada pela translocação em si pode estar agravada pela possível diminuição da expressão do gene *DDX11*, causando a interrupção da espermatogênese. Mas, para a avaliação do impacto desta redução de fertilidade do paciente, outros estudos são necessários. Sugerimos a realização da técnica de PCR para indicar o número de cópias ainda presentes, além de estudos de expressão gênica.

Um dos genes alterados no paciente 1, indicado pelo Babelomics como estando envolvido na espermatogênese, é o *Jag2*, ou *Jagged2*. Hayashi e colaboradores (2001) mostraram que os genes *Notch1* e seu ligante, *Jagged 2* eram expressos na região perinuclear de espermatócitos e espermátides no testículo humano, sendo importantes na diferenciação das células germinativas masculinas ou pelo menos na sobrevivência destas nos testículos humanos. Os autores detectaram a não expressão do gene *Notch1* em indivíduos com interrupção da espermatogênese, mas não encontraram alterações na expressão do gene *Jagged2*. Porém, em nosso estudo, além de estar 100% em sobreposição às regiões de CNV, a alteração deste gene no paciente 1 foi herdada de seu pai, o qual apresentou fertilidade comprovada.

Uma das alterações do paciente 1 foi uma deleção do cromossomo 8, na região 39,355,401-39,502,533. A alteração foi provavelmente herdada de sua mãe (paciente 3). Sendo encontrada nesta, porém, em região um pouco diferente: 39,355,401-39,508,473. O fato das regiões alteradas não serem exatamente iguais pode se dar pelo uso de DNA referência diferentes entre mãe e filho que, apesar de

se tratar de indivíduos feminino e masculino normais, podem apresentar pequenas variações normais, ou mesmo pela ocorrência de *crossing* no gameta feminino, gerando uma variação da alteração. Tal alteração envolve os genes *ADAM3A*, também conhecido como *ADAM3*, *CYRN1* ou *tMDCI*, e *ADAM18*, também conhecido como *ADAM27* ou *tMDCIII*. Ambos os genes codificam proteínas que fazem parte da família ADAM (*A Disintegrin and Metalloprotease*) ou família MDC (*Metalloproteinase, Desintegrina, Cysteine-rich*). Esta família é composta por proteínas integrais de membrana com múltiplos domínios, envolvidas em variados processos biológicos de interações célula-célula e célula-matriz, como na fertilização, desenvolvimento muscular e na neurogênese. Ambos os genes *ADAM3* e *ADAM18* são expressos exclusivamente em células da espermatogênese. Acredita-se que os transcritos proteicos destes genes participem na ancoragem e/ou fusão entre o espermatozóide e a membrana plasmática do gameta feminino (BIGLER et al., 1997; LINDER, HEINLEIN, 1997), sendo estocados no acrossoma após sua produção, para formarem parte da membrana acrossomal após a reação de encontro com o gameta feminino (FORSBACH; HEINLEIN, 1998). Estudos com camundongos nocauteados mostraram que a disrupção do gene *Cyrn*, homólogo ao gene *tMDCI* em humanos, gerou infertilidade em todos os camundongos devido à incapacitação do espermatozóide de se ligar a zona pelúcida (RAHMAN et al., 1999).

Em humanos, a literatura mostra a presença de uma variedade de deleções, inserções e códons de terminação na sequência de leitura do gene *tMDC I*, indicando que ele seja provavelmente não funcional (FRAYNE; HALL, 1998). Porém, em muitos casais inférteis, a ligação do espermatozóide com o ovócito em procedimentos de fertilização *in vitro* é deficiente. Rahman e colaboradores (1999) sugeriram que mutações no gene *tMDC I* em humanos poderiam ser sim responsáveis por alguns

casos de infertilidade masculina. Grzmil e colaboradores (2001), ao notarem que alguns indivíduos possuíam o gene *tMDC I* deletado, realizaram uma análise em homens férteis e inférteis, a qual mostrou frequências semelhantes de deleções em ambos os grupos, indicando que, em humanos, tal gene seja realmente não funcional e a adesão do espermatozóide à zona pelúcida do ovócito seja realizada por outras proteínas.

Frayne e colaboradores (2002) descreveram duas proteínas do tipo MDC funcionais em humanos, a fertilina β e a tMDC III, codificadas pelos genes *ADAM2* e *ADAM18*, respectivamente. Outros transcritos do tipo MDC especificamente expressos em testículos foram também descritos (*ADAM 20, 21, 29 e 30*) como possíveis equivalentes funcionais de genes MDC não funcionais em humanos (*tMDC I, fertilina α , tMDC II*) (VAN HUIJSDUIJNEN, 1998; CERRETTI et al., 1999).

Desta forma, a perda do número de cópias do gene *ADAM3* no indivíduo 1 não seria responsável por alterações de fertilidade, e, se tratando de um paciente azoospermico, não é possível avaliar a influência da perda de cópias do gene *ADAM18* na capacidade de ligação entre o espermatozóide e o óvulo. Curiosamente, o paciente 8, da Família 2, mostrou alteração em região semelhante à encontrada nos pacientes 1 e 2 (39,349,846-39,508,473), envolvendo os mesmos genes, porém, se tratando de uma duplicação. No entanto, o seu irmão (paciente 9), também infértil, não apresentou a mesma duplicação.

Apesar de entre os homens estudados neste trabalho, as alterações no gene *ADAM3* terem sido encontradas apenas em indivíduos inférteis, os dados corroboram com a literatura, sugerindo que alterações neste gene sejam frequentes na população tanto infértil como normal, não tendo significado clínico.

Já em relação ao *ADAM18*, as tentativas frustradas de inseminação artificial e fertilização *in vitro* possivelmente mostram o não aumento da eficácia de ligação entre espermatozóide e ovócito pela duplicação do gene. Porém, como já foi dito, além da duplicação não necessariamente representar um aumento da expressão gênica, o insucesso das técnicas pode ser atribuído a outros motivos, como a produção de embriões com desequilíbrio genômico, inviáveis.

O paciente 9 apresentou a maior alteração encontrada entre os indivíduos estudados, uma deleção de 2,9Mb no cromossomo 8, envolvendo 8 genes na extremidade centromérica do braço curto: *THAP1*, *RNF170*, *MIR4469*, *HOOK3*, *FNTA*, *SGK196*, *HGSNAT*, *POTEA*.

Entre os genes com perda no número de cópias, destacamos o gene *POTEA* (Prostate, Ovary, Testis-Expressedprotein, member A), por ser expresso exclusivamente em próstata, testículos, ovários e placenta (BERA et al., 2002), assim como em diversos cânceres (BERA et al., 2006). A família dos genes *POTE* é constituída por 13 variantes homólogas, dispersas entre oito diferentes cromossomos (2, 8, 13, 14, 15, 18, 21 e 22) (HAHN et al., 2006), em regiões pericentroméricas, onde genes duplicados são abundantes, exceto na banda cromossômica 2q21. As várias cópias encontradas no genoma humano demonstram sua origem pela duplicação e dispersão durante a evolução. Isso e o fato delas serem expressas somente em testículos, próstata, ovário e placenta, sugerem que uma forte seleção deve manter a expressão desses genes, estando provavelmente envolvidos em importantes processos de reprodução e especiação (BERA et al., 2002; BERA et al., 2004).

Ise e colaboradores (2008) detectaram a presença de proteínas *POTE* em espermátócitos primários, indicando sua participação na espermatogênese. Esta

expressão específica em espermatozoides primários, dos quais alguns estão em processo de apoptose, sugere que o gene possa ter a função de induzir a morte celular programada, como confirma os estudos de Bera e colaboradores (2012). Fen Liu e colaboradores (2009) descreveram um nível diminuído de RNA POTE em indivíduos teratozoospermicos, corroborando com a idéia de que o gene participa em vias regulatórias do sistema reprodutivo. Uma vez que o paciente 9 possui morfologia alterada de seus espermatozoides (apenas 06% são normais), sugerimos que a perda do número de cópias do gene *POTE* desempenhe papel importante na redução da morfologia espermática normal. Porém, seu irmão, paciente 8, possui morfologia espermática ainda mais alterada, de apenas 02% normal, sem apresentar alterações neste gene. Mesmo assim, sugerimos o estudo deste gene como gene candidato.

Apesar da translocação presente nos paciente 8 e 9 serem aparentemente idêntica à encontrada no pai, é possível que alguma(s) das alterações genômicas descritas tenham surgido durante a transmissão dos cromossomos translocados, decorrentes do pareamento alterado entre os mesmos, uma vez que os filhos (pacientes 8 e 9) apresentam um quadro de infertilidade não presente no pai. Apesar das alterações descritas não estarem presentes nos pontos de quebra, é possível que elas estejam envolvidas com as alterações de fertilidade. Estudos mostram que, além da interrupção gênica, do efeito de posição e de pequenos desequilíbrios cromossômicos submicroscópicos nos pontos de quebra de portadores de rearranjos aparentemente equilibrados, muitas vezes estão presentes também alterações distantes do ponto de quebra ou até mesmo em outros cromossomos não envolvidos no rearranjo, que podem explicar o quadro clínico do paciente (Baptista et al., 2008).

Existe também a possibilidade de que a constituição genômica herdada da mãe tenha contribuído para o quadro de oligozoospermia dos pacientes 8 e 9. Para investigação abrangendo a expressão gênica dos genes alterados ou possivelmente interrompidos nos pontos de quebra em ambas as famílias, é necessária a caracterização precisa dos pontos de quebra por microdissecção e posterior análise de expressão gênica por *arrays*.

7. CONCLUSÕES

- A utilização das técnicas de citogenética clássica associadas à citogenética molecular (FISH) permitiu a caracterização dos rearranjos cromossômicos presentes nas duas famílias e adicionalmente, a detecção de mosaicismo em dois indivíduos da família 1.

- A caracterização citogenética da família 1 possibilitou a definição da origem da translocação aparentemente equilibrada (X;22) presente nos pacientes 1, 2 e 3 e do mosaicismo cromossômico para síndrome de Turner diagnosticado na paciente 5, a partir dos resultados obtidos na paciente 7.

- O estudo citogenômico pela técnica de aCGH evidenciou alterações no número de cópias de alguns genes candidatos envolvidos com o fenótipo de infertilidade dos pacientes avaliados. Sendo na família 1: 132 sequência de piRNAs, os genes *DDX11*, *Jag 2* e *ADAM18*. Na família 2, o gene candidato para os pacientes 8 e 9 foi o gene *ADAM18* e para o paciente 9, também o gene *POTE*.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMANN, J.; KIDD, V.J.; LAHTI, J.M.. Characterization of putative human homologues of the yeast chromosome transmission fidelity gene, CHL1. **The Journal of Biological Chemistry**, vol. 272, n.6, p.3823-3832.

ASHLEY, T.. Effect of G-band position on meiotic synapsis and crossing-over. **Genetics**, vol.118, p.307-317,1988.

BAARENDS, W.M.; GROOTEGOED, J.A.. Chromatin dynamics in the male meiotic prophase. **Cytogenetic and Genome Research**, vol.103, p225-234, 2003.

BAPTISTA, J.; MERCER, C.; PRIGMORE, E.; GRIBBLE, S.M.; CARTER, N.P.; MALONEY, V.; THOMAS, N.S.; JACOBS, P.A.; CROLLA, J.A.. Breakpoint Mapping and Array CGH in translocations: Comparison of a phenotypically normal and an abnormal cohort. **The American Journal of Human Genetics**, vol.82, p.927-936, 2008.

BAUMAN, J.G.; WIEGANT, J.; BORST, P.; VAN DUJIN, P.. A new method for fluorescence microscopical localization of specific DNA sequences by *in situ* hybridization of fluorochrome labelled RNA. **Experimental Cell Research**, vol.128, p.485-490, 1980.

BAYANI, J.; SQUIRE, J.A.. Fluorescence In Situ Hybridization (FISH). **Current Protocols in Cell Biology**, 22.4.1-22-4-52, 2004.

BEATTY, B.; MAI, S.; SQUIRE, J.A.. In: BEATTY, B.; MAI, S.; SQUIRE, J.A. (Org). **FISH**. 1 ed. Toronto:Oxford University Press, 2002.

BENET, J.; OLIVER-BONET, M.; CIFUENTES, P.; TEMPLADO, C.; NAVARRO, J.. Segregation of chromosomes in sperm of reciprocal translocation carriers: a review. **Cytogenetic and Genome Research**, vol.111, p.281-290, 2005.

BENN, P.A.. Prenatal Diagnosis of Chromosomal Abnormalities through Amniocentesis, In: MILUNSKY, A.; MILUNSKY, J.M. (Org.). **Genetic Disorders and the Fetus: Diagnosis, Prevention and Treatment**. 6 ed. New York: Wiley-Blackwell, 2010.

BERA, T.K.; ZIMONJIC, D.B.; POPESCU, N.C.; SATHYANARAYANA, B.K.; KUMAR, V.; LEE, B.; PASTAN, I.. *POTE*, a highly homologous gene family located

on numerous chromosomes and expressed in prostate, ovary, testis, placenta, and prostate cancer. **Proceeding of the National Academy of Sciences**, vol.99, p.16975-16980, 2002.

BERA, T.K.; HUYNH, N.; MAEDA, H.; SATHYANARAYANA, B.K.; LEE, B.; PASTAN, I.. Five *POTE* paralogs and their splice variants are expressed in human prostate and encode proteins of different lengths. **Gene**, n.337, p.45-53, 2004.

BERA, T.K.; SAINT FLEUR, A.; LEE, Y.; KYDD, A.; HAHN, Y.; POPESCU, N.C.; ZIMONJIC, D.B.; LEE, B.; PASTAN, I.. *POTE* paralogs are induced and differentially expressed in many cancers. **Cancer Research**, vol.66, n.1, p.52-56, 2006.

BERA, T.K.; WALKER, D.A.; SHERINS, R.J.; PASTAN, I.. *POTE* protein, a cancer-testis antigen, is highly expressed in spermatids in human testis and is associated with apoptotic cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol.417, p.1271-1274, 2012.

BERGERO, R.; CHARLESWORTH, D.. The evolution of restricted recombination in sex chromosomes. **Trends in ecology and evolution**, vol.24, n.2, p.94-102, 2009.

BIGLER, D.; CHEN, M.; WATERS, S.; WHITE, J.M.. A model for sperm-egg binding and fusion based on ADAMs and integrins. **Trends in Cell Biology**, vol.7, p.220-225, 1997.

BIGNELL, G.R.; HUANG, J.; GRESHOCK, J.; WATT, S.; BUTLER, A.; WEST, S.; GRIGOROVA, M.; JONES, K.W.; WEI, W.; STRATTON, M.R.; FUTREAL, P.A.; WEBER, B.; SHAPERO, M.H.; WOOSTER, R.. High-resolution analysis of DNA copy number using oligonucleotide microarrays. **Genome Research**, vol. 14, n.2, p.287-295, 2004.

BROCKDORFF, N.; ASHWORTH, A.; KAY, G.F.; MCCABE, V.M.; NORRIS, D.P.; COOPER, P.J.; SWIFT, S.; RASTAN, S.. The product of the mouse *Xist* gene is a 15kb inactive X-specific transcript containing no conserved ORF and located in the nucleus. **Cell**, vol. 71, p.515-526, 1992.

BROWN, C.J.; BALLABIO, A.; RUPERT, J.L.; LAFRENIÈRE, R.G.; GROMPE, M.; TONLORENZI, R.; WILLARD, H.F.. A gene from the region of the human X inactivation center is expressed exclusively from the inactive X chromosome. **Nature**, vol.349, p.38-44, 1991b.

BROWN, C.J.; LAFRENIÈRE, R.G.; POWERS, V.E.; SEBASTION, G.; BALLABIO, A.; PETTIGREW, A.L.; LEDBETTER, D.H.; LEVY, E.; CRAIG, I.G.; WILLARD, H.F..

Localization of the X inactivation center on the human X chromosome in Xq13. **Nature**, vol.349, p.82-84, 1991a.

BUSQUE, L.; MIO, R.; MATTIOLI, J.; BRAIS, E.; BLAIS, N.; LALONDE, Y.; MARAGH, M.; GILLILAND, D.G.. Nonrandom X-inactivation patterns in normal females: lyonization ratios vary with age. **Blood**, vol.88, n.1, p.59-65, 1996.

CERRETTI, D.P.; DUBOSE, R.F.; BLACK, R.A.; NELSON, N.. Isolation of two novel metalloproteinase-disintegrin (ADAM) cDNAs that show testis-specific gene expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol. 263, n.3, p.810-815, 1999.

CHUDOBA, I.; FRANKE, Y.; SENGER, G.; SAUERBREI, G.; DEMUTH, S.; BEENSEN, V.; NEUMANN, A.; HANSMANN, I.; CLAUSSEN, U.. Maternal UPD 20 in a hyperactive child with severe growth retardation. **European Journal of Human Genetics**, vol.7, n.5, p.533-540, 1999.

CRAM, D.; LYNCH, M.; O'BRYAN, M.K.; SALVADO, C.; MCLACHLAN, R.I.; KRETZER, D.M.. Genetic screening of infertile men. **Reproduction, Fertility and Development**, vol.16, p.573-580, 2004.

DU MANOIR, S.; SPEICHER, M.R.; JOOS, S.; SCHROCK, E.; POPP, S.; DOHNER, H.; KOVACS, G.; ROBERT-NICOUD, M.; LICHTER, P.; CREMER, T.. Detection of complete and partial chromosome gains and losses by comparative genomic *in situ* hybridization. **Human Genetics**, vol.90, n.6, p.590-610, 1993.

EAKER, S.; PYLE, A.; COBB, J.; HANDEL, M.A.. Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice. **Journal of Cell Science**, vol.114, p.2953-2965, 2001.

EGOZCUE, S.; BLANCO, J.; VENDRELL, J.M.; GARCÍA, F.; VEIGA, A.; ARAN, B.; BARRI, P.N.; VIDAL, F.; EGOZCUE, J.. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. **Human Reproduction Update**, vol.6, n.1, p.93-105, 2000.

ESTEVEZ, S.C.; MIYAOKA, R.; AGARWALL, A.. An update of the clinical assessment of the infertile male. **Clinics**, vol.66, n.4, p.691-700, 2011.

FAN, Y.S.. In: FAN, Y.S..(Org). **Molecular Cytogenetics: Protocols and Applications (Methods in Molecular Biology)**, 1ed. Totowa: Humana Press, 2002.

FEN LIU, X.; BERA, T.K.; LIU, L.J.; PASTAN, I.. A primate-specific POTE-actin fusion protein plays a role in apoptosis. **Apoptosis**, vol.14, n.10, p.1237-1244, 2009.

FOREJT, J.. X-Y involvement in male sterility caused by autosome translocations: a hypothesis, In: CROSIGNANI, P.G.; RUBIN, B.L.; FRACCARO, M.; CROSIGNANI, P.G. (Org.). **Genetic Control of Gamete Production and Function**, New York: Academic Press, 1982.

FORSBACH, A.; HEINLEIN, U.A.. Intratesticular distribution of cyritestin, a protein involved in gamete interaction. **The Journal of Experimental Biology**, vol.201, p.861-867, 1998.

FRAYNE, J.; HURD, E.A.; HALL, L.. Human tMDC III: a sperm protein with a potential role in oocyte recognition. **Molecular Human Reproduction**, vol.8, n.9, p.817-822, 2002.

FRAYNE, J.; HALL, L.. The gene for the human tMDC I sperm surface protein is non-functional: implications for its proposed role in mammalian sperm-egg recognition. **Biochemical Journal**, vol.334, p.171-176, 1998.

FRACCARO, M.; MARASCHIO, P.; PASQUALI, F.; SCAPPATICCI, S.. Women heterozygous for deficiency of the (p21→pter) region of the X chromosome are fertile. **Human Genetics**, vol.39, p.283-292, 1997.

GAJECKA, M.; GENTLES, A.J.; TSAI, A., CHITAYAT, D.; MACKAY, K.L.; GLOTZBACH, C.D.; LIEBER, M.R.; SHAFFER, L.G.. Unexpected complexity at breakpoint junctions and mechanisms involved in generating balanced translocations t(1,22) (p36;q13). **Genome Research**, vol.18, p.1733-1742, 2008.

GALL, J.G.; PADUE, M.L.. Formation and detection of RNA-DNA hybrid molecules in cytological preparations. **Proceedings of National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 63, p.378-383, 1969.

GARDNER, R.J.M.; SUTHERLAND, G.R.; SHAFFER, L.G.. Sex chromosome translocations. In: GARDNER, R.J.M.; SUTHERLAND, G.R.; SHAFFER, L.G.. (Org.). **Chromosome abnormalities and genetic counseling**. 4 ed. Oxford: Oxford, 2011.

GERRING, S.L.; SPENCER, F.; HIETER, P.. The CHL1 (CTF1) gene product of *Saccharomyces cerevisiae* is important for chromosome transmission and normal cell cycle progression in G2/M. **The EMBO Journal**, vol.13, p.4347-4358, 1990.

GOEL, H.; PHADKE, S.R.. Reciprocal balanced translocation: infertility and recurrent abortions in a family. **Andrologia**, vol.43, p.75-77, 2010.

GOUAS, L.; GOUMY, C.; VÉRONÈSE, A.; TCHIRKOV, A.; VAGO, P.. Gene dosage methods as diagnostic tools for the identification of chromosome abnormalities. **PathologieBiologie**, v.56, p.345-353, 2008.

GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; CARROL, S.B.. Alterações cromossômicas em larga escala. In: GRIFFITHS, A.J.F.; WESSLER, S.R.; LEWONTIN, R.C.; CARROL, S.B. (Org). **Introdução à genética**. 9 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

GRZMIL, P.; KIM, Y.; SHAMSADIN, R.; NEESEN, J.; ADHAM, I.M.; HEINLEIN, U.A.O.; SCHWARZER, U.J.; ENGEL, W.. Humancyrtestin genes (*CYRN1* and *CYRN2*) are non-functional. **Biochemical Journal**, vol.357, p.551-556, 2001.

GU, A.; JI, G.; SHI, X.; LONG, Y.; XIA, Y.; SONG, L.; WANG, S.; WANG, X.. Genetic variants in Piwi-interacting RNA pathway genes confer susceptibility to spermatogenic failure in a Chinese population. **Human Reproduction**, vol.25, n.12, p.2955-2961, 2010.

HAHN, Y.; BERA, T.K.; PASTAN, I.H.; LEE, B.. Duplication and extensive remodeling shaped POTE family genes encoding proteins containing ankyrin repeat and coiled coil domains. **Gene**, vol.366, n.2, p.238-245, 2005.

HALL, H.E.; SURTI, U.; HOFFNER, L.; SHIRLEY, S.; FEINGOLD, E.; HASSOLD, T.. The origin of trisomy 22: Evidence for acrocentric chromosome-specific patterns of nondisjunction. **American Journal of Medical Genetics**, vol.143A, p.2249-2255, 2007.

HAYASHI, T.; KAGEYAMA, Y.; ISHIZAKA, K.; XIA, G.; KIHARA, K.; OSHIMA, H.. Requirement of Notch 1 and its ligand jagged 2 expressions for spermatogenesis in rat and human testes. **Journal of Andrology**, vol.22, n.6, p.999-1011, 2001.

HENRICHSEN, C.N.; CHAIGNAT, E.; REYMOND,. A.Copy number variants, diseases and gene expression. **Human molecular genetics**, vol.18, R1-R8, 2009.

HIROTA, Y.; LAHTI, J.. Characterization of the enzymatic activity of hChIR1, a novel human DNA helicase. **Nucleic Acids Research**, vol. 28, n.4, p.917-924, 2000.

HONDA, H.; MIHARU, N.; OHASHI, Y.; HONDA, N.; HARA, T.; OHAMA, K.. Analysis of segregation and aneuploidy in two reciprocal translocation carriers, t(3;9)(q26.2;q32) and t(3;9)(p25;q32), by triple-color fluorescence in situ hybridization. **Human Genetics**, vol.105, p.428–436, 1999.

HOOKE, E.B.; SCHREINEMACHERS, D.M.; WILLEY, A.M.; CROSS, P.K.. Rates of mutant structural chromosome rearrangements in human fetuses: data from prenatal cytogenetic studies and associations with maternal age and parental mutagen exposure. **American Journal of Human Genetics**, vol.35, n.1, p.96-109, 1983.

ISE, T.; DAS, S.; NAGATA, S.; MAEDA, H.; LEE, Y.; ONDA, M.; ANVER, M.R.; BERA, T.K.; PASTAN, I.. Expression of POTE protein in human testis detected by novel monoclonal antibodies. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, vol.4, p.603-608, 2008.

JAAFAR, H.; GABRIEL-ROBEZ, O.; RUMPLER, Y.. Chromosomal anomalies and disturbance of transcriptional activity at the pachytene stage of meiosis: relationship to male sterility. **Cytogenetics and Cell Genetics**, vol.64, p.273-280, 1993.

JACKSON, L.. Cytogenetics and molecular cytogenetics. **Clinical Obstetrics and Gynecology**, vol.45, n.3, p.622–639, 2002.

JACOBS, P.A.. The chromosome complement of human gametes. **Oxford Reviews of Reproductive Biology**, vol.14, p-47–72, 1992.

JALBERT, P.; SÈLE, B.. Factor predisposing to adjacent 2 and 3:1 disjunctions: study of 161 reciprocal translocations. **Journal of Medical Genetics**, vol.16, p.467-478, 1979.

KAGAMI, M.; KATO, F.; MATSUBARA, K.; SATO, T.; NISHIMURA, G.; OGATA, T.. Relative frequency of underlying genetic causes for the development of UPD(14)pat-like phenotype. **European Journal of Human Genetics**, vol. 20, n.9, p.928-932, 2012.

KALLIONIEMI, A.; KALLIONIEMI, O.P.; SUDAR, D.; RUTOVITZ, D.; GRAY, J.W.; WALDMAN, F.; PINKEL, D.. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. **Science**, vol.258, n.5083, p.818-821, 1992.

KALZ-FULLER, B.; SLEEGERS, E.; SCHWANITZ, G.; SCHUBERT, R.. Characterisation phenotypic manifestations and X-inactivation pattern in 14 patients with X-autosome translocations. **Clinical Genetics**, vol.55, p.362-366, 1999.

KOTZOT, D.. Complex and segmental uniparental disomy (UPD): review and lessons from rare chromosome complements. **Journal of Medical Genetics**, vol. 38, n.8, p.497-507, 2001.

LANGER, P.R.; WALDROP, A.A.; WARD, D.C.. Enzymatic synthesis of biotin-labeled polynucleotides: novel nucleic acid affinity probes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of United States of America**, vol.78, p.6633-6637, 1981.

LAURIE, D.A.; HULTÈN, M.A.. Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. **Annals of Human Genetics**, v.49, p.189-201, 1985.

LICHTER, P.; JOOS, S.; BENTZ, M.; LAMPEL, S.. Comparative Genomic Hybridization: Uses and Limitations. **Seminars in Hematology**, vol.37, p.348-357, 2000.

LIFSCHYTZ, E.; LINDSLEY, D.L.. The role of X-chromosome inactivation during spermatogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol.69, n.1, p.182-186, 1972.

LINDER, B.; HEINLEIN, U.A.O.. Decreased *in vitro* fertilization efficiencies in the presence of specific cyritestin peptides. **Development, Growth and Differentiation**, vol. 39, p.243-247, 1997.

LYON, M.F.. Gene action in the X-chromosome of the mouse (*Mus musculus* L.). **Nature**, vol.190, p.372-373, 1961.

LYON, M.F.; MEREDITH, R.. Autosomal translocations causing male sterility and viable aneuploidy in the mouse. **Cytogenetics**, vol.5, n.5, p.335-354, 1966.

MANTZOURATOU, A.; DELHANTY, J.D.. Aneuploidy in the human cleavage stage embryo. **Cytogenetic Genome Research**, vol.133, n.2-4, p.141-148, 2011.

MARTIN, R.H.. Cytogenetic determinants of male fertility. **Human Reproduction Update**, vol.14, n.4, p.379-390, 2008.

MERGENER, R.; LUDWIG, L.B.; MALUF, S.W.. Alterações cromossômicas estruturais, In: MALUF, S.W.; RIEGEL, M. ET AL. (Org.). **Citogenética humana**. Porto Alegre: Artmed, 2011.

MIKLOS, G.L.G.. Sex-chromosome pairing and male fertility. **Cytogenetics and Cell Genetics**, vol.13, n.6, p.558-577, 1974.

MITELMAN, F.; JOHANSSON, B.; MERTENS, F.. Fusion genes and rearranged genes as a linear function of chromosome aberrations in cancer. **Nature Genetics**, vol.36, n.4, p.331-334, 2004.

MOORHEAD, P.S.; NOWELL, P.C.; MELLMAN, W.J.; BATTIPS, D.M.; HUNGERFORD, D.A.. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. **Experimental Cell Research**, vol. 20, p.613-616, 1960.

NEDERLOF, P.M.; ROBINSON, D.; ABUKNESHA, R.; WIEGANT, J.; HOPMAN, A.H.; TANKE, H.J.; RAAP, A.K.. Three-color fluorescence *in situ* hybridization for the simultaneous detection of multiple nucleic acid sequences. **Cytometry**, vol. 10, p.20-27, 1989.

NEDERLOF, P.M. VAN DER FLIER, S.; VROLIJK, J.; TANKE, H.J.; RAAP, A.K.. Fluorescence ratio measurements of double label probes for multiple *in situ* hybridization by digital imaging microscopy. **Cytometry**, vol.13, p.839-845, 1992.

OKAMOTO, I.; OTTE, A.P.; ALLIS, C.D.; REINBERT, D.; HEARD, E.. Epigenetic dynamics of imprinted X inactivation during early mouse development. **Science**, vol.303, n.5658, p.644-649, 2004.

OLIVER-BONET, M.; KO, E.; MARTIN, R.H.. Male infertility in reciprocal translocation carriers: the sex body affair. **Cytogenetic and Genome Research**, vol.111, p.343-346, 2005.

OLSON, S.D.; MAGENIS, R.E.. Preferential paternal origin of *de novo* structural rearrangements. In: DANIEL, A. (Org.) **The cytogenetics of Mammalian Autosomal Rearrangements**. Manhattan: Alan R. Liss, 1988.

PAOLONI-GIACOBINO, A.; KERN, I.; RUMPLER, Y.; DJLELATI, R.; MORRIS, M.A.; DAHOUN, S.P.. Familial t(6;21)(p21.1;p13) translocation associated with male-only sterility. **Clinical Genetics**, vol.58, n.4, p.324-328, 2000.

PARISH, J.L.; ROSA, J.; WANG, X.; LAHTI, J.M.; DOXSEY, S.J.; ANDROPHY, E.J.. The DNA helicase ChIR1 is required for sister chromatid cohesion in mammalian cells. **Journal of Cell Science**, vol.119, p.4857-4865, 2006.

POLLACK, J.R.; PEROU, C.M.; ALIZADEH, A.A.; EISEN, M.B.; PERGAMENCHIKOV, A.; WILLIAMS, C.F.; JEFFREY, S.S.; BOTSTEIN, D.; BROWN, P.O.. Genome-wide analysis of DNA copy-number changes using cDNA microarrays. **Nature Genetics**, vol.23, n.1, p.41-46, 1999.

RAHMAN, S.; ADHAM, I.M.; NAYERNIA, K.; HEINLEIN, U.A.O.; OBERWINKLER, H.; ENGEL, W.. Male mice deficient for germ-cell cyritestin are infertile. **Biology of reproduction**, vol.61, p.1445-1451, 1999.

RASTAN, S.; BROWN, S.D.M.. The search for the mouse X chromosome inactivation center. **Genetic Research**, vol.56, p.99-106, 1990.

ROBBERECHT, C.; VOET, T.; UTINE, G.E.; SCHINZEL, A.; DE LEEUW, N.; FRYNS, J.P.; VERMEESCH, J.. Meiotic errors followed by two parallel postzygotic trisomy rescue events are a frequent cause of constitutional segmental mosaicism. **Molecular Cytogenetics**, 2012.

ROBLES, P.; ROIG, I.; GARCIA, R.; ORTEGA, A.; EGOZCUE, J.; CABERO, L.L.; GARCIA, M.. Pairing and synapsis in oocytes from female fetuses with euploid and aneuploid chromosome complements. **Reproduction**, vol. 133, n.5, p.899-907, 2007.

RUDKIN, G.T.; STOLLAR, B.D.. High resolution detection of DNA-RNA hybrids *in situ* by indirect immunofluorescence. **Nature**, vol.265, p.472-473, 1977.

SALA, C.; ARRIGO, G.; TORRI, G.; MARTINAZZI, F.; RIVA, P.; LARIZZA, L.; PHILIPPE, C.; JONVEAUX, P.; SLOAN, F.; LABELLA, T.; TONIOLO, D. Eleven X chromosome breakpoints associated with premature ovarian failure (POF) map to a 15-Mb YAC contig spanning Xq21. **Genomics**, vol.40, p.123-131, 1997.

SCHLATTL, A.; ANDERS, S.; WASZAK, .M. HUBER, W.; KORBEL, J.O.. Relating CNVs to transcriptome data at fine resolution: assessment of the effect of variant size, type and overlap with functional regions. **Genome Research**, vol.21, n.12, p.2004-2013, 2011.

SCHMIDT, M.; DU SART, D.. Functional disomies of the X chromosome influence the cell selection and hence the X inactivation pattern in females with balanced X-autosome translocation: a review of 122 cases. **The American journal of Human Genetics**, vol.42, p.161-169, 1992.

SCHMIDT, M.; MIGEON, B.R.. Asynchronous replication of homologous loci on human active and inactive X chromosomes. **Genetics**, vol.87, p.3685-3689, 1990.

SCHROCK, E. DU MANOIR, S.; VELDMAN, T.; SCHOELL, B.; WIENBERG, J.; FERQUSON-SMITH, M.A.; NING, Y.; LEDBETTER, D.H.; BAR-AM, I.; SOENKSEN, D.; GARINI, Y.; RIED, T.. Multicolor spectral karyotyping of human chromosomes. **Science**, vol.273, n.5274, p.494-497, 1996.

SCHULTZ, N.; HAMRA, F.K.; GARBERS, D.. A multitude of genes expressed solely in meiotic or postmeiotic spermatogenic cells offers a myriad of contraceptive targets. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol.100, p.12201-12206, 2003.

SEABRIGHT, M.A.. A rapid banding technique for human chromosomes. **Lancet**, vol. 2, p.971-172, 1971.

SHAFFER, L.G.; AGAN, N.; GOLDBERG, J.D.; LEDBETTER, D.H.; LONGSHORE, J.W.; CASSIDY, S.B.. American college of medical genetics statement on diagnostic testing for uniparental disomy. **Genetics in Medicine**, vol.3, n.3, p.206-211, 2001.

SHAN, K.; SIVAPALAN, G.; GIBBONS, N.; TEMPEST, H.; GRIFFIN, D.K.. The genetic basis of infertility. **Reproduction**, vol.126, p.13-25, 2003.

SHI, Q.; MARTIN, R.H.. Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. **Journals of Reproduction and Fertility**, vol.121, p.655-666, 2001.

SPEICHER, M.R.; BALLARD, S.G.; WARD, D.C.. Karyotyping human chromosomes by combinatorial multi-fluor FISH. **Nature Genetics**, vol. 12, p.368-375, 1996.

SPEICHER, M.R.; CARTER, N.P.. The new cytogenetics blurring the boundaries with molecular biology. **Nature**, vol.6, p.782,792, 2005.

STRANGER, B.E.; FORREST, M.S.; DUNNING, M.; INGLE, C.E.; BEAZLEY, C.; THORNE, N.; REDON, R.; DE GRSSI, A.; LEE, C.; TYLER-SMITH, C.; SCHERER, S.W.; TAVARÉ, S.; DELOUKAS, P.; HURLES, M.E.; DERMITZAKIS, E.T.. Relative

impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. **Science**, vol.315, p.848-853, 2007.

SYBENGA, J.. Recombination, In: SYBENGA, J. (Org.). **General Cytogenetics**. Amsterdam; New York: North-Holland Publishing Company, 1972.

TEMPLADO, C.; BOSCH, M.; BENET, J.. Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa. **Cytogenetic and Genome Research**, vol.111, p.199-205, 2005.

THERMAN, E.; LAXOVA, R.; SUSMAN, B.. The critical region on the human Xq. **Human Genetics**, vol.85, p.455-461, 1990.

TRASK, B.J.. Fluorescence *in situ* hybridization: applications in cytogenetics and gene mapping. **Trends in Genetics**, vol.7, n.5, p.149-154, 1991.

VAN DER LELIJ, P.; CHRZANOWSKA, K.H.; GODTHELP, B.C.; ROOIMANS, M.A.; OOSTRA, A.B.; STUMM, M.; ZDZIENICKA, M.Z.; JOENJE, H.; DE WINTER, J.P.. Warsaw breakage syndrome, a cohesinopathy associated with mutations in the XPD helicase family member DDX11/ChIR1. **American Journal of Human Genetics**, vol. 86, n.2, p.262-266, 2010.

VAN HUIJSDUIJNEN R.H.. ADAM 20 and 21; two novel human testis-specific membrane metalloproteases with similarity to fertilin-alpha. **Gene**, vol.206, n.2, p.273-282, 1998.

VANNESTE, E.; VOET, T.; LE CAIGNEC, C.; AMPE, M.; KONINGS, P.; MELOTTE, C.; DEBROCK, S.; AMYERE, M.; VIKKULA, M.; SCHUIT, F.; FRYNS, J.P.; VERBEKE, G.; D'HOOGHE, T.; MOREAU, Y.; VERMEESCH, J.R.. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. **Nature Medicine**, vol.15, n.5, p.577-583, 2009.

VETRO, A.; MANOLAKOS, E.; PETERSER, M.B.; THOMAIDIS, L.; LIEHR, T.; CROCI, G.; FRANCHI, F.; MARINELLI, M.; MENEGHELLI, E.; DAL BELLO, B.; CESARI, S.; IASCI, A.; ARRIGO, G.; ZUFFARDI, O.. Unexpected results in the constitution of small supernumerary marker chromosomes. **European Journal of Medical Genetics**, vol.55, p.185-190, 2012.

VOET, T.; VANNESTE, E.; VAN DER AA, N.; MELOTTE, C.; JACKMAERT, S.; VANDENDAEL, T.; DECLERCQ, M.; DEBROCK, S.; FRYNS, J.P.; MOREAU, Y.; D'HOOGHE, T.; VERMEESCH, J.R.. Breakage-Fusion-Bridge cycles leading to inv

dup del occur in human cleavage stage embryos. **Human Mutation**, vol.32, p.783-793, 2011.

WATERS, J.; CAMPBELL, P.L.; CROCKER, A.J.; CAMPBELL, C.M.. Phenotypic effects of balanced X-autosome translocations in females: a retrospective survey of 104 cases reported from UK laboratories. **Human Genetics**, vol.108, p.318-327, 2001.

WOLFF, D.J.; SCHWARTZ, S. Fluorescence *In Situ* Hibridization. In: GERSEN, S.L.; KEAGLE, M.B. (Org.). **The principles of Clinical Cytogenetics**. Human Press, 2005.

ZHANG, Z.; RUIVENKAMP, C.; STAAF, J.; ZHU, H.; BARBARO, M.; PETILLO, D.; ZHOO, S.K.; BORG, A.; FAN, Y.; SCHOUMANS, J.. Detection of submicroscopic constitutional chromosome aberrations in clinical diagnostics: a validation of the practical performance of different array plataforms. **European Journal of Human Genetics**, vol.16, p.786-792, 2008.

REFERÊNCIAS ONLINE:

www.babelomics3.bioinfo.cipf.es

APÊNDICES

APÊNDICE I

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 citogenética molecular de rearranjos cromossômicos aparentemente equilibrados associados ao fenótipo de infertilidade**”. O objetivo deste estudo é avaliar a constituição genética do paciente para buscar possíveis causas da infertilidade. Este projeto tem como pesquisadora responsável Juliana Dourado Grzesiuk.

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. 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 uma amostra de sangue, que pode causar algum desconforto, mas sem nenhum risco para a sua saúde;
2. Os resultados de nosso estudo podem não trazer benefício imediato para seu tratamento;
3. Os resultados demoram algumas semanas ou meses para ficarem prontos e serão adicionados ao seu prontuário médico;
4. 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.

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

(16) 36023081

Prof^a. Dr^a. Lúcia Regina Martelli

(16)36022598

APÊNDICE II

Família 1:

Paciente 1:

Data de nascimento: 22/07/1983

Sexo masculino

Cariótipo 6847

Encaminhado ao ambulatório da Genética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por infertilidade conjugal. Paciente e esposa tentam ter filhos há três anos, sem sucesso. O exame físico mostrou testículos levemente diminuídos, com dimensões de 4 x 2 cm, consistência parenquimatosa, epidídimo normal e deferentes palpáveis. O espermograma evidenciou azoospermia, enquanto os exames hormonais mostraram resultados normais. A biópsia testicular mostrou uma hialinização da membrana basal de túbulos seminíferos e células germinativas em estágio inicial de maturação.

Paciente 2: Irmã do paciente 1.

Data de nascimento: 05/03/1987

Sexo Feminino

Cariótipo 6998

Casada e desejando filhos. Após tratamento de estimulação ovariana, os exames de citologia hormonal e teste pós-coital foram normais.

Paciente 3: Mãe dos pacientes 1 e 2.

Data de nascimento: 06/01/1962

Sexo Feminino

Cariótipo 6847M

Tem ciclo menstrual normal. Engravidou naturalmente três vezes, vindo a ter três filhos saudáveis e portadores da translocação.

Paciente 4: Marido da Paciente 3 e pai dos Pacientes 1 e 2.

Data de nascimento: 29/07/1958

Sexo Masculino

Cariótipo 6847P

Sem alterações fenotípicas.

Paciente 5: Irmã da paciente 3, tia dos pacientes 1 e 2.

Data de nascimento: 29/03/1970

Sexo Feminino

Cariótipo 7195

Sofreu três abortos espontâneos e teve um filho saudável.

Paciente 6: Irmão da paciente 3, tio dos pacientes 1 e 2.

Data de nascimento: 23/07/1952

Sexo Masculino

Cariótipo 7194

Tem um filho e uma filha saudáveis e um neto.

Paciente 7: Mãe da paciente 3, 5 e 6, avó dos pacientes 1 e 2.

Data de nascimento: 16/02/1930

Sexo Feminino

Cariótipo 7193

Teve 2 filhos e 3 filhas saudáveis.

Família 2:

Paciente 8:

Data de nascimento: 10/04/1965

Sexo masculino

Cariótipo 4818

Encaminhado ao serviço da Genética do Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto por infertilidade conjugal. Casado há doze anos e, mesmo nunca tendo usado métodos anticonceptivos, não teve filhos. O paciente e a sua esposa já tentaram ter filhos por inseminação artificial e duas vezes por fertilização *in vitro*, sem sucesso. O exame físico descreve ginecomastia ausente, sem anomalias congênitas, pênis normal, sem alterações, meato uretral tópic, testículos tópicos com aproximadamente 5cm de tamanho e consistência parenquimatosa. Exames hormonais apontaram resultados normais. O espermograma, porém, mostrou uma oligoastenoteratozoospermia com uma concentração de espermatozoides de $6,0 \times 10^6$ espermatozóides/ml, motilidade de 0% grau A, 12% grau B, 59% grau C e 29% grau D, vitalidade de 71% e morfologia normal de 02%.

Paciente 9: Irmão do paciente 8.

Data de nascimento: 10/09/1963

Sexo masculino

Cariótipo 5229

Casado há cinco anos sem que a esposa consiga engravidar. O exame físico descreve ausência de ginecomastia e/ou anomalias congênitas, pênis sem alterações, meato uretral tópico e testículos normais com 3-4cm e consistência parenquimatosa. Exames hormonais apresentaram resultados normais, porém o espermograma mostrou uma oligoastenozoospermia com uma concentração de $10,0 \times 10^6$ espermatozóides/ml, motilidade de 0% grau A, 06% grau B, 62% grau C e 32% grau D, vitalidade normal de 80% e morfologia normal de 06%.

ANEXOS

ANEXO I



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

www.hcrp.fmrp.usp.br



Ribeirão Preto, 05 de agosto de 2008

Ofício nº 2834/2008
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado "**FATORES GENÉTICOS NA ESPERMATOGÊNESE DE HOMENS INFÉRTEIS**", foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 271ª Reunião Ordinária realizada em 04/08/2008 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 5465/2008.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

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

Atenciosamente.

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

Ilustríssimas Senhoras
MARIA SILVINA JUCHNIUK DE VOZZI
PROFª DRª LÚCIA REGINA MARTELLI (Orientadora)
Depto. de Genética