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

CAMILA CALIXTO MOREIRA DIAS

**Estudos de variação genômica em homens azoospermicos e sua correlação
com a expressão de microRNAs em tecido testicular**

**Ribeirão Preto – SP
2017**

CAMILA CALIXTO MOREIRA DIAS

**Estudos de variação genômica em homens azoospérmico e sua correlação
com a expressão de microRNAs em tecido testicular**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em ciências

Área de Concentração: Genética

Versão corrigida

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

Orientador: Prof. Dr. João Monteiro de Pina-Neto

Ribeirão Preto – SP

2017

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

FICHA CATALOGRÁFICA

Dias, Camila Calixto Moreira

Estudos de variação genômica em homens azoospermico e sua correlação com a expressão de microRNAs em tecido testicular. Ribeirão Preto, 2017.

199 p. : il. ; 30 cm

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

Orientadora: João Monteiro de Pina Neto.

1. Cromossomo Y. 2. Região AZF. 3. microRNA. 4. CNV. 5. Deleção. 6. Duplicação.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Dias, Camila Calixto Moreira. Estudos de variação genômica em homens azoospermico e sua correlação com a expressão de microRNAs em tecido testicular

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

Área de concentração: Genética

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

APOIO E SUPORTE FINANCEIRO

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

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) por meio da bolsa de Doutorado CAPES/PROEX
 - A Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA)
-

Dedico este trabalho

Aos meus pais e irmãos, por todo incentivo, esforço e carinho dispensados a mim para que fosse possível a realização desta jornada.

Ao meu esposo, Otávio e minha filha Betina, com muito amor, admiração e gratidão por toda dedicação, carinho, apoio e cuidado incondicionais. A presença de vocês ao meu lado me fortalece e inspira a buscar sempre o melhor.

AGRADECIMENTOS

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. João Monteiro de Pina Neto, pela orientação do presente trabalho, amizade, paciência, apoio, respeito, carinho, dedicação e também pela imensa contribuição para meu amadurecimento profissional e pessoal. Muito obrigada!

Aos docentes do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto pelos conhecimentos repassados e contribuições na minha formação.

À Prof^a. Dr^a.Ana Lilia Alzate Marin, por gentilmente disponibilizarem o uso de alguns aparelhos de seu laboratório, ao técnico e amigo Fernando Bonifácio e aos integrantes do mesmo por sempre me receberem bem.

Ao Departamento de Genética da FMRP-USP pela estrutura oferecida para o desenvolvimento do presente trabalho.

À CAPES por alguns meses de bolsa de doutorado e suporte financeiro oferecido, bem como ao CNPq e FAEPA.

A todos os voluntários que aceitaram participar do presente trabalho. Muito obrigada!

Aos funcionários do Departamento de Genética da FMRP-USP, Silvia Consiglieri, Gustavo Medeiros, Ana Cláudia de Souza e, em especial Susie A. P. Nalon por toda a atenção, apoio, ajuda, dedicação e simpatia.

Aos professores membros da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuições para este trabalho.

Ao técnico do laboratório de Citogenética Médica do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Luiz Fernando (*in memória*), pelo apoio técnico na realização dos cariótipos desta tese.

Ao Prof. Dr. Alfredo Ribeiro Silva, professor Associado/Coordenador do Laboratório de Oncopatologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal da FMRP – USP, pela análise e classificação das biopsias testiculares deste trabalho.

Ao prof. Dr Wilson Araujo da Silva Junior e suas Técnicas Kamila, Greice e Ane, por todo apoio técnico e científico na realização dos experimentos de ponta realizados nesta tese.

As amigas Daniela Ribeiro, Jeni Gomes e Ludmila do Laboratório de Genética Humana e Médica, pelo excelente ambiente de trabalho, pela amizade, pelos nossos almoços de aniversário e pelos momentos únicos de descontração!

Às minhas grandes amigas, Aline, Amanda, Ana Rita e Luciane Faria, agradeço muito pela nossa amizade e união que sempre nos deram força para enfrentar todos os obstáculos, seja na vida pessoal ou acadêmica. Vocês são muito especiais!

Em especial gostaria de agradecer pelo apoio emocional e científico a querida amiga Amanda Freire de Assis por toda ajuda científica e emocional durante a elaboração da escrita desta tese.

À querida amiga de departamento Fernanda Bueno pela amizade, ajuda com as análises das CNVs, mesmo a distância sempre solicita em tirar as minhas dúvidas.

Aos meu amados pais, Cidinha e Tadeu e minha irmã Sara por todo apoio, carinho, incentivo e principalmente por toda ajuda durante estes 4 anos ajudando a cuidar da minha Betina, para que eu pudesse me dedicar a este trabalho.

Ao meu querido e amado marido Otavio por todo apoio e dedicação ao longo da minha carreira acadêmica e principalmente por compreender a importância deste trabalho na minha vida. Muito obrigada por cuidar de mim e da Betina nos momentos em que eu não podia estar presente integralmente devido a elaboração desta tese. Você sabe que *te arodo* eternamente.

A minha filha amada Betina que com seus cinco anos cheios de vida e de graça e formosura, ensina-me a ser mãe/mulher/amiga. Be perdão pelos momentos de ausência exigidos para minha formação Acadêmica. Agora a tese chegou ao fim. Prometo ser muito mais sua.

Finalmente, agradeço aos meus familiares, a todos os amigos, da vida acadêmica e pessoal, e aos profissionais que de alguma forma me auxiliaram ao longo desse trabalho proporcionando conhecimento, apoio e carinho. Obrigada a todos!

Resumo

Dias, C. C. M. (2017) **Estudos de variação genômica em homens azoospermicos e sua correlação com a expressão de microRNAs em tecido testicular**. Tese de doutorado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

A infertilidade é um problema de saúde pública com um significativo impacto social, econômico e psicológico. Em todo o mundo, a incidência da infertilidade entre a população geral é estimada em 10-15%. Cerca de 50% da infertilidade dos casais são de origem masculina. Em mais da metade dos homens inférteis, a causa da infertilidade é desconhecida (idiopática). Etiologicamente, a infertilidade masculina apresenta causas genéticas e não genéticas. Dentre as causas genéticas mais conhecidas temos mutação do receptor de andrógenos, mutação do gene regulador da condutibilidade transmembrana da fibrose cística (CFTR), anomalias cromossômicas clássicas, anomalias meióticas, microdeleções do cromossomo Y, etc. As anomalias cromossômicas são encontradas com muito mais frequência em homens inférteis, com uma incidência de 4-16% em relação à incidência de 0,4% na população fértil. Estudos mostram que as CNVs também podem estar relacionadas com a infertilidade masculina, especificamente com a falha na espermatogênese. CNVs encontradas tanto no cromossomo Y quanto nos cromossomos autossômicos também foram associadas a possíveis falhas na espermatogênese. Um outro fator que também pode estar envolvido com a infertilidade masculina é a expressão desregulada dos miRNAs. O presente trabalho teve como objetivo promover a análise em larga escala da distribuição de CNVs e do perfil transcricional dos miRNAs em amostras de biopsias testiculares de paciente com azoospermia. Para o estudo das CNVs nós utilizamos a metodologia do CytoScan HD™ da Affymetrix. O perfil transcricional de miRNAs nos indivíduos estudados foi avaliado por meio da tecnologia de microarranjos também da plataforma Affymetrix. Para estas análises montamos dois grupos de estudo (Parada de Maturação (MA) de Células Germinativas e Síndrome de Células Sertoli Only (SCOS)) e um grupo controle (azoospermia obstrutiva e espermatogênese normal). Através das análises das CNVs nós encontramos 94 CNVs nos cromossomos autossômicos e sexuais, 35 (37%) CNVs foram classificadas como benignas, 24 (23%) como potencialmente benignas, sete CNVs (7,4%) como patogênicas e sete foram classificadas como potencialmente patogênica. Todas as CNVs classificadas como patogênica estão presentes no cromossomo Y, cinco CNVs são do tipo duplicação e duas do tipo deleção. A CNV do tipo duplicação foi encontrada no paciente MA e a CNV do tipo deleção foi encontrada no paciente SCOS. As CNVs se sobrepõem e quando analisadas em conjunto (formando uma única CNV de cada condição) elas apresentam um tamanho parecido. Estas

CNVs apresentam genes envolvidos na espermatogênese. As CNVs classificadas como potencialmente patogênicas estavam presentes nos cromossomos autossômicos e cromossomo X. Nestas CNVs estavam presentes genes que foram associados com a falha na espermatogênese. A análise da expressão dos miRNAs revelou um perfil transicional muito mais alterado nos pacientes com SCOS. As duas condições apresentaram miRNAs exclusivos, mas também compartilharam: 30 miRNAs. Nós identificamos duas famílias de miRNAs (miR449 e miR34) diferencialmente expressos nas duas condições e que apresentam expressão preferencial no testículo. Nossos resultados mostram que alterações no número de cópias (CNVs) no cromossomo Y levam a infertilidade masculina e CNVs nos cromossomos autossômicos e X podem levar a infertilidade masculina. As alterações do tipo deleção podem levar a uma falha na espermatogênese maior que as alterações do tipo duplicação. A expressão diferencial dos miRNAs em tecido testicular de pacientes com diferenças histopatológicas (SCOS e MA) apresentam um padrão de expressão de miRNAs diferentes devido ao tipo de células germinativas que eles apresentam no tecido epitelial do testículo.

Palavras chave: Cromossomo Y, Região AZF, Deleção, Duplicação, MicroRNA, Azoospermia, CNV

Abstract

Dias, C. C. M. (2017) **Genomic Variation studies of azoospermic men and their correlation with microRNA expression in testicular tissue**. Thesis – School of Medicine of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil.

Infertility is a public health problem with significant social, economic and psychological impact. Worldwide, the incidence of infertility in the general population is estimated at 10-15%. Approximately 50% of infertility of couples is of male origin. In more than half of infertile men, the cause of infertility is unknown (idiopathic). Etiologically, male infertility has genetic and non-genetic causes. Among the best known genetic causes we found the mutation of the androgen receptor, the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR), classic chromosomal abnormalities, meiotic abnormalities and microdeletions of the Y chromosome. Chromosomal abnormalities are found much more frequently in infertile men, with an incidence of 4-16% in the incidence of 0.4% in the fertile population. Studies show that CNVs can also be related to male infertility, specifically in the failure of spermatogenesis. CNVs found in both the Y and autosomes chromosomes were also associated with possible failures in spermatogenesis. Another factor that may also be involved in male infertility is the deregulated expression of miRNAs. This work aimed to promote the analysis of large-scale distribution of CNVs and the transcriptional profile of miRNAs in testicular biopsy samples from patients with azoospermia. For the study of CNV we used the CytoScan HDTM Affymetrix methodology and the transcriptional profile of miRNAs in the samples was assessed by means of microarray technology from Affymetrix platform. For these analyzes we set up two study groups (Stop Maturation (MA) of Germ Cells and Sertoli Cell Only Syndrome (SCOS)) and compared them to a control group (obstructive azoospermia, normal spermatogenesis). Through analysis of CNVs, we found 94 CNVs in sexual and autosomes chromosomes, 35 (37%) were classified as benign CNVs, 24 (23%) as a potentially benign seven CNVs (7.4%) as pathogenic and 7 were classified as potentially pathogenic. All CNVs classified as pathogenic are present on the Y chromosome, five CNVs are of duplication type and two are deletion type. The duplication type CNV was found in MA patients and deletion type CNV was found in SCOS patient. We identified that CNVs overlap and when analyzed jointed - as a single CNV of each condition - they have a similar size. These CNVs have genes involved in spermatogenesis. CNVs classified as potentially pathogenic were present in autosomes and in the X chromosome. In these CNVs were present genes that were associated with failure in spermatogenesis. The analysis of the expression of miRNAs revealed a transitional profile much more altered in patients with

SCOS. The two conditions presented exclusive miRNAs, but shared 30 miRNAs differentially expressed when compared to the control group. We identify two families of miRNAs (miR449 and miR34) which exhibit preferential expression in testis as differentially expressed in both conditions. Our results show that changes in the number of copies (CNVs) on the Y chromosome lead to male infertility and CNVs in autosomes and X chromosomes may lead to male infertility. The deletion type changes can lead to a failure of spermatogenesis greater than the duplication type changes. The differential expression of miRNAs in patients with testicular tissue histopathologic differences (SCOS and MA) has a different pattern of miRNA expression due to the type of germ cells they present in epithelial tissue of the testis.

Keywords: Y chromosome, AZF region, deletion, duplication, MicroRNA, azoospermia, CNV

Lista de Tabelas

Tabela 1: Descrição dos pacientes investigados.	46
Tabela 2: Sondas presente no kit SALSA MLPA P360-A1 Y-Chromosome Microdeletions probemix.....	49
Tabela 3: Relação do coeficiente de dosagem (DQ) e o número de cópias (baseado no padrão normal de duas cópias) (Fonte: Protocolo de MLPA MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands).	54
Tabela 4: Coeficiente de dosagem das sondas alteradas	76
Tabela 5: Parâmetros de qualidade dos experimentos de aGH	78
Tabela 6: Distribuição de CNVs nos pacientes utilizando filtro de 1KB	78
Tabela 7: Distribuição de CNVs nos pacientes utilizando filtro de 100kb	79
Tabela 8: CNVs identificada na análise utilizando filtro de 1Kb. A tabela mostra a localização Genômica, o tamanho, os genes que estão presentes e a frequência destas CNVs no banco de dados do DGV.....	81
Tabela 9: Distribuição das CNVs de recorrência única e CNVRs por cromossomos	87
Tabela 10: 19 CNVRs encontradas na análise de sobreposição das 94 CNVs.....	89
Tabela 11: CNVs que apresentaram genes ou parte deles e genes que foram encontrados no banco de dados do OMIM Tabela 11	91
Tabela 12: Distribuição geral das CNVs por pacientes que apresentaram Genes descrito ou não descritos no OMIM.....	93
Tabela 13: Total e porcentagem de CNVs encontradas por cromossomo, total e porcentagens de CNVs que apresentaram genes por cromossomo. Total e porcentagem de genes encontrados nas CNVs por cromossomo e total e porcentagens de genes encontrados nas CNVs que estão presentes no banco de dados do OMIM.....	95
Tabela 14: CNVs que apresentaram genes envolvidos com a infertilidade masculina	96
Tabela 15: CNVs classificadas como benignas	99
Tabela 16: CNVs classificadas como potencialmente benignas:.....	101
Tabela 17: CNVs classificadas como patogênicas	104
Tabela 18: Análise da frequência englobando todas as CNVs do paciente 5 e 9 no banco de dados do aDGV e DGV	105

Tabela 19: CNVs classificadas como potencialmente patogênicas.....	107
Tabela 20: CNVs classificadas como significado clínico incerto.....	108
Tabela 21: miRNAs diferencialmente expressos compartilhados por amostras de tecido testicular com Síndrome de Célula de Sertoli (SCOS) e Parada de Maturação (MA) quando comparadas com amostras controles (Fold change > 1.5; p valor ajustado <0.01).....	117
Tabela 22: miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes com Parada de Maturação das células germinativas (MA) e Síndrome de Células de Sertoli Only (SCOS), encontrados no banco de dados HMDD.....	122

Lista de Figuras

- Figura 1:** (A) - Esquema da estrutura do cromossoma Y, (B) - padrão de microdeleções em Yq11 terminal (tracejado) segundo Tiepolo e Zuffardi (1976), (C) - mapa de 43 intervalos segundo Vollrath et al. (1992), (D) - Mapa de microdeleções AZF (AZFa, AZFb, AZFc) segundo Vogt et al. (1996). SRY: gene determinante do sexo masculino; PAR: região pseudoautossômica (local de emparelhamento e de recombinação homóloga com o cromossoma X na meiose I). (Fonte: Ferrás et al. 2004)..... 23
- Figura 2:** Esquema da arquitetura genômica e genes da região AZFa, AZFb e AZFc do cromossomo Y. Ideograma Central representa o cromossomo Y com as regiões pseudoautossômicas indicadas de preto nas pontas do cromossomo (PAR1 e PAR2, respectivamente), os três domínios de heterocromatina indicados de cinza e a região de eucromatina representada de azul. A organização genômica da região AZFa é representada na parte superior da figura e a organização genômica das regiões AZFb e AZFc são representadas na parte inferior da figura. Fonte:(Navarro-Costa, Gonçalves, & Plancha, 2010) . 25
- Figura 3:** Variação no número de cópias em comparação com o genoma de referência. 28
- Figura 4:** Variação no Número de Cópias (CNVs). Genótipos possíveis: A). Número de cópias normais (CN=2); B) Variação dialética; (i) deleção heterozigótica (CN= 1), homozigótica (CN=0); (ii) duplicação heterozigótica (CN=3) e homozigótica (CN=4); C). Alguns exemplos de variação multialélica em que se observa que o mesmo número de cópias pode ser obtido por diferentes combinações genotípicas. (CN= número de cópias). . 29
- Figura 5:** Biogênese dos microRNAs. Via canônica - Os pri-microRNAs são transcritos e processados no núcleo em pre-microRNAs. Via não canônica - os pre-microRNAs são derivados de splicing. Os pre-microRNAs são exportados para o citoplasma, através da Exportina 5, onde são clivados em um duplex de microRNA, sendo uma das fitas incorporada ao complexo miRISC para guiar esse complexo proteico a sequências 34
- Figura 6:** Histologia da biopsia testicular: (A) espermatogênese normal; (B) Parada de Maturação de Células Germinativas; (C) Síndrome de Células de Sertoli Only. (Fonte: Cerilli et al, 2010)..... 46
- Figura 7:** Representação esquemática do ciclo utilizado na reação de PCR..... 52
- Figura 8:** Padrão de bandas do gel de agarose 2% dos produtos amplificados da PCR. A maioria do material deve estar entre 150 e 2000 pb. (Fonte: protocolo CytoScan™)..... 62
- Figura 9:** Padrão de bandas do gel de agarose 4% dos produtos fragmentados. A maioria do material deve estar entre 25 e 125 pb. (Fonte: protocolo CytoScan™)..... 62
- Figura 10:** Representação de uma CNVR. Quatro CNVs sobrepostas são consideradas uma CNVR. 64
- Figura 11:** Visão geral do processo de marcação do RNA com biotina. O processo começa com uma breve inserção de uma cauda poliA na extremidade 3' dos RNAs seguido por ligação da molécula sinal biotinilada na amostra de RNA alvo..... 67

Figura 12: Padrão de amplificação das sondas dentro da faixa da normalidade.	73
Figura 13: Padrão de amplificação das sondas dentro da faixa da normalidade. (A) paciente controle 1, (B) paciente controle 2, (C) paciente controle 3.....	74
Figura 14: Padrão de amplificação alterado das sondas. O gráfico mostra alterações no padrão de amplificação das sondas DPY19L2(307nt) e DPY19L2(380nt). (A) paciente quatro e (B) paciente sete.	75
Figura 15: Padrão de amplificação alterado das sondas do paciente cinco. O gráfico mostra a alteração no padrão de amplificação das sondas BPY2, DAZ, CDY1B e CDY2A.....	76
Figura 16: Padrão de amplificação alterado das sondas do paciente 11. O gráfico mostra a alteração no padrão de amplificação das sondas BPY2, DAZ, CDY1B e RBMY2CP.	77
Figura 17: Gráfico Boxplot pós normalização dos dados.	109
Figura 18: Gráfico do componente principal (PCA), mostrando a similaridade entre os grupos e apontando a existência de uma assinatura de miRNAs para cada condição estudada	110
Figura 19: Gráfico de correlação de Pearson, mostrando a similaridade entre os grupos e apontando a existência de uma assinatura de miRNAs para cada condição estudada.....	108
Figura 20: Heatmap e agrupamento hierárquico das amostras e dos miRNAs diferencialmente expressos entre as condições estudadas: MA_vs_Ctrl, SCOS_vs_Ctrl e SCOS_vs_MA. Total de miRNAs diferencialmente expressos = 393 ($p \leq 0,01$ (ajustado por FDR) e fold change 1,5.....	111
Figura 21: Volcano plot representando os miRNAs diferencialmente expressos entre os pacientes com parada de maturação de células germinativo e o grupo controle (Condição: MA_vs_Ctrl). Total de miRNAs diferencialmente expressos 86 (p ajustado por $FDR \leq 0,01$ e fold change 1,5). Pontos verdes representam os miRNAs reprimidos nos pacientes PA ($n= 57$) e pontos vermelhos ($n= 29$) os miRNAs induzidos nos pacientes PA.	112
Figura 22: Volcano plot representando os miRNAs diferencialmente expressos entre os pacientes Síndrome das células de Sertoli e o grupo controle (Condição: SCOS_vs_Ctrl). Total de miRNAs diferencialmente expressos 245 (p ajustado por $FDR \leq 0,01$ e fold change 1,5). Pontos verdes representam os miRNAs reprimidos nos pacientes SCS ($n= 117$) e pontos vermelhos ($n= 128$) os miRNAs induzidos nos pacientes SCS.....	111
Figura 23: Volcano plot representando os miRNAs diferencialmente expressos entre os pacientes Síndrome das células de Sertoli e os pacientes com parada de maturação de células germinativas (Condição: SCOS_vs_MA). Total de miRNAs diferencialmente expressos 62 (p ajustado por $FDR \leq 0,01$ e fold change 1,5). Pontos verdes representam os miRNAs reprimidos nos pacientes SCOS ($n= 27$) e pontos vermelhos ($n= 35$) os miRNAs induzidos nos pacientes SCOS.	114

Figura 24: Diagrama de Venn mostrando a sobreposição de miRNAs que foram diferencialmente expressos (hiperexpressos e hipoexpressos) nos grupos Síndrome de Célula de Sertoli (SCOS) e parada de maturação (PA) quando comparados ao grupo controle. Apenas os miRNAs com anotação completa foram considerados 116

Figura 25: Processos biológicos apontados pela análise funcional como enriquecidas considerando os potenciais alvos dos microRNAs diferencialmente expressos hipoexpressos (A) e hiperexpressos (B) em amostras Parada de Maturação (MA) em relação ao grupo controle. Os escores de enriquecimento obtidos pelo banco de dados DAVID correspondentes a cada processo biológico estão apresentados como os valores de p em escala logarítmica ($-\log_2$)..... 119

Figura 26: Processos biológicos apontados pela análise funcional como enriquecidas considerando os potenciais alvos dos microRNAs diferencialmente expressos hipoexpressos (A) e hiperexpressos (B) em amostras Síndrome de Célula de Sertoli (SCOS) em relação ao grupo controle. Os escores de enriquecimento obtidos pelo banco de dados DAVID correspondentes a cada processo biológico estão apresentados como os valores de p em escala logarítmica ($-\log_2$)..... 120

Figura 27: Processos biológicos apontados pela análise funcional como enriquecidas considerando os potenciais alvos dos microRNAs diferencialmente expressos hipoexpressos (A) e hiperexpressos (B) em amostras Síndrome de Célula de Sertoli (SCOS) em relação às amostras Parada de Maturação (GA). Os escores de enriquecimento obtidos pelo banco de dados DAVID correspondentes a cada processo biológico estão apresentados como os valores de p em escala logarítmica ($-\log_2$). 121

Figura 28: Representação da sobreposição das CNVs encontradas no cromossomo Y, na região AZF. Em azul está representado as 5 CNVs do tipo duplicação do paciente 5. Em marrom está representado as duas CNVs do tipo deleção no paciente 9. Figura gerada pelo programa ChAS..... 126

Lista de Gráficos

Gráfico 1: Distribuição e tipo de CNVs encontradas por cromossomo.	79
Gráfico 2: Gráfico mostrando a distribuição de tamanhos das CNVs nas amostras de estudo.....	78
Gráfico 3: Distribuição das CNVs, CNVs únicas e CNVRs nos cromossomos	88
Gráfico 4: Total de CNVs por pacientes comparado com CNVs que apresentam genes.....	93
Gráfico 5: Total de CNVs por cromossomo e total de CNVs por cromossomo que apresentaram genes.....	94
Gráfico 6: Classificação e percentual das CNVs Benignas, Potencialmente Benignas, Patogênicas, Potencialmente Patogênicas e significado clínico incerto.....	97
Gráfico 7: Classificação e porcentagem das CNVs por paciente	98
Gráfico 8: Distribuição dos microRNAs, diferencialmente expressos, pelos cromossomos..	115

Sumário

1. Introdução.....	21
1.1 Cromossomo Y	22
1.2 Região AZF	23
1.3 Variação no Número De Cópias (CNVS).....	28
1.4 Variação no Número de Cópias e a Infertilidade Masculina	30
1.5 microRNAs	32
1.6 microRNAs e a Espermatogênese.....	35
2. Hipótese do Trabalho.....	38
3. Objetivos.....	40
4. Aspectos Éticos.....	42
5. Material e Métodos	44
5.1 Obtenção do Material Biológico.....	44
5.2 Critério de Seleção dos Pacientes para Formação do Grupo de Estudo.....	45
5.3 Extração do DNA Genômico e RNA Total	47
5.3.1 Extração de DNA de Sangue Periférico.....	47
5.3.2 Extração de DNA, RNA e microRNA de Biópsia Testicular	47
5.4 Avaliação da Integridade do DNA Genômico e RNA Total	48
5.5 Triagem de Microdeleção/Duplicação do Cromossomo Y na Região AZF Pelo Método de Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA).....	49
5.5.1 Padronização da Técnica de MLPA.....	51
5.5.2 Técnica de MLPA.....	51
5.6 Análise Cromossômica por Cytoscan HD™	54
5.6.1 Análise dos Dados.....	62
5.6.2 Determinação de CNVS pelo Software ChAS.....	64
5.6.3 Análise de Regiões Específicas	66
5.7 Análise da Expressão de Microrna	66
5.7.1 Análise dos Dados de Microarranjos	68

5.7.2 Predição de microRNAs Alvos, Anotação Funcional dos microRNAs Diferencialmente Expressos	70
6. Resultados.....	72
6.1 Análise dos Dados de MLPA	72
6.2 Análise das CNVs.....	77
6.2.1 Qualidade dos Experimentos de Cytoscan HD™	77
6.2.2 Análise das CNVs	78
6.3 Análise dos microRNAs Diferencialmente Expressos nas Amostras de Biopsia Testicular	109
6.3.1 Pré processamento dos Dados	109
6.3.2 análises Estatística da Expressão Diferencial Dos miRNAs.....	111
6.3.3 Distribuição dos microRNAs pelos Cromossomos.....	115
6.3.4 predição de micrornRNAs Alvos, Anotação e Classificação Funcional dos microRNAs Diferencialmente Expressos	115
7. Discussão.....	124
7.1 Alterações Cromossômicas Identificadas por MLPA	124
7. 2 Análise Genômica	127
7.2.1 Perfil de CNVs no Genoma dos Pacientes com Azoospermia Obstrutiva e Azoospermia não Obstrutiva	127
7.2.2 Classificação das CNVs.....	128
7.3 Análise dos microRNAs	131
8. Conclusões	138
9. Referências Bibliográficas	140
Apêndices	157
Anexo de Publicação	171

1. Introdução

A infertilidade é um problema de saúde pública com um significativo impacto social, econômico e psicológico (Suganthi, Vijesh, Vandana, & Fathima Ali Benazir, 2014). Em todo o mundo, a incidência da infertilidade entre a população geral é estimada em cerca de 10-15% (Bushnik, Cook, Yuzpe, Tough, & Collins, 2012). Ela é definida como a diminuição ou ausência da capacidade de conceber ou produzir uma prole viável após um ano de relações sexuais desprotegidas (Rowe & World Health Organization., 2000a).

Tradicionalmente as mulheres de casais inférteis são responsabilizadas pela incapacidade de conceber, mas na realidade, a infertilidade não se limita apenas às mulheres, cerca de 50% da infertilidade dos casais são de origem masculina (Kamali et al., 2007).

Em algumas regiões, como na África, a infertilidade é em torno de 30-40%, sendo os homens responsáveis por 30% dos casos (Leke, Oduma, Bassol-Mayagoitia, Bacha, & Grigor, 1993). A qualidade do esperma humano diminui devido a poluentes ambientais e produtos químicos, que acredita-se causarem mutações genéticas (Duty et al., 2003; Sharpe, 2004). Distúrbios genéticos podem ser responsáveis por uma significativa porcentagem da infertilidade masculina. Tendo sido relatado que 17% dos pacientes com infertilidade masculina têm alterações genéticas (Aoki & Carrell, 2003; Rucker, Mielnik, King, Goldstein, & Schlegel, 1998).

Nos países do ocidente a frequência de alterações genéticas em homens inférteis é de 10%, entre estes, 10% possuem anomalias cromossômicas clássicas, 8% possuem anomalias meióticas e 8-10% possuem microdeleções de AZF (Carrara et al., 2007).

Etiologicamente, a infertilidade masculina apresenta causas não genéticas e genéticas. Consideram-se como principais fatores das causas não genéticas os hábitos (sedentarismo, tabaco, álcool, drogas), os produtos químicos (hormônios, dioxinas, metais pesados), determinados medicamentos, infecções como a parotidite, distúrbios endócrinos, varicocele, criptorquidia e a orquite. Dentre as causas genéticas temos: mutação do receptor de andrógenos, mutação do gene regulador da condutibilidade transmembrana da fibrose cística (CFTR), anomalias cromossômicas clássicas, anomalias meióticas, microdeleções do cromossomo Y, etc. As anomalias cromossômicas são encontradas com muito mais

frequência em homens inférteis, com incidência de 4-16%, já em relação à população fértil a incidência é de 0,4% (Csilla Krausz, 2010).

As microdeleções do cromossomo Y são a segunda causa genética mais comum da infertilidade masculina ocasionada pela falha espermatogênica e têm sido relatadas em 2-25% dos homens inférteis (Hellani, Al-Hassan, Iqbal, & Coskun, 2006). Estudos moleculares sugerem que as microdeleções do cromossomo Y representam o fator etiológico entre 10 a 15% dos casos de azoospermia (ausência de espermatozoides) e oligozoospermia severa (<5 milhões de espermatozoides/ml) (Athalye et al., 2004; Dada, Gupta, & Kucheria, 2004) e 2-3% dos candidatos a ICSI (Injeção intracitoplasmática de espermatozoides) são portadores de microdeleção no cromossomo Y (C. Krausz, Quintana-Murci, & McElreavey, 2000).

1.1 Cromossomo Y

O cromossomo Y é relativamente pequeno (aproximadamente 60 Mb) em relação aos demais cromossomos e representa 2-3% do genoma haplóide. Observações citogenéticas, do cromossomo Y, permitiram a identificação de diferentes regiões como a região pseudoautossômica e as regiões eucromáticas e heterocromáticas.

As regiões pseudoautossomais (PAR) são duas, a PAR1 e PAR2. A PAR1 está localizada na região terminal do braço curto do cromossomo Y (Yp), e a PAR2 no topo do braço longo do cromossomo Y (Yq). PAR1 e PAR2 cobrem aproximadamente 2.600 e 320 kb de DNA, respectivamente. As regiões pseudoautossomais, em particular PAR1, são onde o cromossomo Y pareia e troca o seu material genético com o cromossomo X durante a meiose masculina (região homóloga). Enquanto PAR1 e PAR2 representam 5% de todo o cromossomo, a maioria do comprimento do cromossomo Y (95%) é composta pela região chamada “Não Recombinante do Y”, que inclui as regiões heterocromáticas e eucromáticas e sustentam a maioria das regiões específicas codificadoras do cromossomo Y (Quintana-Murci & Fellous, 2001) (Figura 1a).

Os genes presentes na região pseudoautossômica codificam uma variedade de proteínas que funcionam em ambos os sexos, participando ou controlando atividades tais como crescimento ósseo, transdução de sinal, síntese de hormônios, receptores e metabolismo energético (Lewis, 2004). O segundo grupo funcional de genes do cromossomo Y inclui os homólogos X-Y. Esses genes são muito semelhantes em sequências de DNA a

alguns genes no cromossomo X. Os homólogos X-Y são expressos em quase todos os tecidos, inclusive os encontrados apenas em homens. A existência de genes pseudoautossômicos e homólogos X-Y podem ser evidência de que o cromossomo Y é uma versão simplificada de um cromossomo ancestral semelhante ao X (Lewis, 2004). O terceiro grupo funcional inclui o gene determinante da masculinidade (SRY) e muitos outros genes envolvidos na espermatogênese (Quintana-Murci & Fellous, 2001).

Figura 1: (A) - Esquema da estrutura do cromossoma Y, (B) - padrão de microdeleções em Yq11 terminal (tracejado) segundo Tiepolo e Zuffardi (1976), (C) - mapa de 43 intervalos segundo Vollrath et al. (1992), (D) - Mapa de microdeleções AZF (AZFa, AZFb, AZFc) segundo Vogt et al. (1996). SRY: gene determinante do sexo masculino; PAR: região pseudoautossômica (local de emparelhamento e de recombinação homóloga com o cromossoma X na meiose I). (Fonte: Ferrás et al. 2004)

1.2 Região AZF

As primeiras evidências que permitiram mostrar a existência, no cromossomo Y, de fatores genéticos associados à infertilidade masculina, surgiram na década de 70 com a análise do cariótipo de 1170 homens azoospermicos (Tiepolo & Zuffardi, 1976). Nesses pacientes, observou-se seis casos com perda da região eucromática distal do braço longo (Yq11) do cromossomo Y, o que permitiu propor a existência em Yq11.2 de uma região responsável pela espermatogênese, designada AZF (Fator de Azoospermia) (Figura 1b).

A princípio a região AZF foi subdividido em 43 regiões (Vollrath et al., 1992) (Figura 1c). Estudos moleculares em pacientes inférteis observaram microdeleções intersticiais na região AZF, permitindo então perceber que ali residiam múltiplos genes responsáveis por etapas diferentes da espermatogênese. De acordo com as microdeleções encontradas, a região AZF foi dividida em três regiões (AZFa, AZFb e AZFc) (P. Vogt et al., 1996; P. H. Vogt, 1998), correspondendo a três intervalos de deleções. A região AZFa na parte proximal, AZFb na porção mediana e AZFc na zona distal do cromossomo Y (Figura 1d). Estudos posteriores demonstraram uma sobreposição das regiões AZFb e AZFc, sendo a extremidade distal da região AZFb correspondente ao domínio proximal da região AZFc (Repping et al., 2002).

A região AZFa tem 792 Kb e foi totalmente sequenciada em 1999 (C. Sun et al., 1999). Diferente da região AZFb e AZFc a região AZFa é constituída de cópia única de DNA. A região é flanqueada por dois retrovírus endógenos (HERV) (Figura 2). A completa supressão de AZFa é o resultado da recombinação homóloga não-alélica entre os dois elementos HERV (Blanco et al., 200; C. Sun et al., 2000). Esta supressão está sempre associada à síndrome de células de Sertoli Only e é um evento bastante raro, representando menos de 5% das deleções AZF relatadas. A baixa prevalência de microdeleção nesta região provavelmente decorre da limitação do mecanismo de deleção (tais como a falta de domínios de homologia e um sitio de recombinação curto) e do seu considerável efeito deletério na fertilidade. Já a duplicação desta região, que também é resultante da recombinação entre os HERV, tem uma frequência maior quando comparado à deleção (Bosch & Jobling, 2003). Dois genes têm sido mapeados nesta região, o gene USP9Y e DDX3Y e 11 pseudogenes. Ambos os genes têm homólogos funcionais no cromossomo X (USP9X e DDX3X) em Xp11.4 (B T Lahn et al., 1997). O papel que estes genes desempenham na espermatogênese não está completamente elucidado. A supressão destes genes parece ter consequências fenotípicas apenas na linhagem germinativa masculina, o que sugere que sua função é tecido específico e/ou que os homólogos do cromossomo X podem suprir a sua falta nas linhagens somáticas (Navarro-Costa, Plancha, & Gonçalves, 2010).

Figura 2: Esquema da arquitetura genômica e genes da região AZFa, AZFb e AZFc do cromossomo Y. Ideograma Central representa o cromossomo Y com as regiões pseudoautossômicas indicadas de preto nas pontas do cromossomo (PAR1 e PAR2, respectivamente), os três domínios de heterocromatina indicados de cinza e a região de eucromatina representada de azul. A organização genômica da região AZFa é representada na parte superior da figura e a organização genômica das regiões AZFb e AZFc são representadas na parte inferior da figura. Fonte: (Navarro-Costa, Gonçalves, & Plancha, 2010)

A deleção da região AZFa tem sido associada com a hipoespermatogênese. Consequentemente a biopsia testicular mostra o fenótipo de Síndrome de Células de Sertoli Only (SCOS). Nestes casos de deleção completa da região AZFa é praticamente impossível recuperar espermatozoides maduros após a punção testicular para a utilização de FIV/ ICSI (Hopps et al., 2003). A transmissão da deleção para a prole também é relatada (C. Sun et al., 1999).

Os primeiros sequenciamentos da região AZFb apontavam para uma não sobreposição a região AZFc que abrangia um domínio de 3.2MB, porém o ponto de interrupção molecular que caracteriza a deleção AZFb revelou não só uma extensão maior para esta região, mas também que a porção distal do intervalo de AZFb é parte de AZFc (Mortimer, 1994). A região AZFb se sobrepõe em 1.5 Mb da região AZFc e abrange um total de 6.23 a 7.7 Mb do cromossomo Y (Figura 2). Após a identificação do primeiro gene candidato desta região, RBMY, vários genes de cópia única e famílias de genes multicópias foram descritos. Alguns deles localizados apenas na região AZFb e outros que compartilham as duas regiões (Repping et al., 2002).

Os genes mais conhecidos desta região são CDY2, HSFY, PRY e RBMY. CDY2 foi identificado como uma histona acetiltransferase com uma forte preferência por histona H4 localizada no núcleo de maturação espermático. HSFY codifica três diferentes transcritos expressos principalmente no testículo. PRY codifica uma proteína fosfatase provavelmente envolvida na apoptose de espermatozoides inviáveis. RBMY codifica proteínas expressas predominantemente na fase pré-meiótica das células germinativas (P. H. Vogt et al., 2008). Os pacientes com deleção total desta região são azoospermicos, com análise testicular revelando parada de maturação em espermatócito, em alguns casos muito raros foi relatado a espermatogênese completa em um pequeno número de túbulos seminíferos (Ferlin et al., 2007; Simoni, Tüttelmann, Gromoll, & Nieschlag, 2008).

A região AZFc está localizada na parte distal do cromossomo Y e seu domínio corresponde a 3.5Mb (Figura 2). Com o sequenciamento desta região foi possível observar que aproximadamente 95% das sequências desta região são constituídas por amplicons, que correspondem a grandes sequências de DNA presentes em múltiplas cópias. Os amplicons estão organizados em sequências de famílias, cada uma exibindo uma assinatura genética específica (Navarro-Costa, Gonçalves, et al., 2010). Cópias ativas de quatro famílias de genes codificadores de proteínas são mapeados no intervalo AZFc: PRY2, BPY2, DAZ e CDY1 (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001).

Estudos mostram que os genes desta região têm funções específicas como: apoptose das células germinativas (PRY2) (Stouffs et al., 2001, 2004), ubiquitinação de proteínas (BPY2) (E. Y.M. Wong, 2003; Elaine Y M Wong et al., 2004), regulação transcricional ligada à remodelação da cromatina (CDY1) (Caron et al., 2003; Bruce T Lahn et al., 2002) e transporte, armazenamento e ativação de transcritos relacionados à regulação do desenvolvimento das células germinativas (DAZ)(Collier, Gorgoni, Loveridge, Cooke, & Gray, 2005; Kee, Angeles, Flores, Nguyen, & Reijo Pera, 2009; K. H. Lee et al., 2006).

As duas últimas famílias genicas citadas apresentam homólogos autossômicos (Dorus, Gilbert, Forster, Barndt, & Lahn, 2003; Reynolds & Cooke, 2005). Portanto, certo grau de redundância funcional entre as cópias do cromossomo Y e as cópias autossômicas podem parcialmente representar a produção de espermatozóides maduros em homens com deleção na região AZFc (Navarro-Costa, Gonçalves, et al., 2010). Isso pode explicar o fenótipo menos grave e o comprometimento menor da espermatogênese associado a deleções AZFc quando comparados com os fenótipos mais afetados de pacientes com deleção na região AZFa ou AZFb (Navarro-Costa, Gonçalves, et al., 2010).

A análise do perfil de expressão gênica de pacientes inférteis com azoospermia e oligospermia com ausência ou presença de microdeleções na região AZFc revelou que a infertilidade masculina pode ser desencadeada por um mecanismo patogênico comum, que está provavelmente relacionado com alterações no armazenamento de mRNA testicular. Os dados sugerem que a falta da expressão do gene DAZ pode ser o gatilho de tal mecanismo. Além disso, a presença de deleções em AZFc em mosaico ou a perda de função dos genes AZFc na ausência de microdeleções pode talvez explicar esses achados (Gatta et al., 2010). Um outro estudo que analisou o perfil de expressão gênica de pacientes com microdeleção na região AZFb, AZFc e AZFb/c revelou que os genes deletados desta região tem um efeito significativo na espermatogênese por modular a rede transcricional das células germinativas e somáticas (Cappallo-Obermann, Von, @bullet, Schulze, & Spiess, 2010).

Apesar dos avanços no estudo da região AZF, o conhecimento das funções dos genes desta região ainda é consideravelmente limitado. Os genes AZF apresentam diferenças consideráveis na organização genômica e função molecular. Os dados disponíveis indicam que USP9Y e DDX3Y em AZFa, CDY2, HSFY, PRY e RBMY em AZFb e PRY2, BPY2, DAZ e CDY1 em AZFc representam fatores determinantes para a espermatogênese. No entanto, a caracterização dos outros Genes AZF ainda é bastante incipiente. Assim, os estudos nesta

área são de suma importância para um melhor entendimento das funções dos genes da região AZF no processo de espermatogênese masculina.

1.3 Variação no Número De Cópias (CNVS)

O genoma humano apresenta variações estruturais que podem ser desde uma simples troca de base, conhecido como polimorfismo de nucleotídeo único (SNPs) até grandes variações que envolve centenas de nucleotídeos, conhecidas como variação no número de cópias ou Copy Number Variations (CNVs) (Feuk et al., 2006; Stranger et al., 2007; Wain e Tobin, 2011). Até pouco tempo as CNVs eram definidas como segmentos genômicos, que variam no número de cópias, com tamanho igual ou maior que 1 kilobase (KB) quando comparado com o genoma de referência (Figura 3) (Feuk et al., 2006; Estivill e Armengol, 2007). Hoje há estudos classificando as CNVs a partir de segmentos de DNA maiores que 50 pares de bases (pb) e os segmentos menores classificadas como deleções ou inserções (MacDonald et al., 2014).

Figura 3: Variação no número de cópias em comparação com o genoma de referência.

As CNVs são caracterizadas por ganhos (duplicação) ou perdas (deleção) de sequências genômicas e podem ser dialélicas ou multialélicas. Os eventos de deleção ou duplicação de uma CNV pode ocorrer em homozigose ou heterozigose (Wain e Tobin 2011)

(Figura 4). De acordo com a região onde são encontradas elas podem conter genes ou parte deles (Monolio et al. 2009).

Figura 4: Representação esquemática de CNV dialélicas e multialélica A) Genoma referência - número de cópias normais (CN=2); B) CNV dialélica; (i) deleção heterozigótica (CN= 1), homozigótica (CN=0); (ii) duplicação heterozigótica (CN=3) e homozigótica (CN=4); C). Alguns exemplos de variação multialélica em que se observa que o mesmo número de cópias pode ser obtido por diferentes combinações genotípicas (CN= número de cópias). Fonte: Wain e Tobin, 2011 adaptado Barbosa, 2013.

Desde meados dos anos 70 estudos já apontavam que doenças poderiam estar relacionadas com modificações no número de copias no genoma humano. Mas apenas em 2004 foi possível evidenciar esta variação. Dois estudos independentes em larga escala evidenciaram que indivíduos saudáveis apresentavam centenas de regiões genômicas que variavam no número de cópias (lafrate et al., 2004; Sebat et al., 2004).

O estudo realizado por lafrate et al, 2004 revelou que a maioria das CNVs deletadas ou duplicadas foram observadas em mais de um indivíduo sugerindo ser um caráter polimórfico.

Um estudo realizado em 2006 demonstrou que variações no genoma dos indivíduos resultam em diferenças nos níveis de expressão dos genes envolvidos, e que, assim, as variantes presentes em indivíduos saudáveis possivelmente estão relacionadas com a adaptação (McCarroll et al. 2006). A maioria das alterações encontradas foi localizada em regiões pobres ou ausentes de genes, podendo ser neutras ou ter efeitos reguladores modestos, devido à presença de regiões altamente conservadas (Conrad et al., 2006).

Dessa forma, as CNVs encontradas em grandes grupos controle (populações não afetadas) e, por este motivo, não parecem estar associadas a nenhum quadro clínico, devem ser classificadas como CNVs neutras (benignas) (Gijsbers et al., 2009).

Muitas vezes, é difícil interpretar a patogenicidade de uma CNV, devido à expressão variável do alelo remanescente e à incompleta penetrância, as quais podem causar ou não consequências clínicas em diferentes membros da família (Ensenauer et al. 2003; Yobb et al., 2005). Vários estudos estão associando as CNVs com doenças genéticas, como o câncer (Diskin et al., 2009; Jacob et al., 2009), diabetes (Grayson et al., 2010) e a esquizofrenia (Ikeda et al., 2010).

Com o aumento dos estudos sobre CNVs, algumas iniciativas criaram plataformas capazes de coletar e comparar dados citogenéticos moleculares de diversos centros clínicos do mundo. Essas plataformas estão ajudando a compreender melhor o papel das CNVs em distúrbios genéticos e é possível citar dois bancos de dados que ajudam os pesquisadores em estudos de CNVs: o DGV (Database of Genomic Variation) que é um dos bancos de dados genômicos com a apresentação do maior número de depósitos de CNVs oriundas de diversos grupos de estudos (Iafrate et al., 2004), e o DECIPHER (Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources, o qual compila dados sobre microalterações patogênicas (Firth et al., 2009).

1.4 Variação no Número de Cópias e a Infertilidade Masculina

Além das doenças genéticas já citadas, estudos mostram que as CNVs também podem estar relacionadas com doenças ligadas ao desenvolvimento e função genital, como: digenesia gonadal XY, falência prematura ovariana (FOP), Síndrome de Mayer Rokitansky Kuster (S Ledig, Röpke, & Wieacker, 2010; Susanne Ledig et al., 2011) e falha na espermatogênese (Eggers et al., 2015; Hansen, Eichler, Fullerton, & Carrell, 2010; Stouffs et al., 2012b; Tüttelmann et al., 2011; Elaine Y.M Wong, Tse, Yao, Tam, & Yeung, 2002).

Foi observado que CNVs envolvendo deleção gr/gr na região AZFc do cromossomo Y e a perda do número de cópia do gene TSPY levam a um aumento na falha da espermatogênese (Giachini et al., 2009a; Lo Giacco et al., 2014; Machev et al.,

2004; Repping et al., 2003). Uma pesquisa realizada com nove pacientes com falha na espermatogênese identificou sete CNVs que podem estar envolvidas na infertilidade desses pacientes (Stouffs et al., 2012a). Outro estudo envolvendo pacientes com Síndrome de Células de Sertoli Only (SCOS) e Oligospermia Severa revelou duas CNVs encontradas nos pacientes SCOS, apresentando genes relacionados com a síndrome (Tüttelmann et al., 2011). De acordo com um estudo realizado no Reino Unido, as CNVs são abundantes no cromossomo Y e mais de 6 Mb de sequência genômica têm variações no número de cópias. E, ainda, tais variações podem afetar mais de um terço das proteínas codificadas pelo cromossomo Y (Wei et al., 2015).

CNVs em cromossomos autossômicos também podem estar associadas com a infertilidade masculina; isso foi o que revelou um estudo com pacientes inférteis ao relacionar CNVs em cromossomos autossômicos com a infertilidade masculina e revelar alguns genes candidatos envolvidos com falha na espermatogênese nesses pacientes (Dong et al., 2015a).

Considerando a alta complexidade da espermatogênese, a qual requer mais de dois mil genes, é provável mais de 40% da infertilidade masculina etiológica estar ligado a fatores genéticos ainda desconhecidos (Csilla Krausz, 2011).

As CNVs podem induzir um efeito patogênico de várias maneiras: mudança estrutural na região reguladora de genes; aumento ou diminuição de regiões codificadoras de proteínas, que pode ter um efeito direto nos níveis de RNA mensageiros; grandes CNVs podem alterar a configuração da cromatina, como também pode causar distúrbios no pareamento das regiões PAR durante a meiose (Chandley & Edmond, 1971; Chianese, Gunning, Giachini, Daguin, Balercia, Ars, Giacco, Filatov, et al., 2014; Sanyal, Lajoie, Jain, & Dekker, 2012; F. Zhang, Gu, Hurles, & Lupski, 2009) .

Os estudos de CNVs em pacientes inférteis ainda estão no começo, mas já demonstram que de alguma forma as variações genômicas podem estar envolvidas com a falha na espermatogênese. Mais estudos são necessários para elucidar melhor como tais alterações genômicas de ganho ou perda podem influenciar na falha da espermatogênese, levando à infertilidade.

1.5 MICRORNAS

Os microRNAs (miRNAs) são RNAs endógenos de fita simples, compostos por aproximadamente 22 nucleotídeos e que não codificam proteínas, são evolutivamente conservados e atuam como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica (Bartel 2004). Em humanos estima-se que mais de 50% do transcriptoma está sob o controle de microRNAs (Bartel 2009; Rigoutsos 2009; Pasquinelli 2012).

Em 1993 foi descrito o primeiro miRNA, o lin-4, descoberto no *Nemátodo Caenorhabditis Elegans* (Lee et al. 1993; Wightman et al. 1993). Depois da descoberta do lin-4, centenas de outros miRNAs foram identificados em animais, plantas e vírus (Lagos-Quintana et al. 2001; Lau et al. 2001; Lee e Ambros 2001; Berezikov et al. 2006; Ruby et al. 2006; Bushati e Cohen 2007), e, hoje, existem mais de 2.500 microRNAs maduros descritos em humanos (miRBase release 21, junho 2014).

Essas pequenas moléculas são encontradas em células e em vários fluídos corporais, como, sangue, saliva, espermatozoides, urina e podem estar vinculados a proteínas ou incorporados em microvesículas após serem secretados pelas células, impedindo assim, sua degradação (Moreno- Moya et al. 2014). Apresentam grande estabilidade e uma meia-vida acima de 14 horas, com exceção de alguns miRNAs cuja degradação é mais rápida (Hwang et al. 2007; Kim et al. 2009).

Estudos mostram que os miRNAs estão envolvidos na regulação de vários processos biológicos, incluindo desenvolvimento, diferenciação, apoptose, proliferação celular, diferenciação celular (Bartel 2004; Carleton et al., 2007; Tang et al., 2007; Lakshmipathy et al., 2007). Além dos processos biológicos já citados foi visto que os miRNAs também podem participar de processos patológicos como o câncer (Guo et al., 2009; Gilabert-Estelles et al., 2012). A desregulação de miRNAs pode dirigir ou contribuir com a tumorigênese (Croce, 2009).

A regulação pós-transcricional realizada pelos miRNAs pode ocorrer por inibição traducional ou degradação do mRNA alvo. A forma com que o miRNA vai atuar para inibir a tradução do mRNA vai depender do grau de complementariedade do miRNA com seu mRNA alvo. O pareamento perfeito entre o miRNA e seu mRNA alvo levará a degradação do mRNA e o pareamento imperfeito levará a inibição traducional do alvo. O principal mecanismo de atuação dos miRNAs em mamíferos são o de pareamento imperfeito. Sabe-se que um único

miRNA pode regular muitos mRNAs, isso ocorre devido ao fato de possuírem sequências pequenas e não necessitar do pareamento completo com seu alvo para atuarem (Brennecke et al., 2005).

Os miRNAs são transcritos de regiões genômicas que podem ser regiões codificadoras e não codificadoras de proteínas. Semelhante aos mRNAs os miRNAs possuem uma 7-metil guanosina na extremidade 5' e uma cauda poli (A) na extremidade 3' e na maioria das vezes são transcritos pela enzima RNA polimerase II. (Lee et al., 2004; Shin et al., 2009; Davis e Hata, 2009).

Em humanos a biogênese dos miRNA ocorre em duas etapas, uma que ocorre no núcleo e outra que ocorre no citoplasma. A biogênese inicia com transcrição mediada pela enzima RNA polimerase II, gerando os miRNAs primários (pri-miRNAs), uma molécula com muitos nucleotídeos e estrutura(s) em grapo(s) chamado(s) hairpin(s) (Bushati e Cohen 2007).

A biogênese dos miRNAs pode ocorrer pela via canônica e via não canônica. Na via canônica, os pri-miRNAs são clivados no núcleo por um complexo que compreende a enzima RNaseIII, a ribonuclease Drosha e a proteína DGCR8 (DiGeorge syndrome critical region protein 8) produzindo os precursores dos miRNAs, os pré-miRNAs. Na via não canônica, os pré-miRNAs são formados a partir de mirtrons (pequenos miRNAs intrônicos) nos spliceossomos. Os pré-miRNAs são transportados do núcleo para o citoplasma pela proteína Exportina para serem processados pela enzima Dicer formando duplex miRNA/miRNA*. O duplex miRNA formado por Dicer é desenrolado para que uma das fitas seja selecionada e atue como miRNA maduro (Finnegan e Pasquinelli 2013). A fita selecionada se associa ao complexo RISC (RNA-Induced Silencing Complex) que é formado pela enzima Dicer, proteína Argonauta e TRBP (Trans-activator RNA Binding Protein). O miRNA e o complexo RISC interagem com a região 3' UTR do mRNA alvo regulando a sua expressão. O anelamento perfeito entre o miRNA e seu mRNA alvo resulta na repressão dos genes alvos e na clivagem do mRNA (Figura 5) (Faraoni et al., 2009; Dai & Ahmed, 2011).

Figura 5: Biogênese dos microRNAs. Via canônica - Os pri-microRNAs são transcritos e processados no núcleo em pre-microRNAs. Via não canônica - os pre-microRNAs são derivados de splicing. Os pre-microRNAs são exportados para o citoplasma, através da Exportina 5, onde são clivados em um duplex de microRNA, sendo uma das fitas incorporada ao complexo miRISC para guiar esse complexo proteico a sequências. Fonte: Filipowicz et al. 2008 adaptado Takahashi, 2014.

Achava-se que a fita não selecionada, denominada passageira ou fita estrela (*), era rapidamente degradada, mas estudos demonstram que em algumas situações, as fitas passageiras podem ser selecionadas e direcionar a repressão dos seus alvos (Okamura et al. 2008; Finnegan e Pasquinelli 2013). A fita guia é selecionada durante a ligação da proteína Argonauta na formação do complexo RISC, seguindo as bases da estabilidade termodinâmica das duas porções finais do duplex de miRNA. A fita com um terminal relativamente instável na porção 5' é tipicamente selecionada como a fita guia (Khvorova et al. 2003; Finnegan e Pasquinelli 2013).

O crescente número de estudos com miRNAs vem revelando o importante desempenho destes pequenos RNAs em diversos processos biológicos. Além disso, através da regulação global da expressão gênica e associação a diferentes funções, torna-se evidente que os miRNAs possam alterar a progressão de diversas patologias. Assim, como nova e

importante peça do processo de regulação gênica, os microRNAs apresentam diversas e cruciais funções biológicas nas células animais e tem sido alvo de muito interesse para estudo nos últimos anos.

1.6 microRNAs e a Espermatogênese

Recentemente estudos têm demonstrado que os miRNAs desempenham um papel importante no controle das funções reprodutivas como ovulação, desenvolvimento do corpo lúteo, implantação do embrião e na espermatogênese (Imbar e Eisenberg, 2012; Kotaja, 2014).

Uma revisão da literatura feita por Kotaja, 2014 mostra que os miRNAs contribuem para a regulação dos perfis de expressão de genes durante espermatogênese. Os miRNAs são expressos em tipos de células específicas durante a espermatogênese e participam do controle de etapas específicas da diferenciação das células germinativas masculinas. O seu papel na expressão espacial e temporal correta de genes específicos das células germinativas é fundamental para a produção viável e saudável dos espermatozoides. Curiosamente os andrógenos parecem controlar eventos espermatogênicos através de mecanismos dependentes de miRNA. Estudos relatam que a expressão testicular dos miRNAs muda dependendo do estágio da espermatogênese (Hayashi et al., 2008; Maatouk et al., 2008). A análise de 28 miRNAs isolados de várias populações celulares como espermatogônias, Células de Sertoli, espermatócitos, espermátides redondas e em alongamento de espermatozoides, sugerem que as células germinativas são a principal fonte de produção de miRNA durante espermatogênese (Ro et al., 2007; Bouhallier et al., 2010).

Um estudo recente relatou que a inativação de Drosha ou Dicer em células espermatogênicas reduz espermatócitos e espermátides nos testículos e leva a oligoteratozoospermia ou azoospermia, indicando desse modo que a via canônica de miRNA dependente de Drosha ou de Dicer é criticamente importante para desenvolvimento de células germinativas masculinas (Wu et al., 2012).

Hayashi, 2008 e colaboradores mostraram que os clusters mir-17-92 e mir-290-295 eram altamente expressos em células germinativas primordiais e espermatogônias de ratos. Eles também descobriram que os níveis de miR-141, miR-200a, miR-200c, e miR-323 são

reduzidos com a progressão do desenvolvimento das células germinativas primordiais, mas a família let-7 miRNA são altamente expressos, sugerindo fortemente que estes miRNAs podem desempenhar papéis na espermatogênese em mamíferos.

Além disso, estudos têm apontado os papéis dos vários miRNAs em diferentes etapas da espermatogênese em mamíferos. Um destes estudos mostrou que miR-21, miR-34c, miR-182, miR-183, and miR-146a foram abundantes em células tronco espermatogoniais de ratos. Curiosamente o mir-21 é controlado por ETV5, um fator de transcrição para a manutenção do auto renovação das células tronco espermatogoniais, que desempenham um importante papel na homeostase destas células (Niu et al., 2011). Outro estudo mostrou que a etapa chave para a espermatogênese e diferenciação espermatogonial tem sido modulado por vários miRNAs. Dois cluster de miRNAs o mir-17-92 e mir-106b-25 são down regulados na diferenciação espermatogonial induzida por ácido retinóico. Como resultado seus alvos que são importantes para o desenvolvimento da espermatogênese e são upregulados pelo ácido retinóico na espermatogênese, sugerindo que seus miRNAs podem regular a diferenciação da espermatogonia de ratos (Oatley et al., 2010; Tong et al., 2012).

Um estudo realizado em pacientes inférteis identificou miRNAs diferencialmente expressos onde 154 eram down regulados e 19 up regulados entre um grupo com Azoospermia não obstrutiva e um grupo controle (Lian et al., 2009). Wang et al., 2011 relatou 19 miRNAs com expressão alterada no plasma seminal e sugeriu que os miRNAs poderiam ser utilizados para diagnosticar infertilidade masculina. A identificação de 68 miRNAs pela tecnologia de microarray em espermatozóides humanos indica que o perfil de espermatozoides pode ser usado para identificar especificamente homens inférteis (Ostermeier et al., 2005).

Apesar dos vários estudos feitos para elucidar o papel dos miRNAs na espermatogênese são necessários mais estudos para entender melhor o papel destas moléculas na espermatogênese e na infertilidade masculina.

Hipótese do Trabalho

2. Hipótese do Trabalho

A literatura nos mostra que os genes presentes na região AZF do cromossomo Y, bem como alguns genes presentes em cromossomos autossômicos e no cromossomo X, são responsáveis pela formação do epitélio germinativo e o processo de espermatogênese.

Neste trabalho pretende-se testar a hipótese de que alterações no número de cópias destes genes bem como as alterações no perfil transcricional do pool dos miRNAs do tecido germinativo podem estar envolvidos com a infertilidade idiopática nos homens.

Objetivos

3. Objetivos

Objetivo geral:

O presente trabalho teve como objetivo promover a análise em larga escala da distribuição de CNVs e do perfil transcricional dos miRNAs em amostras de biopsias testiculares de paciente com azoospermia.

Objetivos específicos:

1. Detectar CNVs em pacientes com Azoospermia por meio da utilização da técnica de CytoScan HDTM com chips de DNA de alta densidade;
2. Analisar as CNVs encontradas no grupo de indivíduos investigados de acordo com seu tipo, localização, tamanho, genes presentes, presença na população e estimar o seu potencial patogênico;
3. Identificar os perfis de expressão de miRNAs em amostras de biopsia testicular de pacientes com parada de maturação das células germinativas (MA) e pacientes com síndrome de células de Sertoli Only (SCOS) utilizando a tecnologia de microarrays;
4. Comparar o perfil transcricional entre parada de maturação das células germinativas e síndrome de células de Sertoli Only, visando verificar se há perfis diferenciais entre estes tipos de alterações do epitélio germinativo.

4. Aspectos Éticos

O projeto para elaboração do presente trabalho: “ Análise da expressão de mRNA e miRNA da Região AZF em Yq11 em Tecido Testicular de Homens inférteis com Azoospermia” foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP/USP, sob processo nº 42353015.2.0000.5440. As amostras deste estudo foram colhidas após o paciente ter assinado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice 1).

5. Material e Métodos

5.1 Obtenção do Material Biológico

Foram coletadas 20 amostras de biopsia testicular e sangue periférico de homens inférteis (azoospermicos) que estavam sendo assistidos pelos médicos do ambulatório de Urologia do Hospital de Clinicas FMRP/USP. Estes pacientes estavam em tratamento para a realização da fertilização in vitro.

O tecido coletado era dividido em dois fragmentos. Um fragmento era congelado em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta e mantidos desta forma até o momento da extração do DNA e RNA. O outro fragmento era acondicionado em um frasco contendo fixador e enviado para análise histopatológica. O sangue periférico era coletado em dois tubos Vacutainer® de 5mL. Um tubo contendo heparina sódica, destinada à cultura temporária de linfócitos para obtenção de células metafásicas para exame citogenético (cariótipo) e o outro tubo contendo EDTA, destinadas à extração de DNA.

Antes da coleta do material biológico dos pacientes todas as informações a respeito do projeto de pesquisa eram fornecidas ao paciente e eventuais dúvidas eram esclarecidas e ao final o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido era assinado (Apêndice 1).

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

Foram coletadas 20 amostras de biopsia testicular e sangue periférico de homens inférteis (azoospermicos) que estavam sendo assistidos pelos médicos do ambulatório de Urologia do Hospital de Clinicas FMRP/USP. Estes pacientes estavam em tratamento para a realização da fertilização in vitro.

O tecido coletado era dividido em dois fragmentos. Um fragmento era congelado em nitrogênio líquido imediatamente após a coleta e mantidos desta forma até o momento da extração do DNA e RNA. O outro fragmento era acondicionado em um frasco contendo fixador e enviado para análise histopatológica. O sangue periférico era coletado em dois tubos Vacutainer® de 5mL. Um tubo contendo heparina sódica, destinada à cultura temporária de linfócitos para obtenção de células metafásicas para exame citogenético (cariótipo) e o outro tubo contendo EDTA, destinadas à extração de DNA.

Antes da coleta do material biológico dos pacientes todas as informações a respeito do projeto de pesquisa eram fornecidas ao paciente e eventuais dúvidas eram esclarecidas e ao final o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido era assinado (Apêndice 1).

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

5.2 Critério de Seleção dos Pacientes para Formação do Grupo de Estudo

Os critérios de inclusão para a seleção das amostras coletadas dos pacientes com infertilidade masculina foram os seguintes:

1º critério: Cariótipo Normal;

2º critério: Exames hormonais normais (FSH, LH, Testosterona e Prolactina)

3º critério: Pacientes sem histórico e características clínicas de doenças que possam levar a infertilidade tais como varicocele, orquites, infecções como tuberculose ou hanseníase, hipogonadismos, síndromes cromossômicas ou gênicas (Carrara et al. 2000)

Os exames de cariótipo foram realizados no laboratório de Citogenética do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP). Para este exame foram contadas 100 metáfases.

Os resultados dos exames hormonais e o histórico médico dos pacientes foram obtidos através de levantamentos realizados no prontuário do HCFMRP.

Após a triagem das 20 amostras coletadas seguindo os critérios de inclusão, apenas 6 amostras atenderam aos três critérios de seleção. Três amostras por apresentarem biopsia normal (Azoospermia obstrutiva – causa pós testicular) foram incluídos ao grupo de estudo como amostras controles. Total de amostras incluídas no estudo foram nove.

Com o apoio do Departamento de Patologia da FMRP/HCRP estas nove amostras foram analisadas do ponto de vista histopatológico segundo a classificação padronizada (Figura 6) e aplicando-se o Escore de Johnsen (Johnsen, 1970) o qual divide em 3 grupos (Tabela 1) e aplicando uma gradação ou escala que vai de 1 a 10, onde 1 seria o epitélio germinativo mais alterado possível e 10 o epitélio germinativo normal.

1º grupo: Pacientes com epitélio germinativo normal (Ctrl, controle).

2º grupo: Pacientes com Parada de maturação de células germinativas (MA, Maturation Arrest).

3º grupo: Pacientes com Síndrome de células de Sertoli Only (SCOS - Sertoli cell Only Syndrome).

Figura 6: Histologia da biopsia testicular: (A) espermatogênese normal; (B) Parada de Maturação de Células Germinativas; (C) Síndrome de Células de Sertoli Only. (Fonte: Cerilli et al, 2010).

O grupo um foi considerado o grupo controle, pois apresenta espermatogênese normal. O grupo dois e três foram considerados o grupo de estudo, pois apresentam falha na espermatogênese. Com os grupos de estudo formados foram realizadas as extrações do DNA e RNA das biopsias testiculares.

Tabela 1: Descrição dos pacientes investigados.

Grupo	Paciente	Idade	Espermograma	Biopsia	Escore de Johnsen
1	1	36	Azoospermia (obstrutiva)	Normal	10
	2	35	Azoospermia (obstrutiva)	Normal	10
	3	36	Azoospermia (obstrutiva)	Normal	9
2	4	28	Azoospermia	Parada de maturação de células germinativas	6
	5	28	Azoospermia	Parada de maturação de células germinativas	6
	6	36	Azoospermia	Parada de maturação de células germinativas	5
3	7	31	Azoospermia	Síndrome de células de Sertoli Only	2
	8	34	Azoospermia	Síndrome de células de Sertoli Only	2
	9	31	Azoospermia	Síndrome de células de Sertoli Only	2

5.3 Extração do DNA Genômico e RNA Total

5.3.1 Extração de DNA de Sangue Periférico

Foram coletados de cada indivíduo, aproximadamente 03 mL de sangue periférico através de punção venosa com seringa e agulha descartáveis, não expondo os pacientes a qualquer risco à saúde. Após a coleta, as amostras de sangue foram armazenadas em tubos contendo EDTA 5% conservados em recipiente com gelo e transportadas até o laboratório de Genética Humana e Médica.

Para a extração do DNA utilizou-se o Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corp., Madison, WI, USA) seguindo as instruções do fabricante.

Primeiro, foi feita a transferência de 03mL de sangue para tubo Falcon de 15 mL. Em seguida, realizou-se a lise das membranas celulares através da adição e homogeneização de 09 mL da solução de lise celular. Depois, os tubos foram incubados em temperatura ambiente por 10 minutos e então centrifugados em velocidade 2.000 X g durante 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Logo, foram adicionados e homogeneizados 03 mL de solução de lise nuclear, sendo acrescentado 01 mL da solução de precipitação de proteínas. Após vortexar por 20 segundos, o material foi novamente centrifugado em velocidade 2.000 X g durante 10 minutos. O sobrenadante foi transferido para um novo tubo Falcon 50 mL, ao qual foram acrescentados 15 mL de isopropanol para a precipitação do DNA na solução.

Após esse procedimento, o DNA foi retirado, colocado em tubo de eppendorf e seco à temperatura ambiente, sendo posteriormente ressuspendido em 100 µl de água MilliQ. As amostras de DNA diluídas em água foram estocadas em freezer a -20o C de temperatura para posterior análise pela técnica de MLPA e Cytoscan HD™.

5.3.2 Extração de DNA, RNA e microRNA de Biópsia Testicular

Para a extração de DNA, RNA e microRNA das amostras de biópsia testicular foi utilizamos o kit AllPrep DNA/RNA/miRNA Universal Kit (QIAGEN), seguindo as instruções do fabricante.

O princípio do kit consiste em integrar a tecnologia do isolamento de DNA dupla fita por ligação específica com a tecnologia RNeasy de extração de RNA.

As amostras biológicas foram primeiramente lizadas e homogeneizadas em um tampão de isotiocianato de guanidina de alta desnaturação, que inativa DNases e RNases para garantir o isolamento de DNA e RNA íntegros. O lizado foi passado pela coluna AllPrep DNA Mini spin, que em combinação com um tampão com alta concentração de sal, permite a ligação eficiente e seletiva de DNA genômico. Em seguida, a coluna foi lavada e foi eluído o DNA puro e pronto para o uso. As amostras de DNA foram estocadas em freezer a -20o C de temperatura para posterior análise por MLPA. O eluído da lavagem da coluna AllPrep DNA Mini spin foi digerido por proteinase K na presença de etanol. Essa digestão otimizada e a subsequente adição de etanol permite a ligação eficiente do RNA total, incluindo microRNA, na coluna RNeasy Mini spin. A digestão com DNase I garante altas concentrações de RNA livre de DNA. Os contaminantes são eficientemente removidos e RNA de alta qualidade foi obtido. O RNA foi estocado em freezer a -80o C de temperatura.

5.4 Avaliação da Integridade do DNA Genômico e RNA Total

A qualidade do DNA extraído foi analisada através de gel de agarose 1,2% corado com brometo de etídio. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria (NanoDrop, Thermo Scientific) e 500ng foram aplicados no gel de agarose. Após a eletroforese a visualização do gel foi realizado através de uma foto documentador. Através da imagem gerada foi feita a análise da integridade do DNA.

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

5.5 Triagem de Microdeleção/Duplicação do Cromossomo Y na Região AZF Pelo Método de Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification (MLPA)

Para triagem dos pacientes com ausência ou presença de microdeleção/duplicação foi utilizado o kit SALSA MLPA probemix P360-A1 Y-Chromosome Microdeletions.

Este kit foi desenhado para detectar deleção/duplicação de uma ou mais sequencias de DNA da região AZF. Este kit contém 53 sondas que amplificam produtos de tamanhos entre 136 e 500 nt (Tabela 2). Destas 53 sondas, 14 sondas detectam sequencias da região AZFa, 16 sondas que detectam sequencias da região AZFb, 13 sondas detectam sequencias da região AZFc, duas sondas detectam o gene DPY19L2, deletada em pacientes com globozoospermia (Ray et al., 2011), que está localizado no cromossomo 12q14 e 8 sondas controles que detectam regiões autossômicas. Além destas sondas o kit contém nove fragmentos de controle de qualidade da reação de MLPA, que amplificam produtos menores que 120nt. Quatro destes fragmentos são para verificar a qualidade do DNA, três destes fragmentos são para verificar a eficiência da desnaturação do DNA, um fragmento para a identificação da presença do cromossomo Y e um fragmento para a identificação da presença do cromossomo X.

As reações de MLPA foram realizadas de acordo com o protocolo do fabricante (MCR-Holland®, Amsterdam, Netherlands)

Tabela 2: Sondas presente no kit SALSA MLPA P360-A1 Y-Chromosome Microdeletions probemix

Comprimento nt	Sonda	Posição Cromossômica
64-70-76-82	Q-fragments: DNA quantity; only visible with less than 100 ng sample DNA	
88-92-96	D-fragments: Low signal of 88 or 96 nt fragment indicates incomplete denaturation	
100	X-fragment: Specific for the X chromosome	
105	Y-fragment: Specific for the Y chromosome	
136	EIF1AY probe 11734-L12517	Yq11.222
142	PPP1R12BP1 probe 12733-L14796	Yq11.23
147	RBMV2CP probe 11804-L12599	Yq11.223 / Yq11.23
153	Reference probe 12212-L13140	3p21
160	CDY2B probe 15236-L17486	Yq11.221
166	BPY2 probe 11739-L13811	Yq11.223
178	BPY2 probe 11740-L14251	Yq11.223
184	VCY1B probe 15238-L17485	Yq11.221
190	Reference probe 06378-L05844	6p25

Comprimento nt	Sonda	Posição Cromossômica
196	Reference probe 08170-L08050	5q22
202	KDM5D probe 11744-L13987	Yq11.222
208	KDM5D probe 11747-L12530	Yq11.222
215	UTY probe 11812-L13342	Yq11.21
223	CDY2A probe 11749-L18625	Yq11.221
228	RPS24P1 probe 15239-L18627	Yq11.21
234	CDY2A probe 15245-L18626	Yq11.221/Yq11.223/Yq11.23
241	KDM5D probe 11754-L12537	Yq11.222
247	ARSEP probe 11818-L17483	Yq11.21
252	KDM5D probe 11756-L13817	Yq11.223
259	RBM1Y1J probe 11757-L13818	Yq11.223
265	DAZ2 probe 11758-L12541	Yq11.223 / Yq11.23
271	Reference probe 14361-L00694	4q35
276	SRY probe 01023-L15420	Yp11.31
283	DAZ2 probe 12738-L12543	Yq11.223 / Yq11.23
288	CDY2B probe 11759-L14252	Yq11.221 / Yq11.222
292	Reference probe 08790-L11322	10q21
301	DAZ2 probe 11761-L12544	Yq11.223 / Yq11.23
307	DPY19L2 probe 17170-L20718	12q14.2
312	UTY probe 11824-L20831	Yq11.21
319	RPS24P1 probe 11825-L20832	Yq11.21
327	USP9Y probe 11826-L12621	Yq11.21
333	Reference probe 01790-L10676	13q14
342	VCY1B probe 15243-L15069	Yq11.221
347	UTY probe 11828-L19232	Yq11.21
355	VCY1B probe 15240-L18629	Yq11.221
361	CDY1B probe 15246-L12554	Yq11.223 / Yq11.23
366	USP9Y probe 15244-L12618	Yq11.21
373	BPY2 probe 11768-L14716	Yq11.223 (2x)/ Yq11.23 (1x)
380	DPY19L2 probe 17171-L20390	12q14.2
389	RBM1Y2DP probe 15241-L12617	Yq11.23
396	HSFY1 probe 15247-L18630	Yq11.222 (2x)
402	VCY1B probe 11852-L18631	Yq11.221
409	HSFY1 probe 11772-L12555	Yq11.222
418	BPY2 probe 11773-L12556	Yq11.223
427	RBM1Y1J probe 11774-L12557	Yq11.223
436	HSFY1 probe 12740-L18632	Yq11.222 (2x)
445	KDM5D probe 11776-L12559	Yq11.222
454	USP9Y probe 11836-L12631	Yq11.21
463	NLGN4Y probe 11853-L12650	Yq11.221
472	Reference probe 14160-L20657	2p25.1
486	BPY2 probe 15248-L19234	Yq11.221/Yq11.223/ Yq11.23
490	EIF1AY probe 15249-L12560	Yq11.222
500	Reference probe 12462-L19605	22q12

5.5.1 Padronização da Técnica de MLPA

Inicialmente, para a padronização da técnica de MLPA, foram utilizadas amostras de DNA de 14 pacientes encaminhados ao laboratório de Genética Humana e Médica para exame de microdeleção no cromossomo Y pelo método padrão de PCR Multiplex de STS. Três amostras de homens férteis como controle normal foram incluídas tanto na padronização como na triagem dos pacientes em estudo, conforme recomendação do fabricante (MCR-Holland®, Amsterdam, Netherlands). Após a padronização, foi realizada a triagem dos pacientes em estudo.

5.5.2 Técnica de MLPA

– Desnaturação do DNA e Hibridização das Sondas

Para a primeira fase da reação de MLPA, que é a fase de desnaturação do DNA e hibridização das sondas, foram pipetados 5 µl de DNA na concentração de 100ng/µl em tubos de 0,2 ml. Os tubos foram colocados em termociclador para a desnaturação por 5 minutos a 98° C, com posterior resfriamento a 25° C. Durante o período de desnaturação do DNA o máster mix de hibridização foi preparado contendo para cada reação: 1,5 µl de tampão de MLPA e 1,5 µl de probemix. Com o termociclador a 25° C, foram adicionados 3 µl de máster mix de hibridização por tubo. Após ressuspensão, a reação foi mantida a 95°C por 1 minuto e incubada a 60°C durante 18 horas.

– Reação de Ligação

Na segunda fase da reação, foi preparado o máster mix de ligação, contendo 3 µl de tampão A ligase-65, 3 µl de tampão B ligase-65, 25 µl de H₂O e 1 µl de ligase-65 por reação. As amostras foram colocadas em termociclador a 54o C. Nessa temperatura foram adicionados 32 µl máster mix de ligação a cada tubo e homogeneizados com o auxílio de uma pipeta. As amostras foram incubadas por 15 minutos a 54o C, seguido de 5 minutos a 98o C.

– Reação de PCR

Os produtos obtidos na etapa de ligação foram amplificados pela reação em cadeia da polimerase (PCR), através do master mix polimerase, produzido pela adição de 2 μ l de SALSA PCR primer mix, que contém um conjunto de primers marcados com 6-FAM, mais 0,5 μ l de SALSA Polimerase e 7,5 μ l de água destilada para cada amostra. Após o preparo do máster mix polimerase 10 μ l desse mix foi aplicado em cada um dos tubos presentes no termociclador a temperatura de 20° C. Seguiu-se a programação do termociclador com 35 ciclos, sendo as amostras aquecidas a 95° C por 30 segundos, resfriadas a 60° C por 30 segundos e depois reaquecidas a 72° C por 60 segundos. Por fim, os tubos foram incubados a 72° C por 20 minutos e, em seguida, mantidos a 15° C (Figura 7).

Figura 7: Representação esquemática do ciclo utilizado na reação de PCR

– Separação e Visualização dos Produtos de Amplificação

Para a leitura no sequenciador, foi preparado o mix de injeção, sendo adicionado a cada amostra 0,2 μ l de size standard 500 LIZ e 9,4 μ l de formamida. Após homogeneização do mix, foi distribuído, em cada poço da placa de sequenciamento, 9,6 μ l do mix de injeção. Em seguida, o produto de amplificação de cada amostra foi distribuído ao longo da placa em volumes correspondentes a 0,5 μ l. Depois, as amostras contidas na placa foram desnaturadas a 98°C por 5 minutos e rapidamente resfriadas a 4° C e então colocadas no sequenciador ABI 3500 Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) para apropriada separação dos fragmentos.

– **Análise dos Dados de MLPA**

Para avaliar a qualidade do experimento, normalização e análise dos dados de MLPA foi utilizando o software Coffalyser.NET (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands).

A fluorescência medida pela eletroforese capilar não pode ser utilizada diretamente para os cálculos do número de cópia por ser afetado por muitas variáveis.

Para que as análises possam ser feitas é necessário fazer a normalização da fluorescência medida de cada sonda dentro de cada amostra para obter dados significativos. Em seguida fazer a comparação de várias amostras para estabelecer quais amostra tem alterações numéricas.

Resumidamente a normalização do MLPA consistem em 2 etapas: normalização intra amostral (comparação do pico das sondas dentro da amostra) e normalização inter amostral (comparação dos picos relativo das sondas entre as amostras).

Intra amostral – Dentro de cada amostra cada pico das sondas é comparado com os picos das sondas referencias. As sondas referencias detectam sequencias que se esperam que tenham um número normal de cópias em todas as amostras. Quase todos os kits de MLPA contêm 8 ou mais sondas referencias localizados em vários cromossomos.

Os sinais das sondas obtidos na normalização inter amostral são utilizados na normalização inter amostral

Inter amostral – A razão final das sondas é determinada pela comparação do pico relativo das sondas nas amostras de DNA de interesse com todos as amostras de referência. Esperasse que as amostras referências tenham o número de cópia normal para as sondas referências e sondas específicas.

O padrão de pico das sondas do experimento de MLPA de uma amostra de DNA sem anomalias genômicas será idêntica à das amostras de referência. A razão final da sonda determinada na normalização inter amostral será aproximadamente 1,0. Se for deleção em heterozigose a razão da sonda será aproximadamente 0,7 e se for duplicação em heterozigose a razão da sonda será aproximadamente 1,3. Dessa forma, intensidade de sinal (resultante da razão de cada sonda, + ou - o desvio padrão referente à mesma) maiores que 0,70 e menores que 1,3 serão considerados normais (tabela 3):

Intensidade de sinal normal: $0,70 < \text{Razão} \pm \sigma < 1,30$

A razão da sonda também é chamada de coeficiente de dosagem (DQ) (Tabela 3). O Coffalyser.Net calcula o DQ de cada sonda em cada amostra e também o desvio padrão de cada sonda para assegurar um resultado confiável.

Tabela 3: Relação do coeficiente de dosagem (DQ) e o número de cópias (baseado no padrão normal de duas cópias) (Fonte: Protocolo de MLPA MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands)

Distribuição do Cociente de Dosagem	Número de cópias
DQ = 0	0 cópias (deleção em homozigose)
0.40 < DQ < 0.65	2 - 1 cópias (deleção em heterozigose)
0.80 < DQ < 1.20	Normal (idêntico a amostra referência)
1.30 < DQ < 1.65	2-3 cópias (duplicação em heterozigose)
1.75 < DQ < 2.15	2-4 cópias (ou 1-2 cópias)
Outros valores	Resultado ambíguo

5.6 Análise Cromossômica por Cytoscan HD™

Para uma abordagem em larga escala no genoma a fim de identificar CNVs do tipo deleções ou duplicações, utilizamos a plataforma GeneChip System CytoScan HD™ (Affymetrix®) juntamente com os reagentes do *kit* CytoScan™ Assay, seguindo as recomendações do fabricante. Com mais de 2,6 milhões de marcadores de número de cópias, o CytoScan HD Suite perfazendo todos os genes OMIM™ e RefSeq, o que permite uma análise de alta resolução do número de cópias de DNA nos genomas estudados.

As amostras foram processadas de acordo com as recomendações contidas no manual do usuário CytoScan™ Assay (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA – disponível em: http://tools.thermofisher.com/content/sfs/manuals/cytoscan_assay_user_manual.pdf). Em suma as etapas do ensaio consiste em:

– Preparação do DNA genômico

Alíquotas do DNA genômico (gDNA) amostral (pacientes) foram preparadas a uma concentração final de 50ng/μl, utilizando-se TE Low EDTA como tampão de diluição.

Em uma placa de 96 poços, mantida no gelo, foram aliquotados em poços separados, 5µl do gDNA de cada amostras, 5µl do DNA controle positivo (fornecido pelo kit) e 5µl de tampão TE Low EDTA (controle negativo), respectivamente nesta ordem. A placa então foi selada e centrifugada a 2000rpm por 1 minuto e depois mantida no gelo.

– Digestão por enzima de restrição

Em um tubo tipo *Eppendorf* de 1.5ml, preparamos o mix de digestão contendo 11,55 µl de água livre de nucleasse, 2,0 µl de tampão da Nspl 10x, 0,2 µl de BSA 1000x e 1,0 µl enzima Nspl para cada uma das reações de digestão, ou seja, n° de amostras, 1 controle positivo e 1 controle negativo. O mix de digestão foi homogeneizado em um vórtex em alta velocidade por 3 vezes, 1 segundo cada vez.

Após, retirou-se o selo da placa contendo as amostras de DNA mais os controles e distribuiu-se 14,75µl do mix de digestão em cada amostra e os controles. A placa foi novamente selada, com um novo selo, colocada no vortex em alta velocidade e então centrifugada a 2000rpm por 1 minuto.

A placa então foi levada para um termociclador para digestão do DNA, seguindo um programa de temperatura 37°C por 2 horas, 65°C por 20 minutos e resfriamento à 4°C.

Após a finalização do programa a placa foi centrifugada a 2000rpm por 1 minuto. Em seguida colocou-se a placa no gelo e então procedeu-se a próxima etapa

– Ligação dos adaptadores

Após a digestão com a enzima Nspl, os fragmentos de DNA apresentarão extremidades coesivas de 4pb as quais são substratos para ligação de adaptadores específicos.

Para a reação de ligação dos adaptadores, primeiramente prepara-se em um tubo de 1,5ml tipo *Eppendorf*, o mix de ligação constituído de 0,75 µl do adaptador Nspl (50µM), 2,5µl de tampão 10X da T4 DNA Ligase, 2,0 µl enzima T4 DNA Ligase, totalizando 5,25µl de mix de ligação por reação. A mistura foi homogeneizada em um vórtex em alta velocidade por 3 vezes, 1 segundo cada vez e mantida no gelo.

Em seguida, retirou-se o selo da placa contendo as amostras digeridas e dispensou-se 5,25µl do mix de ligação em cada poço contendo as amostras digeridas e os controles

positivo e negativo. A placa foi novamente selada, levada ao vórtex em alta velocidade e então centrifugada a 2000rpm por 1 minuto.

Após, a placa foi levada ao termociclador e então seguiu-se com o programa de ligação com as seguintes ciclagens: 16°C por 3 horas, 70°C por 20 minutos e resfriamento à 4°C.

Após este período a placa foi centrifugada a 2000rpm por um minuto, e mantida no gelo para a realização da etapa posterior que é a de amplificação dos fragmentos.

– **Amplificação dos fragmentos por PCR**

As amostras de DNA e os controles provenientes da reação de ligação foram diluídas em 75 µl de água livre de nuclease. A placa foi selada e colocada no vórtex em alta velocidade, centrifugada a 200 rpm por um minuto e depois levada para o gelo.

Para uma nova placa de PCR transferiu-se 4 alíquotas de 10ul de cada DNA amostras e dos controles provenientes da reação de ligação (quadruplicatas).

Em seguida, o mix de reação de PCR foi preparado em um tubo contendo 39,5 µl de água livre de nuclease, 20,0 µl de reagente GC-Melt, 14,0 µl de dNTP, 4,5 µl de iniciador (PCR Primer 002), 10,0 µl tampão da Taq TITTANIUM™ 50X, 2,0 µl enzima Taq DNA Polimerase TITTANIUM™, perfazendo 90ul de mix por reação. O mix foi homogeneizado em vórtex três vezes em alta velocidade;

Com o auxílio de uma pipeta 90ul mix de PCR foram adicionado em cada poço de placa de PCR onde previamente foram depositados os 10ul das amostras provenientes da reação de ligação, totalizando um volume final de 100ul. A placa foi selada, levada ao vórtex em alta velocidade por 2 vezes e depois centrifugada a 2000rpm por 1 minuto.

A placa foi então colocada no termociclador e seguiu-se com o programa de ciclagem para PCR recomendado pelo fabricante:

- 94°C por 3 minutos ---> 1x
 - 94°C por 30 segundos
 - 60°C por 45 segundos
 - 68°C por 15 segundos
- } 30x
- 68°C por 7 minutos ---> 1x
 - Resfriamento à 4°C

– **Checagem da reação de PCR por meio de eletroforese em gel de agarose**

Após a etapa de amplificação é recomendada uma checagem para assegurar-se a consistência dos resultados. Para tal, é realizada uma eletroforese em gel de agarose 2% do produto da PCR.

Para a corrida eletroforética, utilizamos alíquotas de cada amostra contendo 3ul da reação de PCR, nas quais adiciona-se 5ul de água livre de nuclease e 2ul do tampão de amostra 5X RapidRun Loading Dye.

Como as condições da PCR foram otimizadas para amplificar fragmentos entre 150 e 2000 pb, utilizamos na corrida eletroforética o marcador de peso molecular USB 50-2000pb e o padrão de bandas visualizado no gel deveria corresponder ao intervalo 150 a 2000pb, como mostrado na Figura 8.

Figura 8: Padrão de bandas do gel de agarose 2% dos produtos amplificados da PCR. A maioria do material deve estar entre 150 e 2000 pb. (Fonte: protocolo CytoScan™).

– **Purificação do produto de PCR:**

Após a checagem da consistência dos resultados, o produto de PCR pode então ser purificado.

Em um tubo de 1.5ml tipo *Eppendorf* foram juntadas em um único *pool* todas as 4 alíquotas de cada amostras (quadruplicata) provenientes da reação de PCR, portando cada amostra passa a ter agora um volume de 397ul [100ul (100x 4 (quadruplicatas da PCR) – 3ul (alíquota para eletroforese)]. As alíquotas do controle negativo foram descartadas após a checagem.

Seguiu-se então com a purificação onde em cada tudo de amostra adicionou-se 720ul do reagente Purification Beads. Os tubos foram tampados e então a mistura foi homogeneizada por inversão e incubados à temperatura ambiente por 10 minutos para que ocorra a ligação do DNA às *beads* magnéticas. Após este período, os tubos foram centrifugados à 16100rcf por 3 minutos.

Após a centrifugação os tubos foram transferidos para um suporte magnéticos (MagnaRack™ Life Technologies) até que todos os *pellets* se movessem para o polo magnético (base do tubo). Com o auxílio de uma pipeta, retirou-se, cuidadosamente, o sobrenadante que foi descartado.

Em seguida, adicionou-se a cada amostra 1,0ml de tampão de lavagem e purificação. Os tubos foram tampados e levados ao vórtex por 2 minutos para a ressuspensão do *pellet*. Após, os tubos foram centrifugados por 3 minutos à 16,100 rcf.

Novamente os tubos foram levados para o suporte magnético e, após os *pellets* moverem-se todos para o polo magnético, como auxílio de uma pipeta o sobrenadante foi retirado e descartando.

Os tubos foram, então, centrifugados por 30 segundo em velocidade máxima e retornados ao suporte magnético, o remanescente de tampão de lavagem e purificação foi então cuidadosamente retirado de cada tudo.

Os tubos foram retirados do suporte magnético e deixados destampados à temperatura ambiente por 10 minutos para a total evaporação do tampão de lavagem.

As amostras foram então eluídas em 52ul de tampão de eluição. E então os tubos foram levados ao vórtex em velocidade máxima por 10 minutos para a total ressuspensão do material aderido às *beads* magnéticas. Após este período os tubos foram centrifugados por 3 minutos à 16100 rcf e então levados ao suporte magnético por 10 minutos para que agora, somente as *beads* magnéticas aderissem à parede basal do tubo, visto que DNA amplificado estava eluído no tampão. O volume de 47ul de cada amostra eluída e o controle positivo, foi transferido para poços de uma placa de 96 poços. Após a transferência das amostras e do controle positivo a placa foi selada e levada ao vórtex em velocidade máxima e depois centrifugada a 2000rpm por 1 minuto. Após a centrifugação a placa foi mantida no gelo.

– **Quantificação e avaliação da pureza das amostras por espectrofotometria**

Alíquotas de 2,0ul de cada amostra foram feitas a avaliação quanto à concentração do DNA, e OD à 260, 280 e 320 nm em um aparelho NanoDrop. Os padrões de leituras a serem atingidos para que possa se dar prosseguimento são: Concentração: ≥ 2500 ng/ μ L; Pureza: Razão A260/A280: 1,8 e 2,0 Medição A320: $< 0,1$.

– **Fragmentação**

Constatando-se a boa qualidade das amostras, prossegue-se com a etapa de fragmentação das mesmas. A placa contendo as amostras e o controle positivo purificados é mantida no gelo.

Realiza-se, então, o preparo do mix de fragmentação, em um tubo de 1,5ml tipo *Eppendorf*, contendo: 122,4 μ L de água livre de nuclease, 7,2 μ L de reagente de fragmentação e 158,4 μ L de tampão de fragmentação, sempre no gelo. O mix é homogeneizado em um vórtex em alta velocidade por 3 vezes. Após, são adicionados à cada amostra purificada 10,0 ul de mix de fragmentação de modo cuidadoso para que não ocorra a formação de bolhas. O volume final resultante Será de 55ul. A placa é então selada, levada ao vórtex em alta velocidade e então levada para centrifugação refrigerada à 4°C por 1 minuto à 2000rpm. Imediatamente, transferiu-se a placa para o termociclador a 37°C por 35 minutos e 85°C por 15 minutos. Após a ciclagem, a placa foi centrifugada à 200 rpm por 1 minuto e mantida no gelo.

– **Checagem da reação de fragmentação**

Após a etapa de fragmentação, foi realizado uma eletroforese em gel de agarose 4% para checar se a fragmentação foi bem sucedida. Para tal, foram aliqotados 4ul das amostras fragmentadas aos quais foram adicionados 28ul de água livre de nucleases. Desta diluição, utilizou-se 8ul para cada amostra, aos quais foram adicionados 2ul do tampão de amostra USB 5X RapidRun™ Loading Dye. Como marcador de peso molecular utilizamos o TrackIt™ 25 pb. O padrão de bandas visualizado no gel deveria corresponder ao intervalo de 25 a 125 pb para confirmar que houve a fragmentação, como mostrado na Figura 9.

Figura 9: Padrão de bandas do gel de agarose 4% dos produtos fragmentados. A maioria do material deve estar entre 25 e 125 pb. (Fonte: protocolo CytoScan™)

– Marcação

Procedeu-se com a preparação do mix de marcação, sempre mantendo todos os reagentes e a placa contendo as amostras fragmentadas no gelo. Para o preparo do mix de marcação, em um tubo de 1,5ml adicionamos: 2,0 μ L de reagente de marcação do DNA; 14,0 μ L de tampão da TdT 5X; 3,5 μ L de enzima TdT. Os tubos foram levados ao vórtex em alta velocidade por 3 vezes para a homogeneização da mistura. Em seguida, distribui-se 19,5ul de mix de marcação em cada poço da placa contendo as amostras fragmentadas, totalizando um volume final de 70.5ul. A placa foi selada, colocada no vórtex em alta velocidade e depois centrifugada sob refrigeração à 4°C por 1 minuto à 2000rpm. Em seguida a placa foi levada ao termociclador onde seguiu-se o programa de ciclagem: 37°C por 4 horas, 95°C por 15 minutos e resfriamento à 4°C. Após a ciclagem a placa foi centrifugada à 2000 rpm por 1 minuto e mantida no gelo.

– Hibridação nos Chips Cytoscan HD™

A etapa de hibridação das amostras consiste na deposição de cada amostras marcadas em um chip de microarray CytoScan HD™.

Primeiramente, realizamos o preparo do mix de hibridação em um tubo de 15ml, mantido no gelo, onde foram misturados para cada reação de hibridação 165,0 μ L de tampão de hibridação 1, 15,0 μ L tampão de hibridação 2, 7,0 μ L de tampão de hibridação 3, 1,0 μ L de tampão de hibridação 4, 2,0 μ L reagente Oligo Control 0100 , totalizando 190ul de

mix de hibridação para cada reação. O tubo foi levado ao vórtex em alta velocidade por 3 vezes.

Com o auxílio de uma pipeta adicionou-se 190ul do mix de hibridação em cada poço da placa contendo as amostras. A placa foi selada, levada ao vórtex em alta velocidade por 2 vezes e então centrifugada à 2000rpm por 1 minuto. Em seguida a placa foi colocada no termociclador em ciclagem de 95°C por 10 minutos e à 49°C indefinidamente.

A placa foi mantida no termociclador para continuar à 49°C. Então com uma pipeta removeu-se 200ul do poço correspondente à primeira amostra e imediatamente injetou-se o volume em um array. O mesmo procedimento foi adotado até todas as amostras serem depositadas nos arrays. Imediatamente, os chips foram levados ao forno de hibridação (GeneChip® Hybridization Oven 640; Affymetrix Inc.), onde permaneceram em rotação à 60 rpm por 16 horas à 50°C.

– Lavagem dos chips e coloração das marcações

Os processos de lavagem e coloração de cada chip, foram executados automaticamente na estação fluídica (Fluidic Station 450) e através do software Affymetrix GeneChip Command Console (AGCC, V3.2.2) que executa a operação da estação fluídica e do escâner.

Primeiramente os recipientes laterais da estação são preenchidos, cada, com os tampões de lavagem A e B.

Então os seguintes reagentes são aliquotados em tubos de 1,5ml para cada array: 500ul do tampão de coloração 1 (usar tubos âmbar), 500ul de tampão de coloração 2 e 800ul do tampão *Array Holding* (tubo azul). Os tubos contendo os reagentes citados correspondeu a um chip e foram posicionados na parte frontal da estação, nas respectivas posições sequenciais.

Após as 16 horas de hibridação, os chips foram removidos do forno e colocados nos respectivos módulos da estação fluídica previamente configurada conforme descrição acima. O protocolo de lavagem e coloração é então procedido segundo o programa de execução automática CytoScanHD_Array_450.

Após esta etapa, os arrays são ejetados da estação fluídica e, caso não seja constatado a presença de bolhas de ar nos chips, os mesmos estão prontos para serem escaneados.

– Escaneamento dos chips

Os chips foram escaneados no aparelho GeneChip Scanner 3000 7G o qual é controlado pelo programa AGCC Scan Control.

Os chips foram carregados no carrossel do scanner e então o programa procedeu com a captura da imagem dos arrays. As imagens geradas foram analisadas no programa de visualização GeneChip® Operating software (GCOS) (Affymetrix®), no qual pode-se verificar se o padrão das sondas controle do sistema estava correto, para tal as mesmas devem estar dispostas nas extremidades e no centro de cada chip. Ao final do escaneamento o software gera sete arquivos incluindo o arquivo com extensão .CEL que é utilizado como *input* para a análise dos dados.

5.6.1 Análise dos Dados

– Padrões de Qualidade Dos Experimentos

A avaliação da qualidade dos experimentos de Cytoscan HD foram feitos através de três parâmetros (SNPQ, MAPD, WavinessSD) recomendados pelo fabricante que avaliam se os dados obtidos são viáveis para análise do número de cópias (CN) das CNVs.

MAPD

MAPD (Median Absolute Pairwise Difference) é uma medida global da variação de todas as sondas de microarray através do genoma. Representa a mediana da distribuição de mudanças na razão Log2 entre sondas adjacentes. Uma vez que mede as diferenças entre sondas adjacentes, é uma medida de curto alcance nos dados de microarray.

WavinessSD

WavinessSD (Waviness Standard Deviation) é uma medida global na variação das sondas de longo alcance. Ele mede o desvio padrão na razão Log2 referente a variações em grandes segmentos.

SNPQC

SNPQC (Single Nucleotide Polymorphism Quality Control) fornece informações sobre o nível global da qualidade dos dados de microarray a partir de uma perspectiva de SNPs. Esse indicador estima a distribuição dos alelos em homozigose (AA ou BB) e em heterozigose (AB) calculando a distância entre eles. Quanto melhor a separação dessas distribuições, melhor é a capacidade de identificar o genótipo com base na sua posição no cluster (Barbosa, 2013).

5.6.2 Determinação de CNVs pelo Software ChAS

A determinação das CNVs (deleção ou duplicação) a partir dos dados gerados por microarray foi realizada pelo software Chromosome Analysis Suite v.1.2.2 (ChAS) (Affymetrix®).

Para a análise dos dados o programa utiliza um modelo de referência que incluiu os dados de CNVs de 380 indivíduos controles. Este modelo de referência foi obtido de um conjunto de nove operadores que processaram aproximadamente 48 amostras únicas em duas rodadas cada, com randomização das amostras de DNA, reagentes e instrumentos utilizados. Das 380 amostras utilizadas, 284 eram provenientes do projeto HapMap de três grupos étnicos distintos (Gibbs et al., 2003): africanos (Yoruba), asiáticos e caucasianos, derivadas de linhagens celulares pertencentes ao Instituto de Pesquisa Médica Coriell (Coriell Institute of Medical Research), e 96 amostras de DNA a partir de sangue de indivíduos saudáveis pertencentes a companhia BioServe Biotechnologies (BioServe, Beltsville, USA) (Barbosa, 2013).

Para a detecção das CNVs deletadas utilizou-se no mínimo 25 marcadores e 50 marcadores para duplicação como o recomendado pela Affymetrix® como seguro na detecção de CNVs com pouco risco e resultados falso-positivos.

Os dados gerados pelo ChAS foram visualizados na forma de gráficos e tabelas. Nos gráficos, são observados log2 ratio, o weighted log2 ratio e o CNstate (CN). O CN refere-se ao número de cópias de cada segmento genômico (Tabela 4).

Tabela 4: Número de cópias (CN) normal, deletado e duplicado de CNVs encontradas em cromossomos autossômicos e nos cromossomos X e Y

	Cromossomo Autossômico	Cromossomo X ou Y
Deleção	CN= 1 ou 0	CN=0
Normal	CN= 2	CN= 1
Duplicação	CN>2	CN≥2

Para cada amostra analisada o programa gera uma tabela com várias informações como: alteração cromossômica detectada (cromossomo, citobanda, posição inicial e final), genes sobrepostos, e se as alterações encontradas que estão presentes no catálogo do OMIM® (Online Mendelian Inheritance in Man).

– Determinação do Padrão de Recorrência das CNVs

Para a análise do padrão de recorrência das CNVs foi considerado a localização genômica.

As CNVs que foram encontradas em apenas um indivíduo e que não se sobrepunham a nenhuma outra CNV foram classificadas como sendo de recorrência única. Já as CNVs compartilhadas, com sobreposição de parte de segmentos ou sobreposição total foram agrupadas em regiões de CNVs denominadas CNVRs. As CNVRs representam a região de CNVs que se sobrepõe entre os indivíduos, ou seja, se duas ou mais CNVs tem a mesma localização genômica, a totalidade do segmento variável é agrupado em CNVR (Figura 10).

Figura 8: Representação de uma CNVR. Quatro CNVs sobrepostas são consideradas uma CNVR. Fonte: Barbosa 2013.

– Classificação das CNVS

Para análise e classificação das CNVs, foram usados os seguintes banco de dados: DGV - Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation>), catálogo de CNVs encontradas em indivíduos saudáveis, aDGV – banco de dados de 3000 pessoas saudáveis que está presente no programa ChAS, DECIPHER – Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (<http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/DECIPHER/>) e o OMIM® (Online Mendelian Inheritance in Man) que são banco de dados de CNVs patogênicas encontradas em indivíduos do mundo todo.

A classificação das CNVs foi realizada com base nos resultados obtidos pela análise do programa ChAS, que mostra o tamanho, localização das CNVs, se possuem genes ou não e se estão presentes nos bancos de dados citados acima.

Após as análises e com base nas diretrizes de classificação de Kearney et al 2011 as CNVs foram classificadas da seguinte forma:

CNVs benignas - descritas na população saudável com frequência maior que um por cento e que não apresentam genes relacionados com a infertilidade masculina ou que não apresentam genes.

CNVs potencialmente benignas – descrita na população saudável com frequência igual ou menor que um por cento e que não apresentam genes ou apresentam genes que não estão relacionados a infertilidade.

CNVs patogênicas – descritas na literatura como patogênicas para infertilidade masculina, que apresentam genes relacionados a infertilidade masculina e grandes CNVs que não estão descritas na literatura com o mesmo tamanho observado nos pacientes deste estudo, mas que pode sobrepor a um intervalo menor com significado clínico;

CNVs potencialmente patogênicas - identificadas desta forma por possuir genes relevantes, e que aparece na literatura como possível causa da infertilidade masculina.

CNVs com significado clínico incerto – não descritas ou descritas como raras no DGV, com frequência menor que um por cento e que apresentam genes.

5.6.3 Análise de Regiões Específicas

Para validar os resultados obtidos pela técnica de MLPA, de duplicação ou deleção na região do cromossomo Y, foi realizado uma análise utilizando a ferramenta Cytoregions do programa ChAS. Esta ferramenta permite a busca de regiões ou genes de interesse devidamente selecionados para compor determinada Cytoregion.

Para compor a Cytoregion utilizou-se os genes que fazem parte do kit de MLPA P360 (Tabela 2). Para esta Análise foi criada uma Cytoregion composta por 43 regiões do cromossomo Y e duas regiões do cromossomo 12. Após a busca dos genes por meio da Cytoregions no programa ChAS, os dados gerados foram exportados para planilha Microsoft Excel.

5.7 Análise da Expressão de Microrna

– Microarranjos de microRNAs

O perfil transcricional de miRNAs nos indivíduos estudados foi avaliado por meio da tecnologia de microarranjos da plataforma Affymetrix. Foram utilizados os chips modelo GeneChip® miRNA 4.0, os quais são projetado para interrogar todas sequências maduras de miRNAs da versão 2.0 do banco de dados miRBase, correspondendo a 2578 sequências maduras de miRNAs de humanos. Para a marcação do RNA total de cada amostra utilizamos o kit FlashTag™ Biotin HSR Labeling Kit, seguindo as instruções do fabricante. As condições bioquímicas do processo de marcação do RNA total estão esquematizadas na Figura 11.

Figura 9: Visão geral do processo de marcação do RNA com biotina. O processo começa com uma breve inserção de uma cauda poliA na extremidade 3' dos RNAs seguido por ligação da molécula sinal biotilada na amostra de RNA alvo.

Após o processo de marcação, seguiu-se a orientação do fabricante para realizarmos o controle de qualidade da marcação através do ensaio The Enzyme Linked Oligosorbent Assay (ELOSA). Especificamente, o ELOSA é projetado para detectar o RNA de Spike Controle Oligos incluído em todos os FlashTag Biotina HSR Labeling Kit, o que nos forneceu a confirmação de que o FlashTag Biotina HSR Labeling Kit realizou apropriadamente o processo de marcação por biotina.

De posse dos resultados do ensaio de controle de qualidade, seguimos as orientações do fabricante para prepararmos as amostras de RNA marcadas para o processo de hibridação nos chips de microarranjos utilizando-se o coquetel de hibridação do kit GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit. Nesta etapa também são adicionados às amostras controles de hibridação contidos no kit GeneChip® Eukaryotic Hybridization Control Kit. Após este preparo cada amostra foi injetada em um chip de microarranjo e os mesmos incubados a 48°C em uma rotação de 60rpm por 18 horas no forno de hibridação Affymetrix® Hybridization Oven 645.

Após o tempo de hibridação os microarranjos foram lavados com os reagentes do GeneChip® Hybridization, Wash and Stain Kit seguindo as orientações do fabricante e em seguida as imagens dos arrays foram capturadas no equipamento GeneChip® Scanner 3000 7G e então digitalizadas e processadas pelo programa Affymetrix® GeneChip® Command

Console® (AGCC) software seguindo os parâmetros padrões para microarranjos de miRNAs (miRNA Array library file package), gerando assim os arquivos CEL para cada chip de microarranjo que são utilizados nas análises estatísticas. Cada arquivo CEL armazena os resultados dos cálculos de intensidade em relação aos valores de pixel do arquivo DAT. Este inclui um valor de intensidade, o desvio padrão da intensidade, o número de pixels usado para calcular o valor de intensidade, uma flag para indicar um outlier, caso calculado pelo algoritmo e flags definidas pelo usuário indicando que o recurso deve ser excluído da futura análise.

5.7.1 Análise dos Dados de Microarranjos

– Quantificação, Correção do Background, Normalização e Controle de Qualidade

As imagens de cada chip de microarranjo foram digitalizadas e processadas pelo programa Affymetrix® GeneChip® Command Console® (AGCC) software seguindo os parâmetros padrões para microarranjos de miRNAs (miRNA Array library file package), gerando assim os arquivos CEL para cada chip de microarranjo que são utilizados nas análises estatísticas. Cada arquivo CEL armazena os resultados dos cálculos de intensidade em relação aos valores de pixel do arquivo DAT. Este inclui um valor de intensidade, o desvio padrão da intensidade, o número de pixels usado para calcular o valor de intensidade, uma flag para indicar um outlier, caso calculado pelo algoritmo e flags definidas pelo usuário indicando que o recurso deve ser excluído da futura análise

Os arquivos CEL foram então importados no programa Affymetrix® Expression Console™ Software para a etapa de processamento dos dados, que consiste na sumarização de dados, filtragem, normalização e correção do background pelo algoritmo RMA + DABG e controle da qualidade dos dados pré e pós processados. No final do processamento dos dados é gerado e exportado um arquivo CHP para cada uma das amostras de microarranjo.

– Análise Estatística dos Dados Normalizados

Os arquivos CHP foram importados no programa Affymetrix® Transcriptome Analysis Console (TAC) Software para análise estatísticas dos miRNAs diferencialmente expressos entre as condições a) Pacientes com Parada de Maturação de células germinativas comparados com o grupo Controle (PA_vs_Ctrl); b) Pacientes com Síndrome das células de

Sertoli Only comparados com o grupo controle (SCOS_vs_Ctrl); c) Pacientes com Síndrome das células de Sertoli Only comparados com Pacientes com Parada de Maturação de células germinativas (SCOS_vs_MA).

O algoritmo One-Way Between-Subject ANOVA unpaired foi utilizado para a análise estatística de expressão gênica diferencial. O método de Benjamini-Hochberg foi aplicado para a correção para testes múltiplos. Neste trabalho, foram considerados miRNAs diferencialmente expressos aqueles cujo valor de p foi $< 0,01$ com correção por FDR (Benjamini Hochberg) e um foldchange $\leq -1,5$ ou $\geq 1,5$. Os miRNAs significativamente diferencialmente expressos obtidos foram submetidos ao agrupamento hierárquico e o heatmap foi construído para avaliar o padrão de expressão dos genes diferencialmente expressos. A distância Euclidiana e o método complete linkage foram utilizados para calcular o agrupamento das amostras e genes.

5.7.2 Predição de microRNAs Alvos, Anotação Funcional dos microRNAs Diferencialmente Expressos

Para investigar suas funções, os microRNAs diferencialmente expressos que apresentaram os maiores fold changes foram submetidos à ferramenta miRWalk2.0 (Dweep et al. 2015) para a obtenção de uma lista de mRNA alvos. A lista dos miRNAs hiperexpressos foi submetida separadamente da lista dos miRNAs hipoexpressos. Optamos por fazer a busca de alvos interrogando apenas o módulo de alvos validados, o qual documenta interações miRNA-mRNA validadas experimentalmente. Este módulo documenta interações validadas em 3.081 miRNAs e reporta mais de 151.666.930 relações associadas a 19.395 genes, proporcionando uma busca completa por alvos.

Em seguida, para interpretar o significado biológico dessas interações preditas, e portanto a classificação funcional dos miRNAs, as listas dos alvos preditos foram submetidas separadamente à ferramenta de anotação funcional DAVID (do inglês Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery – <http://david.abcc.ncifcrf.gov/>) (Huang et al. 2009b; Huang et al. 2009a) versão 6.8. Os termos relacionados à Processos Biológicos do Gene Ontology foram utilizados na presente análise, sendo que os redundantes foram removidos manualmente. Os processos biológicos contendo pelo menos cinco genes e que apresentaram escore EASE, com correção de Benjamini-Hochberg $< 0,05$ foram considerados significativos.

Além da anotação funcional através dos mRNAs alvos, fizemos também uma busca por miRNAs associados à patogenias no aparelho reprodutor masculino (Azoospermia, Oligospermia, Neoplasias Testiculares e Neoplasias de Próstata) no banco de dados HMDD v2.0 (the Human microRNA Disease Database), o qual é um banco curado e experimentalmente suportado de miRNA associados à doenças humanas (Lu et al, 2008; Li et al, 2013). A lista de miRNAs obtida foi então cruzada com a lista dos miRNAs diferencialmente expressos nas condições estudadas, para verificarmos a presença de miRNAs associados às patologias do aparelho reprodutor masculino.

Resultados

6. Resultados

6.1 Análise dos Dados de MLPA

Antes de fazer a triagem dos 9 pacientes pelo método de MLPA foi necessário fazer a padronização da técnica. Como a técnica de MLPA se baseia na análise de mudanças relativas à amplificação das sondas, é inviável estimar as alterações com relação ao número de cópias de uma amostra, sem os dados de uma reação referência para comparação. De um modo geral, reações do tipo referência correspondem a amostras de DNA obtidas de indivíduos normais (controles sem alteração – homens férteis, controle interno do laboratório), sendo recomendada a utilização de três a cinco controles sem alteração por ensaio de MLPA, a fim de estimar a reprodutibilidade de cada sonda dentro do experimento.

Dessa forma, para a validação do kit P360 foram incluídos três controles sem alterações junto das 14 amostras testes (como já descrito na página 58). O fabricante do kit de MLPA recomenda o uso de amostras de controles sem alteração derivadas do mesmo tipo de tecido (nesse caso sangue periférico) e extraídas a partir de um mesmo método, a fim de minimizar diferenças e variações não biológicas.

Com a análise dos resultados das três reações referências observou-se que a amplificação das sondas estava dentro da faixa de normalidade, condizente com o esperado para esses indivíduos (Figuras 12). A análise dos resultados dos 14 pacientes utilizados na padronização da técnica de MLPA também revelou um padrão de amplificação das sondas dentro da faixa da normalidade. Estes pacientes não apresentaram nenhuma alteração cromossômica.

A partir dos resultados obtidos com a padronização da técnica de MLPA, e com a demonstração de que a mesma reúne condições de ser aplicada adequadamente, foi realizada a triagem dos nove pacientes deste estudo.

Dos nove pacientes analisados (três pacientes grupo um, três pacientes do grupo 2 e três pacientes do grupo 3), cinco pacientes apresentaram padrão de amplificação das sondas dentro da faixa da normalidade e quatro pacientes apresentaram padrão de amplificação alterado. As alterações encontradas foram microduplicações e microdeleções.

Figura 10: Padrão de amplificação das sondas dentro da faixa da normalidade.

Os Pacientes um, dois, três (amostras controles) (Figura 13), seis e oito apresentaram padrão de amplificação das sondas dentro da faixa da normalidade. O coeficiente de dosagem médio das sondas foi um.

Figura 11: Padrão de amplificação das sondas dentro da faixa da normalidade. (A) paciente controle 1, (B) paciente controle 2, (C) paciente controle 3

Os pacientes quatro e sete apresentaram padrão de amplificação alterado das sondas DPY19L2, condizente com microduplicação (Figura 14). Os coeficientes de dosagem destas sondas estão listados na tabela 4.

Figura 12: Padrão de amplificação alterado das sondas. O gráfico mostra alterações no padrão de amplificação das sondas DPY19L2(307nt) e DPY19L2(380nt). (A) paciente quatro e (B) paciente sete.

6.2.1 Qualidade dos Experimentos de Cytoscan HD™

Com a ajuda do programa GCOS (Affymetrix®) a imagem de leitura do escaneamento dos chips foram visualmente inspecionados. Em seguida foram checados os padrões de qualidade do experimento para posterior análise dos dados no programa ChAS (Affymetrix®).

Os três parâmetros de qualidade: SNPQC, MAPD e WavineesSD, estimados pelo programa ChAS (Tabela 5) indicaram que dois chips correspondentes aos pacientes dois e nove mostraram valores abaixo do limiar em relação ao SNPQC (≥ 14) e WavinessSD ($\leq 0,12$).

Entretanto, esses não foram desconsiderados por apresentarem-se dentro dos padrões para os outros parâmetros adequados na apresentação gráfica pelo ChAS. Dessa forma, oito chips foram processados na análise de CNVs.

Tabela 5: Parâmetros de qualidade dos experimentos de aGH

Paciente	SNPQC ≥ 14	MAPD $\leq 0,25$	WavinessSD $\leq 0,12$	Situação
1	15,78	0,20	0,11	Processado
2	14,93	0,23	0,13*	Processado
3	18,20	0,21	0,11	Processado
4	16,79	0,24	0,12	Processado
5	18,87	0,19	0,09	Processado
6	18,24	0,18	0,12	Processado
7	17,35	0,18	0,07	Processado
9	10,03*	0,20	0,12	Processado

(*)Valores abaixo do limiar para o determinado parâmetro.

6.2.2 Análise das CNVs

– Distribuição das CNVs

A análise de CNVs pelo programa ChAS, utilizando o filtro de 1kb, identificou um total de 412 CNVs (Tabela 6). Sendo 131 do tipo deleção e 281 do tipo duplicação a média de CNVs por pacientes foi de 51,5. Como o padrão de qualidade de dois chips não estava totalmente de acordo com o recomendado pela Affymetrix® e com base na literatura que encontraram CNVs $\geq 100\text{kb}$ com significado biológico decidiu-se utilizar um filtro de 100kb para as análises das CNVs para que a chances de encontrar falsos-positivos diminuíssem.

Tabela 6: Distribuição de CNVs nos pacientes utilizando filtro de 1KB

Paciente	Total de CNVs	Deleções			Duplicações	
		CN=0	CN=1	CN=2	CN=3	CN=4
1	38	3	7	2	26	0
2	64	4	14	8	37	1
3	27	2	15	3	7	0
4	41	11	17	3	8	2
5	28	4	15	5	3	1
6	72	1	9	12	50	0
7	15	0	10	1	4	0
9	127	3	16	38	70	0
Total	412	28	103	72	205	4

CN = Copy Number state; número de cópias do segmento genômico deletado ou duplicado

Utilizando o filtro de 100 kb, para a análise das CNVs, o programa ChAS identificou um total de 94 CNVs, a média de CNVs por pacientes correspondeu a 11,75. Vinte CNVs foram do tipo deleção e 74 do tipo duplicação (Tabela 7). Os pacientes seis e nove foram os que apresentaram o maior número de CNVs, total de 20 cada.

Tabela 7: Distribuição de CNVs nos pacientes utilizando filtro de 100kb

Paciente	Total de CNVs	Deleções		Duplicações		
		CN=0	CN=1	CN=2	CN=3	CN=4
1	9	0	1	1	7	0
2	11	0	1	0	9	1
3	7	1	1	1	4	0
4	12	1	5	0	6	0
5	9	0	2	5	2	0
6	20	1	1	0	18	0
7	6	0	3	0	3	0
9	20	2	1	0	17	0
Total	94	5	15	7	66	1

CN = Copy Number state; número de cópias do segmento genômico deletado ou duplicado.

As 94 CNVs identificadas na análise (Tabela 8), distribuíram-se por quase todos os cromossomos, exceto nos cromossomos 2, 5 e 21. Os cromossomos 1, 8, 14, 16, 19, 22, X e Y apresentaram CNVs do tipo duplicação e deleção. Os demais cromossomos apresentaram CNVs do tipo duplicação ou deleção. O cromossomo que apresentou o maior número de CNVs foi o cromossomo 16 (11%), com dez CNVs do tipo duplicação (Gráfico 1).

Gráfico 1: Distribuição e tipo de CNVs encontradas por cromossomo.

– Tamanho das CNVs Identificadas

As CNVs identificadas na amostra apresentaram tamanhos variados. A maioria delas enquadrou-se na faixa de tamanho entre 100 a 200 kb (53%) (Gráfico 2). Todos os pacientes apresentaram CNVs entre 100 a 300 kb (Tabela 8). Em relação às grandes CNVs (> 450 kb), a maioria dos pacientes apresentou pelo menos uma CNV dessa especificação (Tabela 8).

Gráfico 2: Gráfico mostrando a distribuição de tamanhos das CNVs nas amostras de estudo.

Tabela 8: CNVs identificada na análise utilizando filtro de 1Kb. A tabela mostra a localização Genômica, o tamanho, os genes que estão presentes e a frequência destas CNVs no banco de dados do DGV.

CNVs	Paciente	Localização Genômica	Início	Fim	Tipo	CN	Tamanho (Kb)	Número de marcadores	Gene	OMIM	DGV
1	1	1q44	248688586	248794396	Deleção	1.0	106	56	OR2T29, OR2T34, OR2T10, OR2T11		25
2	1	8q22.3	104370101	104491166	Duplicação	3.0	121	95	CTHRC1, SLC25A32, DCAF13	CTHRC1 (610635), SLC25A32 (610815)	0
3	1	9q34.3	139840430	139981301	Duplicação	3.0	141	92	C8G, LCN12, PTGDS, LCNL1, C9orf142, CLIC3, ABCA2, C9orf139, FUT7, NPDC1, ENTPD2, SAPCD2, UAP1L1, MAN1B1-AS1	C8G (120930), LCN12 (612905), PTGDS (176803), CLIC3 (606533), ABCA2 (600047), FUT7 (602030), NPDC1 (605798), ENTPD2 (602012), SAPCD2 (612057)	<1
4	1	14q32.33	106227153	106693670	Duplicação	3.0	467	166	KIAA0125, ADAM6		85
5	1	16p13.3	1054129	1235390	Duplicação	3.0	181	77	SSTR5-AS1, SSTR5, C1QTNF8, CACNA1H	SSTR5 (182455), C1QTNF8 (614147), CACNA1H (607904)	1
6	1	16q24.3	88801603	88966513	Duplicação	3.0	165	96	PIEZO1, CDT1, APRT, GALNS, TRAPPC2L, PABPN1L, CBFA2T3	PIEZO1 (611184), CDT1 (605525), APRT (102600), GALNS (612222), TRAPPC2L (610970), CBFA2T3 (603870)	<1
7	1	17q21.31	44212823	44784639	Duplicação	3.0	572	72	KANSL1, KANSL1-AS1, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, NSF	KANSL1 (612452), NSF (601633)	45
8	1	22q11.22	23065697	23258369	Duplicação	3.0	193	92	MIR650, IGLL5		37
9	1	Xq11.1	61882086	62152176	Duplicação	2.0	270	244			<1
10	2	1p36.32	2847362	2971543	Duplicação	3.0	124	100	ACTRT2	ACTRT2 (608535)	<1
11	2	8p11.22	39247097	39386952	Deleção	1.0	140	76	ADAM5, ADAM3A		45
12	2	8q24.3	143473913	143634092	Duplicação	3.0	160	96	TSNARE1, BAI1	BAI1 (602682)	<1

CNVs	Paciente	Localização Genômica	Início	Fim	Tipo	CN	Tamanho (Kb)	Número de marcadores	Gene	OMIM	DGV
13	2	10q11.22	46256559	47688677	Duplicação	3.0	1432	256	FAM21C, AGAP4, PTPN20B, PTPN20A, BMS1P1, BMS1P5, GLUD1P7, FAM35BP, SYT15, GPRIN2, NPY4R, LINC00842, HNRNPA1P33, ANXA8, ANXA8L1, FAM25B, FAM25G, FAM25C, AGAP9, BMS1P6, BMS1P2, FAM35DP	FAM21C (613631), SYT15 (608081), GPRIN2 (611240), NPY4R (601790)	10
14	2	10q26.3	135252178	135377265	Duplicação	4.0	125	234	LOC619207, CYP2E1, SYCE1	CYP2E1 (124040), SYCE1 (611486)	5
15	2	11p11.12	50472472	51228126	Duplicação	3.0	756	56			<1
16	2	14q32.33	106079822	106705896	Duplicação	3.0	626	188	ELK2AP, KIAA0125, ADAM6		85
17	2	16q24.1	85276939	85433369	Duplicação	3.0	156	84	LINC00311, MIR5093		1
18	2	16q24.2	88321435	88490469	Duplicação	3.0	169	76			<1
19	2	20q13.33	61054949	61313747	Duplicação	3.0	259	102	C20orf166-AS1, C20orf166, MIR1-1, MIR133A2, SLCO4A1, LOC100127888	MIR1-1 (609326), MIR133A2 (610255), SLCO4A1 (612436)	<1
20	2	22q11.22	22962196	23262943	Duplicação	3.0	301	120	POM121L1P, GGTLC2, MIR650, IGLL5	GGTLC2 (612339)	6
21	3	8p11.22	39247097	39362916	Duplicação	3.0	116	64	ADAM5, ADAM3A		45
22	3	14q32.33	106079822	106706124	Duplicação	3.0	626	190	ELK2AP, KIAA0125, ADAM6		85
23	3	16p11.2	34466474	34755816	Duplicação	3.0	289	174	LOC283914, LOC146481, LOC100130700		16
24	3	18p11.32	1725757	1841469	Deleção	1.0	116	92			1
25	3	22q11.22 - 12	23124497	23258369	Duplicação	3.0	134	84	MIR650, IGLL5		37
26	3	Xq11.2	64581293	64682519	Deleção	0.0	101	34			0
27	3	Yq11.23	27007124	27224389	Duplicação	2.0	217	68	DAZ3, DAZ4, DAZ2, BPY2C, BPY2, BPY2B, TTTY4, TTTY4B, TTTY4C	DAZ3 (400027), DAZ2 (400026)	1
28	4	1q44	248660538	248794396	Deleção	1.0	134	72	OR2G6, OR2T29, OR2T34, OR2T10, OR2T11		28
29	4	4q13.2	69435888	69551731	Deleção	1.0	116	60	UGT2B15	UGT2B15 (600069)	20
30	4	6q14.1	81201696	82056094	Duplicação	3.0	854	604			0

CNVs	Paciente	Localização Genômica	Início	Fim	Tipo	CN	Tamanho (Kb)	Número de marcadores	Gene	OMIM	DGV
31	4	12p13.31	7971020	8134669	Duplicação	3.0	164	109	SLC2A14, SLC2A3	SLC2A14 (611039), SLC2A3 (138170)	3
32	4	12p11.21	31232956	31407111	Duplicação	3.0	174	92	DDX11	DDX11 (601150)	7
33	4	14q11.2	22632669	22938398	Deleção	1.0	306	483			35
34	4	14q32.33	106232259	106918044	Duplicação	3.0	686	255	KIAA0125, ADAM6, LINC00226		85
35	4	15q11.2	24471579	24791948	Duplicação	3.0	320	69			1
36	4	19p12	20598429	20720705	Deleção	1.0	122	84	ZNF826P		12
37	4	22q11.22	23063020	23258369	Duplicação	3.0	195	96	MIR650, IGLL5		37
38	4	22q11.23	25656237	25927657	Deleção	1.0	271	79	IGLL3P, LRP5L, CRYBB2P1		2
39	4	Yp11.2	9168143	9398468	Duplicação	2.0	230	1136	TTY20, FAM197Y5, FAM197Y2, TSPY8, TSPY4, TSPY3, TSPY1	TSPY1 (480100)	<1
40	5	8p11.22	39230311	39384337	Deleção	1.0	154	74	ADAM5, ADAM3A		45
41	5	13q31.3	90560650	91255304	Deleção	1.0	695	524	LINC00559, MIR622		0
42	5	14q32.33	106072250	106750867	Duplicação	3.0	679	224	ELK2AP, KIAA0125, ADAM6, LINC00226		85
43	5	17q21.31	44187491	44785669	Duplicação	3.0	598	112	KANSL1, KANSL1-AS1, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, NSF	KANSL1 (612452), NSF (601633)	45
44	5	Yq11.223	24651462	25404172	Duplicação	2.0	753	112	PRY2, PRY, TTTY17B, TTTY17C, TTTY17A, TTTY4B, TTTY4C, TTTY4, BPY2B, BPY2C, BPY2, DAZ1, DAZ4, DAZ3, DAZ2	TTY17A (400040), TTTY4 (400037), DAZ1 (400003)	<1
45	5	Yq11.223	25848006	26365325	Duplicação	2.0	517	320	TTY3B, TTTY3, CDY1B, CDY1, CSPG4P1Y, GOLGA2P3Y, GOLGA2P2Y	CDY1 (400016), CSPG4P1Y (400034), GOLGA2P2Y (400035)	1
46	5	Yq11.23	26489983	27022375	Duplicação	2.0	532	92	TTY17A, TTTY17C, TTTY17B, TTTY4, TTTY4B, TTTY4C, BPY2B, BPY2C, BPY2, DAZ4, DAZ3, DAZ2	BPY2 (400013), DAZ3 (400027), DAZ2 (400026)	1
47	5	Yq11.23	27227609	27496305	Duplicação	2.0	269	76	TTY4, TTTY4B, TTTY4C, TTTY17A, TTTY17B, TTTY17C		1
48	5	Yq11.23	27674551	28178527	Duplicação	2.0	504	296	CDY1, CDY1B, TTTY3B, TTTY3	TTY3 (400036)	1
49	6	1p36.11	25910815	26106232	Duplicação	3.0	195	228	MAN1C1		0
50	6	1q21.1	143959587	144395356	Duplicação	3.0	436	123	LOC100288142, LINC00623, LOC728875, PPIAL4C, PPIAL4B, PPIAL4A		1

CNVs	Paciente	Localização Genômica	Início	Fim	Tipo	CN	Tamanho (Kb)	Número de marcadores	Gene	OMIM	DGV
51	6	1q21.2	147844757	148870387	Duplicação	3.0	1026	153	NBPF8, FLJ39739, PPIAL4B, PPIAL4A, PPIAL4F, PPIAL4D, NBPF14, NBPF9, NBPF15, NBPF16, PPIAL4E	NBPF8 (613998), NBPF14 (614003), NBPF15 (610414), NBPF16 (614005), PPIAL4E (608608)	<1
52	6	1q44	248688586	248828223	Deleção	1.0	140	62	OR2T29, OR2T34, OR2T10, OR2T11, OR2T35, OR2T27		30
53	6	6q15	88373627	88544628	Duplicação	3.0	171	144	ORC3, AKIRIN2	ORC3 (604972), AKIRIN2 (615165)	0
54	6	7p12.1	52273353	52420196	Duplicação	3.0	147	96			0
55	6	7q11.22	68129503	68286200	Duplicação	3.0	157	116			0
56	6	8p11.22	39247097	39386952	Deleção	0.0	140	76	ADAM5, ADAM3A		45
57	6	9q31.2	110100862	110222409	Duplicação	3.0	122	104			0
58	6	12p13.31	7975693	8135534	Duplicação	3.0	160	104	SLC2A14, SLC2A3	SLC2A14 (611039), SLC2A3 (138170)	3
59	6	14q32.33	106263718	106525210	Duplicação	3.0	261	114	KIAA0125, ADAM6		85
60	6	16p13.3	549826	650871	Duplicação	3.0	101	56	RAB11FIP3, LINC00235, SOLH, MIR5587, MIR3176, C16orf11, NHLRC4, PIGQ, RAB40C	RAB11FIP3 (608738), CAPN15 (603267), PIGQ (605754)	<1
61	6	16p13.3	1066510	1368293	Duplicação	3.0	302	143	SSTR5-AS1, SSTR5, C1QTNF8, CACNA1H, TPSG1, TPSB2, TPSAB1, TPSD1, UBE2I	SSTR5 (182455), C1QTNF8 (614147), CACNA1H (607904), TPSG1 (609341), TPSB2 (191081), TPSAB1 (191080), TPSD1 (609272), UBE2I (601661)	1
62	6	17q25.3	80219054	80534622	Duplicação	3.0	316	260	CSNK1D, CD7, SECTM1, TEX19, UTS2R, OGFOD3, HEXDC, C17orf62, NARF, FOXK2	CSNK1D (600864), CD7 (186820), SECTM1 (602602), UTS2R (600896), NARF (605349), FOXK2 (147685)	0
63	6	19p13.3	414714	548433	Duplicação	3.0	134	64	SHC2, ODF3L2, MADCAM1, TPGS1, CDC34, GZMM	SHC2 (605217), MADCAM1 (102670), CDC34 (116948), GZMM (600311)	<1
64	6	20q13.2	52195024	52312883	Duplicação	3.0	118	64	ZNF217	ZNF217 (602967)	<1
65	6	20q13.33	61033169	61296428	Duplicação	3.0	263	89	GATA5, C20orf166-AS1, C20orf166, MIR1-1, MIR133A2, SLCO4A1, LOC100127888	GATA5 (611496), MIR1-1 (609326), MIR133A2 (610255), SLCO4A1 (612436)	<1
66	6	Xp22.33	387711	491934	Duplicação	3.0	104	70			2

CNVs	Paciente	Localização Genômica	Início	Fim	Tipo	CN	Tamanho (Kb)	Número de marcadores	Gene	OMIM	DGV
67	6	Xp22.33	528480	839488	Duplicação	3.0	311	636	SHOX	SHOX (312865), SHOX (400020)	0
68	6	Xp22.33	2054897	2270566	Duplicação	3.0	216	106	DHRX		<1
69	7	8p11.22	39247097	39386952	Deleção	1.0	140	76	ADAM5, ADAM3A		45
70	7	13q22.1	74455103	74596276	Deleção	1.0	141	168	KLF12	KLF12 (607531)	<1
71	7	14q32.33	106270855	106530460	Duplicação	3.0	260	112	KIAA0125, ADAM6		85
72	7	16p11.2	34471297	34765444	Duplicação	3.0	294	174	LOC283914, LOC146481, LOC100130700		16
73	7	17q12	34426244	34836983	Duplicação	3.0	411	79	CCL4, TBC1D3B, CCL3L3, CCL3L1, CCL4L1, CCL4L2, TBC1D3C, TBC1D3H, TBC1D3G	CCL4 (182284), TBC1D3B (610144), CCL3L3 (609468), CCL3L1 (601395), CCL4L1 (603782), CCL4L2 (610757), TBC1D3C (610806), TBC1D3H (610811), TBC1D3G (610810)	15
74	7	17q12	36283806	36404555	Deleção	1.0	121	30	TBC1D3F, TBC1D3, LOC440434	TBC1D3F (610809), TBC1D3 (607741)	8
75	9	3q26.1	162521296	162651027	Deleção	1.0	130	28			1
76	9	7q11.21	66864015	66972616	Duplicação	3.0	109	72			0
77	9	7q11.22	68181034	68444073	Duplicação	3.0	263	192			0
78	9	7q22.1	98075974	98206436	Duplicação	3.0	130	81			0
79	9	9q31.2	110100251	110222409	Duplicação	3.0	122	106			0
80	9	9q34.3	139308341	139435356	Duplicação	3.0	127	176	PMPKA, INPP5E, SEC16A, C9orf163, NOTCH1, MIR4673	PMPKA (613036), INPP5E (613037), SEC16A (612854), NOTCH1 (190198)	0
81	9	9q34.3	139776707	139951735	Duplicação	3.0	175	105	TRAF2, MIR4479, FBXW5, C8G, LCN12, PTGDS, LCNL1, C9orf142, CLIC3, ABCA2, C9orf139, FUT7, NPDC1, ENTPD2	TRAF2 (601895), FBXW5 (609072), C8G (120930), LCN12 (612905), PTGDS (176803), CLIC3 (606533), ABCA2 (600047), FUT7 (602030), NPDC1 (605798), 82ENTPD2 (602012)	< 1
82	9	10p12.33	17889807	18196756	Duplicação	3.0	307	50	MRC1, TMEM236, MIR511-2, MIR511-1	MRC1 (153618)	0
83	9	12q24.21	115093970	115265688	Duplicação	3.0	172	232	TBX3	TBX3 (601621)	0

CNVs	Paciente	Localização Genômica	Início	Fim	Tipo	CN	Tamanho (Kb)	Número de marcadores	Gene	OMIM	DGV
84	9	16p13.3	1081441	1235390	Duplicação	3.0	154	66	SSTR5-AS1, SSTR5, C1QTNF8, CACNA1H	SSTR5 (182455), C1QTNF8 (614147), CACNA1H (607904)	1
85	9	16p11.2	34471297	34739571	Duplicação	3.0	268	164	LOC283914, LOC146481, LOC100130700		16
86	9	19p13.3	415092	548433	Duplicação	3.0	133	60	SHC2, ODF3L2, MADCAM1, TPGS1, CDC34, GZMM	SHC2 (605217), MADCAM1 (102670), CDC34 (116948), GZMM (600311)	< 1
87	9	19p13.2	7119374	7222832	Duplicação	3.0	103	164	INSR	INSR (147670)	< 1
88	9	20q13.2	52199043	52346358	Duplicação	3.0	147	76	ZNF217	ZNF217 (602967)	< 1
89	9	20q13.33	61054949	61299818	Duplicação	3.0	245	83	C20orf166-AS1, C20orf166, MIR1-1, MIR133A2, SLCO4A1, LOC100127888	MIR1-1 (609326), MIR133A2 (610255), SLCO4A1 (612436)	< 1
90	9	22q11.23	25656237	25922334	Duplicação	3.0	266	72	IGLL3P, LRP5L, CRYBB2P1		4
91	9	Xp22.33	566009	839486	Duplicação	3.0	273	455	SHOX	SHOX (312865), SHOX (400020)	< 1
92	9	Xp22.33	2128347	2270566	Duplicação	3.0	142	76	DHRX		< 1
93	9	Yq11.223-11.23	24644460	25515984	Deleção	0.0	872	145	PRY2, PRY, TTTY17B, TTTY17C, TTTY17A, TTTY4B, TTTY4C, TTTY4, BPY2B, BPY2C, BPY2, DAZ1, DAZ4, DAZ3, DAZ2	TTY17A (400040), TTTY4 (400037), DAZ1 (400003)	< 1
94	9	Yq11.223-11.23	25570468	28382367	Deleção	0.0	2812	1708	TTY3B, TTTY3, CDY1B, CDY1, CSPG4P1Y, GOLGA2P3Y, GOLGA2P2Y, TTTY17A, TTTY17C, TTTY17B, TTTY4, TTTY4B, TTTY4C, BPY2B, BPY2C, BPY2, DAZ4, DAZ3, DAZ2	CDY1 (400016), CSPG4P1Y (400034), GOLGA2P2Y (400035), BPY2 (400013), DAZ3 (400027), DAZ2 (400026), TTTY3 (400036)	< 1

– Padrão de Recorrência das CNVs

Considerando a amostra total de 94 CNVs identificadas na análise, 41 CNVs (44%) foram detectadas em apenas um dos pacientes (tabela 9). De todos os cromossomos que apresentaram CNVs, apenas os cromossomos 20 e 22 não apresentaram CNVs de recorrência única (Gráfico 3). O cromossomo 16 foi o que apresentou o maior número de CNVs de recorrência única (Tabela 9) (Gráfico 3).

Tabela 9: Distribuição das CNVs de recorrência única e CNVRs por cromossomos

Cromossomo	Total de CNVs	CNVs únicas	CNVs incluídas nas CNVRs
1	7	4	3
2	0	0	0
3	1	1	0
4	1	1	0
5	0	0	0
6	2	2	0
7	5	3	2
8	7	2	5
9	5	3	5
10	3	3	0
11	1	1	0
12	4	2	2
13	2	2	0
14	8	1	7
15	1	1	0
16	10	5	5
17	5	3	2
18	1	1	0
19	4	2	2
20	5	0	5
21	0	0	0
22	6	0	6
X	7	3	4
Y	9	1	8
Total	94	41	53

Gráfico 3: Distribuição das CNVs, CNVs únicas e CNVRs nos cromossomos

Através da análise de sobreposição das CNVs, foram encontradas 53 CNVs (56%) compartilhadas entre dois ou mais indivíduos (tabela 9). Tais CNVs foram distribuídas em 19 CNVRs (Tabela 10).

As CNVs foram avaliadas quanto a descrição no banco de dados de variantes estruturais do genoma, o DGV. Das 53 CNVs compartilhadas, entre dois ou mais indivíduos, que compuseram as 19 CNVRs, nove CNVRs (47%) apresentaram CNVs descritas no DGV, quatro CNVRs (21%) apresentaram CNVs não descritas no DGV e seis CNVRs (32%) apresentaram CNVs descritas como raras no DGV (Tabela 10).

Tabela 10: 19 CNVRs encontradas na análise de sobreposição das 94 CNVs.

CNVRs	Localização Genômica	Início	Fim	Tamanho (kb)	CNVs incluídas nas CNVRs	Genes	DGV	Paciente	Número de Pacientes
1	1q44	248660538	248828223	168	3 del	OR2G6, OR2T29, OR2T34, OR2T10, OR2T11, OR2T35, OR2T27	sim	1, 4, 6	3
2	7q11.22	68129503	68444073	315	2 dup		não	6,9	2
3	8p11.22	39230311	39386952	157	4 del/1 dup	ADAM5, ADAM3A	sim	2, 3, 5, 6, 7	5
4	9q34.3	139308341	139981301	673	3 dup	TRAF2, MIR4479, FBXW5, C8G, LCN12, PTGDS, C9orf142, CLIC3, ABCA2, C9orf139, C9orf163, FUT7, NPDC1, ENTPD2, SAPCD2, UAP1L1, MAN1B1-AS1, PMPCA, INPP5E, SEC16A, NOTCH1, MIR4673	não	1, 9	2
5	9q31.2	110100251	110222409	122	2 dup		não	6, 9	2
6	12p13.31	7971020	8135534	165	2 dup	SLC2A14, SLC2A3	sim	4, 6	2
7	14q32.33	106072250	106918044	846	7 dup	ELK2AP, KIAA0125, ADAM6, LINC00226	sim	1, 2, 3, 4, 5, 6, 7	7
8	16p11.2	34466474	34765444	299	2 dup	LOC283914, LOC146481, LOC100130700	sim	3, 7	2
9	16p13.3	1054129	1368293	314	3 dup	SSTR5-AS1, SSTR5, C1QTNF8, CACNA1H, TPSG1, TPSB2, TPSAB1, TPSD1, UBE2I	sim	1, 6, 9	3
10	17q21.31	44187491	44785669	598	2 dup	KANSL1, KANSL1-AS1, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, NSF	sim	1, 5	2
11	19p13.3	414714	548433	134	2 dup	SHC2, ODF3L2, MADCAM1, TPGS1, CDC34, GZMM	raro	6, 9	2
12	20q13.33	61033169	61313747	281	3 dup	GATA5, C20orf166-AS1, C20orf166, MIR1-1, MIR133A2, SLCO4A1, LOC100127888	raro	2, 6, 9	3
13	20q13.2	52195024	52346358	151	2 dup	ZNF218	raro	6, 9	2

CNVRs	Localização Genômica	Início	Fim	Tamanho (kb)	CNVs incluídas nas CNVRs	Genes	DGV	Paciente	Número de Pacientes
4	22q11.23	25656237	25927657	271	1 del/ 1 dup	IGLL3P, LRP5L, CRYBB2P1	sim	4, 9	2
5	22q11.22	22962196	23262943	301	4 dup	POM121L1P, GGTL2, MIR650, IGLL5	sim	1, 2, 3, 4	4
6	Xp22.33	528480	2270566	1742	4 dup	SHOX, DHRSX	raro	6, 9	2
7	Yq11.223	24644460	25515984	872	1 del/ 1 dup	PRY2, PRY, TTTY17B, TTTY17C, TTTY17A, TTTY4B, TTTY4C, TTTY4, BPY2B, BPY2C, BPY2, DAZ1, DAZ4, DAZ3, DAZ2	não	5,9	2
18	Yq11.223-11.23	25570468	28382367	2812	1 del/ 1 dup	TTTY3B, TTTY3, CDY1B, CDY1, CSPG4P1Y, GOLGA2P3Y, GOLGA2P2Y, TTTY17A, TTTY17C, TTTY17B, TTTY4, TTTY4B, TTTY4C, BPY2B, BPY2C, BPY2, DAZ4, DAZ3, DAZ2	raro	5,9	2
19	Yq11.23	26489983	28178527	1689	4 dup	CDY1, CDY1B, TTTY3B, TTTY3, TTTY17A, TTTY17C, TTTY17B, TTTY4, TTTY4B, TTTY4C, BPY2B, BPY2C, BPY2, DAZ4, DAZ3, DAZ2	*Sim	5,3	2

*CNVR composta por 4 CNVs do tipo duplicação, duas destas CNVs estão descritas no DGV como raras

– Distribuição das CNVs Envolvendo Genes

Do total de 94 CNVs detectadas no conjunto amostral, 77 CNVs (82%) ocorreram em regiões contendo genes ou parte deles. Dessas, 46 CNVs (60%) possuíam genes descritos no OMIM (Tabela 11). Os pacientes que apresentaram o maior número de CNVs e CNVs com genes foram respectivamente o paciente seis e o nove (Gráfico 4)

Tabela 11: CNVs que apresentaram genes ou parte deles e genes que foram encontrados no banco de dados do OMIM.

CNV	Paciente	Tipo	Tamanho (Kb)	Localização Cromossômica	Total de Genes por CNV	Total de Genes no OMIM	Freq. na população (DGV)
1	1	Deleção	106	1q44	4	0	25
2	1	Duplicação	121	8q22.3	3	2	0
3	1	Duplicação	141	9q34.3	14	9	<1
4	1	Duplicação	467	14q32.33	2	0	85
5	1	Duplicação	165	16q24.3	7	6	<1
6	1	Duplicação	181	16p13.3	4	3	1
7	1	Duplicação	572	17q21.31	8	2	45
8	1	Duplicação	193	22q11.22	2	0	37
9	2	Duplicação	124	1p36.32	1	1	<1
10	2	Duplicação	140	8p11.22	2	0	45
11	2	Duplicação	160	8q24.3	2	1	<1
12	2	Duplicação	1432	10q11.22	22	4	10
13	2	Duplicação	125	10q26.3	3	2	5
14	2	Duplicação	626	14q32.33	3	0	85
15	2	Duplicação	156	16q24.1	2	0	1
16	2	Duplicação	259	20q13.33	6	3	<1%
17	2	Duplicação	301	22q11.22	4	1	6
18	3	Duplicação	116	8p11.22	2	0	45
19	3	Duplicação	626	14q32.33	3	0	85
20	3	Duplicação	289	16p11.2	3	0	16
21	3	Duplicação	134	22q11.22	2	0	37
22	3	Duplicação	217	Yq11.23	9	2	1
23	4	Deleção	134	1q44	5	0	28
24	4	Deleção	116	4q13.2	1	1	20
25	4	Duplicação	174	12p11.21	1	1	7
26	4	Duplicação	164	12p13.31	2	2	3,2
27	4	Duplicação	686	14q32.33	3	0	85
28	4	Deleção	122	19p12	1	0	12
29	4	Deleção	271	22q11.23	3	0	2
30	4	Duplicação	195	22q11.22	2	0	37
31	4	Duplicação	230	Yp11.2	7	1	<1

CNV	Paciente	Tipo	Tamanho (Kb)	Localização Cromossômica	Total de Genes por CNV	Total de Genes no OMIM	Freq. na população (DGV)
32	5	Deleção	154	8p11.22	2	0	45
33	5	Deleção	695	13q31.3	2	0	0
34	5	Duplicação	679	14q32.33	4	0	85
35	5	Duplicação	598	17q21.31	8	2	45
36	5	Duplicação	504	Yq11.23	4	1	1
37	5	Duplicação	753	Yq11.223	15	3	<1
38	5	Duplicação	532	Yq11.23	12	3	1
39	5	Duplicação	517	Yq11.223	7	3	1
40	5	Duplicação	269	Yq11.23	6	0	1
41	6	Duplicação	436	1q21.1	6	0	1
42	6	Duplicação	195	1p36.11	1	0	0
43	6	Duplicação	1026	1q21.2	11	5	<1
44	6	Duplicação	140	1q44	6	0	30
45	6	Duplicação	171	6q15	2	2	0
46	6	Deleção	140	8p11.22	2	0	45
47	6	Duplicação	160	12p13.31	2	2	3,2
48	6	Duplicação	261	14q32.33	2	0	85
49	6	Duplicação	101	16p13.3	9	3	<1
50	6	Duplicação	302	16p13.3	9	8	1
51	6	Duplicação	316	17q25.3	10	6	0
52	6	Duplicação	134	19p13.3	6	4	<1%
53	6	Duplicação	263	20q13.33	7	4	<1
54	6	Duplicação	118	20q13.2	1	1	<1
55	6	Duplicação	216	Xp22.33	1	0	<1
56	6	Duplicação	311	Xp22.33	1	2	0
57	7	Deleção	140	8p11.22	2	0	45
58	7	Deleção	141	13q22.1	1	1	<1%
59	7	Duplicação	260	14q32.33	2	0	85
60	7	Duplicação	294	16p11.2	3	0	16
61	7	Duplicação	411	17q12	9	9	15
62	7	Deleção	121	17q12	3	2	8
63	9	Duplicação	127	9q34.3	6	4	0
64	9	Duplicação	175	9q34.3	14	10	< 1%
65	9	Duplicação	307	10p12.33	4	1	0
66	9	Duplicação	172	12q24.21	1	1	0
67	9	Duplicação	268	16p11.2	3	0	16
68	9	Duplicação	154	16p13.3	4	3	1

CNV	Paciente	Tipo	Tamanho (Kb)	Localização Cromossômica	Total de Genes por CNV	Total de Genes no OMIM	Freq. na população (DGV)
69	9	Duplicação	103	19p13.2	1	1	< 1%
70	9	Duplicação	133	19p13.3	6	4	< 1%
71	9	Duplicação	245	20q13.33	6	3	< 1%
72	9	Duplicação	147	20q13.2	1	1	< 1
73	9	Duplicação	266	22q11.23	3	0	4
74	9	Duplicação	142	Xp22.33	1	0	< 1
75	9	Duplicação	273	Xp22.33	1	2	< 1
76	9	Deleção	872	Yq11.223	15	3	< 1
77	9	Deleção	2812	Yq11.223	19	7	< 1
Total					374	142	

Tabela 12: Distribuição geral das CNVs por pacientes que apresentaram Genes descrito ou não descritos no OMIM.

Pacientes	Total de CNVs	CNVs com Genes	CNVs com Genes OMIM
1	9	8	5
2	11	9	6
3	7	5	1
4	12	9	4
5	9	9	5
6	20	16	10
7	6	6	3
9	20	15	12
Total	94	77	46

Gráfico 4: Total de CNVs por pacientes comparado com CNVs que apresentam genes

A maioria dos cromossomos apresentaram CNVs com genes. Os cromossomos que apresentaram o maior número de CNVs com genes, foram os cromossomos 16 e Y, como nove CNVs em regiões genicas. Dos 21 cromossomos que apresentaram CNVs, 11 cromossomos (52%) apresentaram genes em todas as CNVs (Gráfico 5).

Gráfico 5: Total de CNVs por cromossomo e total de CNVs por cromossomo que apresentaram genes.

Foram encontrados 374 genes em 77CNVs (Tabela 11), o cromossomo Y foi o que apresentou o maior número de genes 94 (tabela 12). Dos 374 genes encontrados nas CNVs, 142 estavam previamente descritos no OMIM (Tabela 13). Foram encontradas 46 CNVs com genes descrita no OMIM nos nove pacientes (Tabela 12).

Das 94 CNVs identificadas no conjunto amostral, foram encontradas nove CNVs com genes previamente relacionados com a infertilidade masculina (Tabela 14). Destas, oito foram recorrentes e uma foi encontrada uma única vez na amostra. Das nove CNVs, oito apresentavam CNVs com genes descritos no OMIM (Tabela 14).

Tabela 13: Total e porcentagem de CNVs encontradas por cromossomo, total e porcentagens de CNVs que apresentaram genes por cromossomo. Total e porcentagem de genes encontrados nas CNVs por cromossomo e total e porcentagens de genes encontrados nas CNVs que estão presentes no banco de dados do OMIM.

Cromossomo	Total de CNVs		Total de CNVs com Genes		Total de Genes		Total de genes descrito no OMIM	
1	7	7%	7	9%	34	9%	6	4%
2	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
3	1	1%	0	0%	0	0%	0	0%
4	1	1%	1	1%	1	0%	1	1%
5	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
6	2	2%	1	1%	2	1%	2	1%
7	5	5%	0	0%	0	0%	0	0%
8	7	7%	7	9%	15	4%	3	2%
9	5	5%	3	4%	34	9%	23	16%
10	3	3%	3	4%	29	8%	7	5%
11	1	1%	0	0%	0	0%	0	0%
12	4	4%	4	5%	6	2%	6	4%
13	2	2%	2	3%	3	1%	1	1%
14	8	9%	7	9%	19	5%	0	0%
15	1	1%	0	0%	0	0%	0	0%
16	10	11%	9	12%	44	12%	23	16%
17	5	5%	5	6%	38	10%	21	15%
18	1	1%	0	0%	0	0%	0	0%
19	4	4%	4	5%	14	4%	9	6%
20	5	5%	5	6%	21	6%	12	8%
21	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%
22	6	6%	6	8%	16	4%	1	1%
X	7	7%	4	5%	4	1%	4	3%
Y	9	10%	9	12%	94	25%	23	16%
Total	94		77		374		142	

Tabela 14: CNVs que apresentaram genes envolvidos com a infertilidade masculina

Paciente	Localização Genômica	Início	Fim	Tipo	CN	Tamanho (Kb)	Número de Marcadores	Genes	OMIM	Frequência na população Geral (DGV)
3	Yq11.23	27007124	27224389	Duplicação	2.0	217	68	DAZ3, DAZ4, DAZ2, BPY2C, BPY2, BPY2B, TTTY4, TTTY4B, TTTY4C	DAZ3 (400027), DAZ2 (400026)	1
4*	Yp11.2	9168143	9398468	Duplicação	2.0	230	1136	TTY20, FAM197Y5, FAM197Y2, TSPY8, TSPY4, TSPY3, TSPY1	TSPY1 (480100)	<1
5	Yq11.223	24651462	25404172	Duplicação	2.0	753	112	PRY2, PRY, TTTY17B, TTTY17C, TTTY17A, TTTY4B, TTTY4C, TTTY4, BPY2B, BPY2C, BPY2, DAZ1, DAZ4, DAZ3, DAZ2	TTY17A (400040), TTTY4 (400037), DAZ1 (400003)	<1
5	Yq11.23	26489983	27022375	Duplicação	2.0	532	92	TTY17A, TTTY17C, TTTY17B, TTTY4, TTTY4B, TTTY4C, BPY2B, BPY2C, BPY2, DAZ4, DAZ3, DAZ2	BPY2 (400013), DAZ3 (400027), DAZ2 (400026)	1
5	Yq11.223	25848006	26365325	Duplicação	2.0	517	320	TTY3B, TTTY3, CDY1B, CDY1, CSPG4P1Y, GOLGA2P3Y, GOLGA2P2Y	CDY1 (400016), CSPG4P1Y (400034), GOLGA2P2Y (400035)	1
5**	Yq11.23	27227609	27496305	Duplicação	2.0	269	76	TTY4, TTTY4B, TTTY4C, TTTY17A, TTTY17B, TTTY17C		1
9	Yq11.223	24644460	25515984	Deleção	0.0	872	145	PRY2, PRY, TTTY17B, TTTY17C, TTTY17A, TTTY4B, TTTY4C, TTTY4, BPY2B, BPY2C, BPY2, DAZ1, DAZ4, DAZ3, DAZ2	TTY17A (400040), TTTY4 (400037), DAZ1 (400003)	<1
9	Yq11.223	25570468	28382367	Deleção	0.0	2812	1708	TTY3B, TTTY3, CDY1B, CDY1, CSPG4P1Y, GOLGA2P3Y, GOLGA2P2Y, TTTY17A, TTTY17C, TTTY17B, TTTY4, TTTY4B, TTTY4C, BPY2B, BPY2C, BPY2, DAZ4, DAZ3, DAZ2	CDY1 (400016), CSPG4P1Y (400034), GOLGA2P2Y (400035), BPY2 (400013), DAZ3 (400027), DAZ2 (400026), TTTY3 (400036)	<1

*CNV encontrada apenas uma única vez na amostra de estudo.

**CNV não apresentou genes descritos no OMIM.

– Classificação das CNVs

Foram analisadas e classificadas as 94 CNVs apresentadas pelos 8 pacientes. As CNVs foram classificadas como benignas, potencialmente benignas, patogênicas, potencialmente patogênicas e significado clínico incerto (Gráfico 6).

Gráfico 6: Classificação e percentual das CNVs Benignas, Potencialmente Benignas, Patogênicas, Potencialmente Patogênicas e significado clínico incerto.

Todos os pacientes apresentaram CNVs classificadas como benignas e potencialmente benignas. O Paciente sete foi o único do grupo de estudo que não apresentou CNVs classificadas como patogênica e potencialmente patogênica (Gráfico 7).

Gráfico 7: Classificação e porcentagem das CNVs por paciente

Das 94 CNVs encontradas, 35 (37%) foram classificadas como benignas. A frequência destas CNVs no banco de dados do DGV foi maior que um por cento. Das 35 CNVs consideradas benignas 25 CNVs foram compartilhadas por mais de um paciente. As CNVs compartilhadas fazem parte de sete CNVRs (tabela 15). Das sete CNVRs apenas uma não compartilhou CNVs entre pacientes do grupo controle (espermatogênese normal) e grupo de estudo (falha na espermatogênese).

Vinte e quatro CNVs (23%) foram classificadas como potencialmente benignas. A frequência na população saudável (DGV) variaram de zero - CNVs que não apresentaram genes, a um por cento - CNVs que apresentam genes (Tabela 16). Das 24 CNVs, seis fazem partes de três CNVRs.

Tabela 15: CNVs classificadas como benignas

CNVR	Paciente	Tipo	Tamanho (Kb)	Localização Genômica	Início	Fim	Genes	OMIM	Frequência (DGV)
1*	1	Deleção	106	1q44	248688586	248794396	OR2T29, OR2T34, OR2T10, OR2T11		25
	4	Deleção	134	1q144	248660538	248794396	OR2G6, OR2T29, OR2T34, OR2T10, OR2T11		28
	6	Deleção	140	1q44	248688586	248828223	OR2T29, OR2T34, OR2T10, OR2T11, OR2T35, OR2T27		30
-	9	Deleção	130	3q26.1	162521296	162651027			1,14
3*	2	Deleção	140	8p11.22	39247097	39386952	ADAM5, ADAM3A		45
	3	Duplicação	116	8p11.22	39247097	39362916	ADAM5, ADAM3A		45
	5	Deleção	154	8p11.22	39230311	39384337	ADAM5, ADAM3A		45
	6	Deleção	140	8p11.22	39247097	39386952	ADAM5, ADAM3A		45
	7	Deleção	140	8p11.22	39247097	39386952	ADAM5, ADAM3A		45
-	2	Duplicação	125	10q26.3	135252178	135377265	LOC619207, CYP2E1, SYCE1	CYP2E1 (124040), SYCE1 (611486)	5
-	2	Duplicação	1432	10q11.22	46256559	47688677	FAM21C, AGAP4, PTPN20B, PTPN20A, BMS1P1, BMS1P5, GLUD1P7, FAM35BP, SYT15, GPRIN2, NPY4R, LINC00842, HNRNPA1P33, ANXA8, ANXA8L1, FAM25B, FAM25G, FAM25C, AGAP9, BMS1P6, BMS1P2, FAM35DP	FAM21C (613631), SYT15 (608081), GPRIN2 (611240), NPY4R (601790)	10
-	6	Duplicação	160	10p13.31	7975693	8135534	SLC2A14, SLC2A3	SLC2A14 (611039), SLC2A3 (138170)	3,2
-	4	Deleção	306	14q11.2	22632669	22938398			35
7*	1	Duplicação	467	14q32.33	106227153	106693670	KIAA0125, ADAM6		85
	2	Duplicação	626	14q32.33	106079822	106705896	ELK2AP, KIAA0125, ADAM6		85
	3	Duplicação	626	14q32.33	106079822	106706124	ELK2AP, KIAA0125, ADAM6		85
	4	Duplicação	686	14q32.33	106232259	106918044	KIAA0125, ADAM6, LINC00226		85
	5	Duplicação	679	14q32.33	106072250	106750867	ELK2AP, KIAA0125, ADAM6, LINC00226		85
	6	Duplicação	261	14q32.33	106263718	106525210	KIAA0125, ADAM6		85
	7	Duplicação	260	14q32.33	106270855	106530460	KIAA0125, ADAM6		85
8*	3	Duplicação	289	16p11.2	34466474	34755816	LOC283914, LOC146481, LOC100130700		16
	7	Duplicação	294	16p11.2	34471297	34765444	LOC283914, LOC146481, LOC100130700		16
	9	Duplicação	268	16p11.2	34471297	34739571	LOC283914, LOC146481, LOC100130700		16
10*	1	Duplicação	572	17q21.31	44212823	44784639	KANSL1, KANSL1-AS1, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSF1, LRRC37A2, NSF	KANSL1 (612452), NSF (601633)	45

CNVR	Paciente	Tipo	Tamanho (Kb)	Localização Genômica	Início	Fim	Genes	OMIM	Frequência (DGV)
	5	Duplicação	598	17q21.31	44187491	44785669	KANSL1, KANSL1-AS1, LRRC37A, ARL17A, ARL17B, NSFP1, LRRC37A2, NSF	KANSL1 (612452), NSF (601633)	45
-	7	Deleção	121	17q12	36283806	36404555	TBC1D3F, TBC1D3, LOC440434	TBC1D3F (610809), TBC1D3 (607741)	8
-	7	Duplicação	411	17q12	34426244	34836983	CCL4, TBC1D3B, CCL3L3, CCL3L1, CCL4L1, CCL4L2, TBC1D3C, TBC1D3H, TBC1D3G	CCL4 (182284), TBC1D3B (610144), CCL3L3 (609468), CCL3L1 (601395), CCL4L1 (603782), CCL4L2 (610757), TBC1D3C (610806), TBC1D3H (610811), TBC1D3G (610810)	15
-	4	Deleção	122	19p12	20598429	20720705	ZNF826P		12
14**	4	Deleção	271	22q11.23	25656237	25927657	IGLL3P, LRP5L, CRYBB2P1		2
	9	Duplicação	266	22q11.23	25656237	25922334	IGLL3P, LRP5L, CRYBB2P1		4
15*	1	Duplicação	193	22q11.22	23065697	23258369	MIR650, IGLL5		37
	2	Duplicação	301	22q11.22	22962196	23262943	POM121L1P, GGTL2, MIR650, IGLL5	GGTL2 (612339)	6
	3	Duplicação	134	22q11.22	23124497	23258369	MIR650, IGLL5		37
	4	Duplicação	195	22q11.22	23063020	23258369	MIR650, IGLL5		37
-	6	Duplicação	104	Xp22.33	387711	491934			2

* CNVRs formada por pacientes do grupo 1 (controle) e grupo 2 e 3 (parada de maturação e Síndrome de células de Sertoli Only)

** CNVR formada apenas por pacientes do grupo 2 e 3 (parada de maturação e Síndrome de células de Sertoli Only)

Tabela 16: CNVs classificadas como potencialmente benignas:

CNVR	Paciente	Tipo	Tamanho (Kb)	Localização Genômica	Início	Fim	Genes	OMIM	Frequência (DGV)
-	6	Duplicação	435,769	1q21.1	143959587	144395356	LOC100288142, LINC00623, LOC728875, PPIAL4C, PPIAL4B, PPIAL4A		1
-	4	Duplicação	854,398	6q14.1	81201696	82056094			0
-	6	Duplicação	146,843	7p12.1	52273353	52420196			0
2	6	Duplicação	156,697	7q11.22	68129503	68286200			0
	9	Duplicação	263,039	7q11.22	68181034	68444073			0
-	9	Duplicação	108,601	7q11.21	66864015	66972616			0
-	9	Duplicação	130,462	7q22.1	98075974	98206436			0
-	2	Duplicação	160,179	8q24.3	143473913	143634092	TSNARE1, BAI1	BAI1 (602682)	<1
4	1	Duplicação	140,871	9q34.3	139840430	139981301	C8G, LCN12, PTGDS, LCNL1, C9orf142, CLIC3, ABCA2, C9orf139, FUT7, NPDC1, ENTPD2, SAPCD2, UAP1L1, MAN1B1-AS1	C8G (120930), LCN12 (612905), PTGDS (176803), CLIC3 (606533), ABCA2 (600047), FUT7 (602030), NPDC1 (605798), ENTPD2 (602012), SAPCD2 (612057)	<1
	9	Duplicação	175,028	9q34.3	139776707	139951735	TRAF2, MIR4479, FBXW5, C8G, LCN12, PTGDS, LCNL1, C9orf142, CLIC3, ABCA2, C9orf139, FUT7, NPDC1, ENTPD2	TRAF2 (601895), FBXW5 (609072), C8G (120930), LCN12 (612905), PTGDS (176803), CLIC3 (606533), ABCA2 (600047), FUT7 (602030), NPDC1 (605798), ENTPD2 (602012)	< 1
5	6	Duplicação	121,547	9q31.2	110100862	110222409			0
	9	Duplicação	122,158	9q31.2	110100251	110222409			0
-	2	Duplicação	755,654	11p11.12	50472472	51228126			<1
-	5	Deleção	694,654	13q31.3	90560650	91255304	LINC00559, MIR622		0
-	4	Duplicação	320,369	15q11.2	24471579	24791948			1
-	1	Duplicação	181,261	16p13.3	1054129	1235390	SSTR5-AS1, SSTR5, C1QTNF8, CACNA1H	SSTR5 (182455), C1QTNF8 (614147), CACNA1H (607904)	1
-	1	Duplicação	164,91	16q24.3	88801603	88966513	PIEZO1, CDT1, APRT, GALNS, TRAPPC2L, PABPN1L, CBFA2T3	PIEZO1 (611184), CDT1 (605525), APRT (102600), GALNS (612222), TRAPPC2L (610970), CBFA2T3 (603870)	<1
	2	Duplicação	169,034	16q24.2	88321435	88490469			<1

CNVR	Paciente	Tipo	Tamanho (Kb)	Localização Genômica	Início	Fim	Genes	OMIM	Frequência (DGV)
-	6	Duplicação	301,783	16p13.3	1066510	1368293	SSTR5-AS1, SSTR5, C1QTNF8, CACNA1H, TPSG1, TPSB2, TPSAB1, TPSD1, UBE2I	SSTR5 (182455), C1QTNF8 (614147), CACNA1H (607904), TPSG1 (609341), TPSB2 (191081), TPSAB1 (191080), TPSD1 (609272), UBE2I (601661)	1
-	9	Duplicação	153,949	16p13.3	1081441	1235390	SSTR5-AS1, SSTR5, C1QTNF8, CACNA1H	SSTR5 (182455), C1QTNF8 (614147), CACNA1H (607904)	1
-	3	Deleção	115,712	18p11.32	1725757	1841469			1
-	1	Duplicação	270,09	Xq11.1	61882086	62152176			<1
-	3	Deleção	101,226	Xq11.2	64581293	64682519			0
19	3	Duplicação	217	Yq11.23	27007124	27224389	DAZ3, DAZ4, DAZ2, BPY2C, BPY2, BPY2B, TTTY4, TTTY4B, TTTY4C	DAZ3 (400027), DAZ2 (400026)	1
	5	Duplicação	532	Yq11.23	26489983	27022375	TTTY17A, TTTY17C, TTTY17B, TTTY4, TTTY4B, TTTY4C, BPY2B, BPY2C, BPY2, DAZ4, DAZ3, DAZ2	BPY2 (400013), DAZ3 (400027), DAZ2 (400026)	1

Foram classificadas sete CNVs (7,4%) como patogênicas. Todas as CNVs classificadas como patogênica estão presentes no cromossomo Y e apresentam Genes envolvidos na espermatogênese. Das sete CNVs classificadas como patogênicas apenas uma não apresentou genes descritas no OMIM (Tabela 17). Das sete CNVs quatro fazem parte de duas CNVRs.

As CNVs patogênicas foram encontradas em três pacientes inférteis, dois pertencentes ao grupo dois, com parada de maturação (paciente 4 e 5) e um paciente pertencente ao grupo três, com síndrome de células de Sertoli Only (paciente 9). O paciente quatro apresentou uma CNV do tipo duplicação, o paciente cinco apresentou quatro CNVs do tipo duplicação e o paciente nove apresentou duas CNVs do tipo deleção. O tamanho das CNVs variaram de 230K a 2812 Kb, com frequência que variou de zero a 32% segundo o banco de dados do DGV e frequências de zero a um por cento segundo o banco de dados do programa ChAS (aDGV) (Tabela 17).

Como quatro CNVs apresentaram frequências maiores que um por cento no banco de dados do DGV (Tabela 17) e só apareceram neste estudo nos pacientes inférteis, foi realizada uma análise das CNVs do paciente cinco e nove que englobava todas as suas CNVs, considerando que cada paciente tivesse apenas uma grande CNV (Tabela 18). Com esta análise foi visto que a frequência das CNVs de cada paciente era rara ou não aparecia descrita no banco de dados, por esta razão que as CNVs foram consideradas patogênicas (Tabela 18).

Tabela 17: CNVs classificadas como patogênicas

CNVR	Paciente	Tipo	Tamanho (Kb)	Localização Genômica	Início	Fim	Genes	OMIM	Frequência DGV	Frequência aDGV
-	4	Duplicação	230	Yp11.2	9168143	9398468	TTTY20, FAM197Y5, FAM197Y2, TSPY8, TSPY4, TSPY3, TSPY1	TSPY1 (480100)	0%	0%
-	5	Duplicação	269	Yq11.23	27227609	27496305	TTTY4, TTTY4B, TTTY4C, TTTY17A, TTTY17B, TTTY17C		3%	1%
-	5	Duplicação	504	Yq11.23	27674551	28178527	CDY1, CDY1B, TTTY3B, TTTY3	TTTY3 (400036)	4%	0%
17	5	Duplicação	517	Yq11.223	25848006	26365325	TTTY3B, TTTY3, CDY1B, CDY1, CSPG4P1Y, GOLGA2P3Y, GOLGA2P2Y	CDY1 (400016), CSPG4P1Y (400034), GOLGA2P2Y (400035)	0%	0%
	9	Deleção	872	Yq11.223	24644460	25515984	PRY2, PRY, TTTY17B, TTTY17C, TTTY17A, TTTY4B, TTTY4C, TTTY4, BPY2B, BPY2C, BPY2, DAZ1, DAZ4, DAZ3, DAZ2	TTTY17A (400040), TTTY4 (400037), DAZ1 (400003)	32%	0%
18	5	Duplicação	753	Yq11.223	24651462	25404172	PRY2, PRY, TTTY17B, TTTY17C, TTTY17A, TTTY4B, TTTY4C, TTTY4, BPY2B, BPY2C, BPY2, DAZ1, DAZ4, DAZ3, DAZ2	TTTY17A (400040), TTTY4 (400037), DAZ1 (400003)	4%	1%
	9	Deleção	2812	Yq11.223	25570468	28382367	TTTY3B, TTTY3, CDY1B, CDY1, CSPG4P1Y, GOLGA2P3Y, GOLGA2P2Y, TTTY17A, TTTY17C, TTTY17B, TTTY4, TTTY4B, TTTY4C, BPY2B, BPY2C, BPY2, DAZ4, DAZ3, DAZ2	CDY1 (400016), CSPG4P1Y (400034), GOLGA2P2Y (400035), BPY2 (400013), DAZ3 (400027), DAZ2 (400026), TTTY3 (400036)	0%	0%

aDGV – banco de dados de 3000 pessoas saudáveis presente no programa ChAS

Tabela 18: Análise da frequência englobando todas as CNVs do paciente 5 e 9 no banco de dados do aDGV e DGV

Paciente	Tipo	Tamanho (Kb)	Localização Genômica	Início	Fim	Genes	OMIM	Análises nos Bancos De dados aDGV e DGV
5	Duplicação	3527	Yq11.223-11.23	24651462	28178527	PRY2, PRY, TTTY17B, TTTY17C, TTTY17A, TTTY4B, TTTY4C, TTTY4, TTTY3B, TTTY3, CDY1B, CDY1, CSPG4P1Y, GOLGA2P3Y, GOLGA2P2Y, BPY2B, BPY2C, BPY2, DAZ1, DAZ4, DAZ3, DAZ2	TTTY3 (400036), TTTY17A (400040), TTTY4 (400037), DAZ1 (400003), CDY1 (400016), CSPG4P1Y (400034), GOLGA2P2Y (400035)	3 duplicações que englobam a região toda no aDGV (0,1%)
9	Deleção	3738	Yq11.223	24644460	28382367	TTTY3B, TTTY3, CDY1B, CDY1, CSPG4P1Y, GOLGA2P3Y, GOLGA2P2Y, TTTY17A, TTTY17C, TTTY17B, TTTY4, TTTY4B, TTTY4C, BPY2B, BPY2C, BPY2, DAZ4, DAZ3, DAZ2, DAZ1, PRY2, PRY	TTTY17A (400040), TTTY4 (400037), DAZ1 (400003), CDY1 (400016), CSPG4P1Y (400034), GOLGA2P2Y (400035), BPY2 (400013), DAZ3 (400027), DAZ2 (400026), TTTY3 (400036)	Englobando a região toda não tem no aDGV e DGV

aDGV – banco de dados de 3000 pessoas saudáveis presente no programa ChAS.

As CNVs que foram classificadas como potencialmente patogênicas estão descritas na tabela 19. Foram classificadas como potencialmente patogênica sete CNVs, presentes nos cromossomos 4, 9, 12, e X. A frequência variou de zero a 20% no DGV. Todas as CNVs apresentaram genes relevantes que podem estar relacionados com a infertilidade masculina. Quatro CNVs fazem parte de duas CNVRs (Tabela 19)

Vinte duas CNVs foram classificadas como significado clínico incerto. Elas apresentaram frequência zero ou menor que um por cento. Todas apresentaram genes que não foram possíveis de identificar se eles de alguma forma estão envolvidos com a infertilidade masculina (Tabela 20). Das 22 CNVs, com significado clínico incerto, cinco fazem parte de duas CNVRs (Tabela 20).

Tabela 19: CNVs classificadas como potencialmente patogênicas

VNR	Pacientes	Tipo	Tamanho (Kb)	Localização Genômica	Início	Fim	Genes	OMIM	Frequência (DGV)
-	4	Deleção	116	4q13.2	69435888	69551731	UGT2B15	UGT2B15 (600069)	20
-	4	Duplicação	174	12p11.21	31232956	31407111	DDX11	DDX11 (601150)	7
-	4	Duplicação	164	12p13.31	7971020	8134669	SLC2A14, SLC2A3	SLC2A14 (611039), SLC2A3 (138170)	3,2
16	6	Duplicação	311	Xp22.33	528480	839488	SHOX	SHOX (312865), SHOX (400020)	0
	6	Duplicação	216	Xp22.33	2054897	2270566	DHRX		<1
	9	Duplicação	273	Xp22.33	566009	839486	SHOX	SHOX (312865), SHOX (400020)	< 1
	9	Duplicação	142	Xp22.33	2128347	2270566	DHRX		< 1

Tabela 20: CNVs classificadas como significado clínico incerto

VNR	Paciente	Tipo	Tamanho (Kb)	Localização Genômica	Início	Fim	Genes	OMIM	Frequência
-	2	Duplicação	124,181	1p36.32	2847362	2971543	ACTRT2	ACTRT2 (608535)	<1%
	6	Duplicação	195,417	1p36.11	25910815	26106232	MAN1C1		0
-	6	Duplicação	1025,63	1q21.2	147844757	148870387	NBPF8, FLJ39739, PPIAL4B, PPIAL4A, PPIAL4F, PPIAL4D, NBPF14, NBPF9, NBPF15, NBPF16, PPIAL4E	NBPF8 (613998), NBPF14 (614003), NBPF15 (610414), NBPF16 (614005), PPIAL4E (608608)	<1%
-	6	Duplicação	171,001	6q15	88373627	88544628	ORC3, AKIRIN2	ORC3 (604972), AKIRIN2 (615165)	0
-	1	Duplicação	121,065	8q22.3	104370101	104491166	CTHRC1, SLC25A32, DCAF13	CTHRC1 (610635), SLC25A32 (610815)	0
-	9	Duplicação	175,028	9q34.3	139776707	139951735	TRAF2, MIR4479, FBXW5, C8G, LCN12, PTGDS, LCNL1, C9orf142, CLIC3, ABCA2, C9orf139, FUT7, NPDC1, ENTPD2	TRAF2 (601895), FBXW5 (609072), C8G (120930), LCN12 (612905), PTGDS (176803), CLIC3 (606533), ABCA2 (600047), FUT7 (602030), NPDC1 (605798), ENTPD2 (602012)	< 1%
-	9	Duplicação	306,949	10p12.33	17889807	18196756	MRC1, TMEM236, MIR511-2, MIR511-1	MRC1 (153618)	0
-	9	Duplicação	172	12q24.21	115093970	115265688	TBX3	TBX3 (601621)	0
-	7	Deleção	141,173	13q22.1	74455103	74596276	KLF12	KLF12 (607531)	<1%
-	2	Duplicação	156,43	16q24.1	85276939	85433369	LINC00311, MIR5093		1
-	6	Duplicação	101,045	16p13.3	549826	650871	RAB11FIP3, LINC00235, SOLH, MIR5587, MIR3176, C16orf11, NHLRC4, PIGQ, RAB40C	RAB11FIP3 (608738), CAPN15 (603267), PIGQ (605754)	<1%
-	6	Duplicação	315,568	17q25.3	80219054	80534622	CSNK1D, CD7, SECTM1, TEX19, UTS2R, OGFOD3, HEXDC, C17orf62, NARF, FOXK2	CSNK1D (600864), CD7 (186820), SECTM1 (602602), UTS2R (600896), NARF (605349), FOXK2 (147685)	0
-	6	Duplicação	133,719	19p13.3	414714	548433	SHC2, ODF3L2, MADCAM1, TPGS1, CDC34, GZMM	SHC2 (605217), MADCAM1 (102670), CDC34 (116948), GZMM (600311)	<1%
-	9	Duplicação	133,341	19p13.3	415092	548433	SHC2, ODF3L2, MADCAM1, TPGS1, CDC34, GZMM	SHC2 (605217), MADCAM1 (102670), CDC34 (116948), GZMM (600311)	< 1%
-	9	Duplicação	172	12q24.21	115093970	115265688	TBX3	TBX3 (601621)	0
-	9	Duplicação	127	9q34.3	139308341	139435356	PMPCA, INPP5E, SEC16A, C9orf163, NOTCH1, MIR4673	PMPCA (613036), INPP5E (613037), SEC16A (612854), NOTCH1 (190198)	0
-	9	Duplicação	103,458	19p13.2	7119374	7222832	INSR	INSR (147670)	< 1%
12	2	Duplicação	258,798	20q13.33	61054949	61313747	C20orf166-AS1, C20orf166, MIR1-1, MIR133A2, SLCO4A1, LOC100127888	MIR1-1 (609326), MIR133A2 (610255), SLCO4A1 (612436)	<1%
	6	Duplicação	263,259	20q13.33	61033169	61296428	GATA5, C20orf166-AS1, C20orf166, MIR1-1, MIR133A2, SLCO4A1, LOC100127888	GATA5 (611496), MIR1-1 (609326), MIR133A2 (610255), SLCO4A1 (612436)	<1%
	9	Duplicação	244,869	20q13.33	61054949	61299818	C20orf166-AS1, C20orf166, MIR1-1, MIR133A2, SLCO4A1, LOC100127888	MIR1-1 (609326), MIR133A2 (610255), SLCO4A1 (612436)	< 1%
13	6	Duplicação	117,859	20q13.2	52195024	52312883	ZNF217	ZNF217 (602967)	<1%
	9	Duplicação	147,315	20q13.2	52199043	52346358	ZNF217	ZNF217 (602967)	< 1%

– Análise de Regiões Específicas

Com o Auxílio da ferramenta CytoRegions do programa ChAS foi possível validar parte dos resultados obtidos pela técnica de MLPA. Das 23 sondas alteradas no MLPA (tabela 4), foi possível validar o resultado da deleção e duplicação de 19 sondas presentes no cromossomo Y, nas regiões AZFb e AZFc. As duplicações encontradas no cromossomo 12 (12q14.2) não foram observadas nos resultados do CytoScan.

6.3 Análise dos microRNAs Diferencialmente Expressos nas Amostras de Biopsia Testicular

6.3.1 Pré processamento dos Dados

O perfil transcricional de miRNAs em larga escala nas amostras de biopsia testicular, foi realizado por meio da metodologia de microarranjos.

Os dados numéricos referentes a intensidade do sinal das probes – arquivos .CEL de cada Chip nas condições estudadas (I- Parada de maturação das células germinativas *versus* Controle; II- Síndrome de células de Sertoli Only *versus* Controle e III- Síndrome de células de Sertoli Only *versus* Parada de maturação) foram inicialmente analisados no software Affymetrix Expression Console para a verificação da qualidade dos mesmos, remoção do background e normalização entre as amostras, bem como a criação dos arquivos CHP que são os arquivos de entrada no software Transcriptome Analysis Console (TAC) onde é realizada a análise da expressão genica diferencial. O gráfico boxplot dos dados pós normalização das condições estudadas (Figura 17) demonstram a eficiência da correção do background da normalização na remoção da variação não biológica e artefatos, inerente a metodologia de microarray, pois a distribuição do sinal de todos os microarrays tornara-se semelhante.

Figura 15: Gráfico Boxplot pós normalização dos dados.

Os gráficos obtidos da análise do componente principal (PCA) e da correlação de Pearson entre as amostras (Figura 18 e 19 respectivamente) mostram a similaridade do perfil transcricional dos miRNAs entre as replicatas biológicas de cada grupo e também apontam que existe uma assinatura de miRNAs para cada condição estudada pois há a separação dos dados em grupos distintos.

Figura 16: Gráfico do componente principal (PCA), mostrando a similaridade entre os grupos e apontando a existência de uma assinatura de miRNAs para cada condição estudada

Figura 19: Gráfico de correlação de Pearson, mostrando a similaridade entre os grupos e apontando a existência de uma assinatura de miRNAs para cada condição estudada.

6.3.2 análises Estatística da Expressão Diferencial Dos miRNAs

Os dados normalizados e ajustados foram submetidos a análise estatística no software transcriptome Analysis Console. Através do algoritmo One-way Between-Subject ANOVA e correção dos testes múltiplos por Benjamini-Hochberg Step-Up FDR. Esta análise identificou um total de 393 miRNAs diferencialmente expressos ($p \leq 0,01$ (ajustado por FDR) e fold change 1,5). Em seguida empregou-se uma análise de agrupamento hierárquico não supervisionado, com base nos 393 miRNAs diferencialmente expressos, a qual permitiu a identificação dos grupos de genes induzidos e reprimidos bem como a relação de similaridade entre as amostras, estes resultados são visualizados por meio do Heatmap e agrupamento hierárquico (Figura 20).

Figura 20: Heatmap e agrupamento hierárquico das amostras e dos miRNAs diferencialmente expressos entre as condições estudadas: MA_vs_Ctrl, SCOS_vs_Ctrl e SCOS_vs_MA. Total de miRNAs diferencialmente expressos = 393 ($p \leq 0,01$ (ajustado por FDR) e fold change 1,5).

– Condição I– Parada de Maturação de Células Germinativa (MA) *versus* Controle (Ctrl)

A análise entre MA vs Ctrl identificou um total de 86 miRNAs diferencialmente expressos valores de P, e P ajustado para cada um destes 86 miRNAs podem ser observados no apêndice 2. Destes 86 miRNAs diferencialmente expressos, 57 miRNAs estavam reprimidos e 29 miRNAs induzidos no grupo de Parada de Maturação relativamente ao controle. Estes resultados podem ser observados na figura 21.

Figura 21: Volcano plot representando os miRNAs diferencialmente expressos entre os pacientes com parada de maturação de células germinativo e o grupo controle (Condição: MA_vs_Ctrl). Total de miRNAs diferencialmente expressos 86 (p ajustado por FDR $\leq 0,01$ e fold change 1,5). Pontos verdes representam os miRNAs reprimidos nos pacientes PA ($n=57$) e pontos vermelhos ($n=29$) os miRNAs induzidos nos pacientes PA.

– **Condição II - Síndrome de Células de Sertoli Only (SCOS) *versus* Controle (Ctrl)**

A análise entre SCOS vs Ctrl identificou um total de 245 miRNAs diferencialmente expressos valores de P, e P ajustado para cada um destes 245 miRNAs podem ser observados no apêndice 2. Destes 245 miRNAs diferencialmente expressos (Figura 22), 117 eram reprimidos e 128 eram induzidos no grupo SCOS relativamente ao controle, elucidando uma maior diferença deste grupo em relação aos controles do que o grupo MA.

Figura 22: Volcano plot representando os miRNAs diferencialmente expressos entre os pacientes Síndrome das células de Sertoli e o grupo controle (Condição: SCOS_vs_Ctrl). Total de miRNAs diferencialmente expressos 245 (p ajustado por FDR $\leq 0,01$ e fold change 1,5). Pontos verdes representam os miRNAs reprimidos nos pacientes SCS (n= 117) e pontos vermelhos (n= 128) os miRNAs induzidos nos pacientes SCS.

– **Condição III - Síndrome de Células de Sertoli Only (SCOS) versus Parada de Maturação de Células Germinativa (MA)**

A análise entre SCOS *versus* MA identificou um total de 62 miRNAs diferencialmente expressos valores de P, e P ajustado para cada um destes 62 miRNAs podem ser observados no apêndice 2. Destes 62 miRNAs diferencialmente expressos, 27 eram reprimidos e 35 eram induzidos no grupo SCOS relativamente ao MA (Figura 23)

Figura 23: Volcano plot representando os miRNAs diferencialmente expressos entre os pacientes Síndrome das células de Sertoli e os pacientes com parada de maturação de células germinativas (Condição: SCOS_vs_MA). Total de miRNAs diferencialmente expressos 62 (p ajustado por FDR $\leq 0,01$ e fold change 1,5). Pontos verdes representam os miRNAs reprimidos nos pacientes SCOS ($n= 27$) e pontos vermelhos ($n= 35$) os miRNAs induzidos nos pacientes SCOS.

6.3.3 Distribuição dos microRNAs pelos Cromossomos

Todos os cromossomos exceto o cromossomo Y apresentaram miRNAs diferencialmente expressos. Dos 318 miRNAs (com anotação completa no mirBase) diferencialmente expressos, 125 eram hiperexpressos e 193 eram hipoexpressos (Gráfico 8). Os cromossomos que apresentaram o maior número de miRNAs diferencialmente expressos foram: o cromossomo 19 com 55 miRNAs, o um com 29 miRNAs, o nove e o 14 com 25 miRNAs o 11 e o X com 23 miRNAs diferencialmente expressos.

Gráfico 8: Distribuição dos microRNAs, diferencialmente expressos, pelos cromossomos.

6.3.4 predição de microRNAs Alvos, Anotação e Classificação Funcional dos microRNAs Diferencialmente Expressos

Para a identificação dos miRNAs diferencialmente expressos, nos utilizamos apenas os miRNAs com anotação completa no miRBase.

Dos 393 miRNAs diferencialmente expressos apenas 318 miRNAs tinham anotação completa. A análise entre MA vs Ctrl identificamos 81 miRNA diferencialmente expresso, sendo 55 hipoexpresso e 26 hiperexpresso. Na condição SCOS vs Ctrl nos encontramos 196 miRNAs com anotação completa no miRBase, 111 eram hipoexpresso e 85 hiperexpresso. Na

condição SCOS vcs MA nos encontramos 27 miRNAs hipoexpresso e 14 hiperexpresso, total de miRNAs diferencialmente expressos nesta condição foi de 41 miRNAs.

Dos 318 miRNAs diferencialmente expresso com anotação completa no miRBase, nos encontramos 166 (66.9%) miRNAs diferencialmente expresso exclusivos da condição SCOS vc Ctrl e 52 (21%) miRNAs diferencialmente expresso exclusivo do grupo MA vs Ctrl e quando comparamos a condição SCOS vs MA notamos que 30 (12.1%) miRNAs diferencialmente expressos foram compartilhados entre os dois grupos (Figura 24). A tabela 21 mostra os miRNAs compartilhados entre os pacientes do grupo MA e SCOS quando comparados com o grupo controle.

Figura 24: Diagrama de Venn mostrando a sobreposição de miRNAs que foram diferencialmente expressos (hiperexpressos e hipoexpressos) nos grupos Síndrome de Célula de Sertoli (SCOS) e parada de maturação (PA) quando comparados ao grupo controle. Apenas os miRNAs com anotação completa foram considerados

Tabela 21: miRNAs diferencialmente expressos compartilhados por amostras de tecido testicular com Síndrome de Célula de Sertoli (SCOS) e Parada de Maturação (MA) quando comparadas com amostras controles (Fold change > 1.5; p valor ajustado <0.01)

miRNA	SCOS		MA	
	<i>Fold change</i>	<i>pvalue</i>	<i>Fold change</i>	<i>pvalue</i>
hsa-miR-122-5p	-76,43	0,000321	-35,74	0,023981
hsa-miR-449c-5p	-26,25	0,000022	-11,11	0,041775
hsa-miR-7153-5p	-23,26	0,000334	-26,97	0,001018
hsa-miR-7159-5p	-16,47	0,000848	-13,86	0,011045
hsa-miR-375	-11,76	0,000055	-2,84	0,026995
hsa-mir-34c	-11,34	0,00005	-2,6	0,030448
hsa-miR-6736-3p	-11,12	0,006	-10,36	0,005314
hsa-mir-7154	-8,36	0,000385	-5,55	0,000578
hsa-miR-3154	-5,44	0,002471	-2,16	0,021998
hsa-miR-4667-5p	-4,58	0,007134	-1,81	0,037607
hsa-miR-518e-3p	-4,3	0,003734	-2,64	0,043405
hsa-miR-6735-3p	-3,74	0,005625	-4,19	0,004753
hsa-mir-7153	-3,57	0,001519	-4,15	0,000879
hsa-miR-5585-3p	-3,48	0,00578	-3,52	0,010579
hsa-miR-296-3p	-3,19	0,003844	-1,54	0,013842
hsa-miR-575	-2,53	0,008029	-1,72	0,016971
hsa-miR-4651	-2,13	0,003317	-1,75	0,009351
hsa-miR-4689	-2,12	0,00482	-1,62	0,017246
hsa-miR-1273e	-2,09	0,001223	-1,54	0,005231
hsa-miR-4739	-2,05	0,007928	-1,55	0,00549
hsa-mir-1233-1	-1,94	0,003972	-1,77	0,00127
hsa-mir-1233-2	-1,94	0,003972	-1,77	0,00127
hsa-miR-6798-5p	-1,84	0,002839	-1,66	0,000499
hsa-miR-320e	1,56	0,008198	1,96	0,01273
hsa-miR-320d	2,4	0,004373	1,99	0,036327
hsa-miR-455-3p	2,75	0,002044	1,58	0,018852
hsa-miR-485-5p	3,44	0,007091	1,71	0,020265
hsa-miR-654-5p	4,23	0,003674	2,23	0,034101
hsa-miR-299-5p	4,27	0,001247	1,94	0,029563
hsa-miR-432-5p	4,62	0,003923	2,71	0,036502

Para a busca dos mRNAs alvos utilizamos a ferramenta miRWalk 2.0 (Dweep et al. 2015). Os miRNAs que tiveram a modulação mais alterada em cada condição, (PA vs Ctrl, SCOS vs Ctrl e SCOS vs Ctrl) ou seja, os mais hiperexpressos e os mais hipoexpressos é que foram avaliados.

Na busca dos alvos da condição MA vs Ctrl utilizamos 10 miRNAs, sendo cinco hipoexpresso (hsa-miR-122-5p, hsa-miR-449c-5p, hsa-miR-6736-3p, hsa-miR-7153-5p, hsa-miR-7159-5p e cinco hiperexpresso (.hsa-miR-3160-3p hsa-miR-3613-5p hsa-miR-432-5p hsa-miR-485-3p hsa-miR-6084) .

Na condição SCOS vs Ctrl nos utilizamos mais de cinco miRNAs hipoexpressos, por que percebeu-se que dentre os genes mais hiporexpressos há um enriquecimento das famílias mir-34, mir-449, mir-515 além do micro hsa-miR-122-5p que também é altamente hipoexpresso. Na análise dos hiperexpressos nos utilizamos hsa-miR-196a-5p, hsa-miR-411-3p, hsa-miR-432-5p, hsa-miR-433-3p, hsa-miR-455-5p.

Na condição SCOS vs MA para os hipoexpressos utilizamos o hsa-miR-512-3p e a família mir-515 (hsa-miR-516b-5p, hsa-miR-518e-5p, hsa-miR-519a-5p, hsa-miR-519b-5p, hsa-miR-519c-5p, hsa-miR-522-5p, hsa-miR-523-5p) e para os hiperexpressos utilizamos hsa-miR-196a-5p, hsa-miE-411-3p, hsa-miR-3921.

A interpretação do significado biológico das interações preditas e a classificação, funcional dos miRNAs, foi realizada através da ferramenta de anotação funcional DAVID versão 6.8. Os processos biológicos contendo pelo menos cinco genes e que apresentaram escore EASE, com correção de Benjamini-Hochberg $< 0,05$ foram considerados significativos.

Os processos biológicos mais enriquecidos, considerando-se o p valor e a quantidade de genes associados aos alvos dos miRNAs diferencialmente expressos em cada uma das condições estudadas estão apresentados nas figuras 25, 26, 27.

Figura 25: Processos biológicos apontados pela análise funcional como enriquecidos considerando os potenciais alvos dos microRNAs diferencialmente expressos hipoeexpressos (A) e hiperexpressos (B) em amostras Parada de Maturação (MA) em relação ao grupo controle. Os escores de enriquecimento obtidos pelo banco de dados DAVID correspondentes a cada processo biológico estão apresentados como os valores de p em escala logarítmica ($-\log_2$)

Figura 26: Processos biológicos apontados pela análise funcional como enriquecidas considerando os potenciais alvos dos microRNAs diferencialmente expressos hipoeexpressos (A) e hiperexpressos (B) em amostras Síndrome de Célula de Sertoli (SCOS) em relação ao grupo controle. Os escores de enriquecimento obtidos pelo banco de dados DAVID correspondentes a cada processo biológico estão apresentados como os valores de p em escala logarítmica ($-\log_2$).

Figura 27: Processos biológicos apontados pela análise funcional como enriquecidas considerando os potenciais alvos dos microRNAs diferencialmente expressos hipoeexpressos (A) e hiperexpressos (B) em amostras Síndrome de Célula de Sertoli (SCOS) em relação às amostras Parada de Maturação (GA). Os escores de enriquecimento obtidos pelo banco de dados DAVID correspondentes a cada processo biológico estão apresentados como os valores de p em escala logarítmica ($-\log_2$).

Além da anotação funcional através dos mRNAs alvos, fizemos também uma busca por miRNAs associados à patogenias no aparelho reprodutor masculino (Azoospermia, Oligospermia, Neoplasias Testiculares e Neoplasias de Próstata) no banco de dados HMDD v2.0 (the Human microRNA Disease Database). Neste banco de dados foram encontrados um total de 58 miRNAs diferencialmente expressos relacionados com a Azoospermia, Neoplasia Testicular e Neoplasia de Prostata. Dos 318 miRNAs diferencialmente expresso com anotação completa no miRBase, 13 estavam presentes nesta lista (Tabela 22).

Tabela 22: miRNAs diferencialmente expressos nos pacientes com Parada de Maturação das células germinativas (MA) e Síndrome de Células de Sertoli Only (SCOS), encontrados no banco de dados HMDD.

miRNAs relacionados à Azoospermia				
Condição estudada	miR_ID	Fold Change	Cromossomo	Posição Genômica
PM vs Ctrl	hsa-miR-373-5p	-3,77	chr19	54291964-54291985
SCS vs Ctrl	hsa-miR-372-3p	-17,03	chr19	54291185-54291207
SCS vs Ctrl	hsa-miR-373-3p	-17,85	chr19	54292002-54292024
SCS vs Ctrl	hsa-miR-520g-3p	-20,28	chr19	54225474-54225497
miRNAs relacionados à Câncer de Próstata				
Condição estudada	miR_ID	Fold Change	Cromossomo	Posição Genômica
SCS vs Ctrl	hsa-miR-125b-2-3p	2,14	chr 21	17962610-17962631
SCS vs Ctrl	hsa-miR-99a-5p	1,72	chr21	17911421-17911442
miRNAs associados à Câncer de testículo				
Condição estudada	miR_ID	Fold Change	Cromossomo	Posição Genômica
PM vs Ctrl	hsa-miR-199a-3p	1,65	chr1	172113694-172113715
PM vs Ctrl	hsa-miR-199b-3p	1,65	chr9	131007024-131007045
PM vs Ctrl	hsa-miR-373-5p	-3,77	chr19	54291964-54291985
SCS vs Ctrl	hsa-miR-199a-5p	2,38	chr1	172113732-172113754
SCS vs Ctrl	hsa-miR-371a-5p	-4,27	chr19	54290934-54290953
SCS vs Ctrl	hsa-miR-372-3p	-17,03	chr19	54291185-54291207
SCS vs Ctrl	hsa-miR-373-3p	-17,85	chr19	54292002-54292024

Discussão

7. Discussão

7.1 Alterações Cromossômicas Identificadas por MLPA

A padronização da técnica de MLPA mostrou-se adequada, pois reunia as condições necessárias para ser aplicada adequadamente na triagem dos pacientes deste estudo.

Os Pacientes um, dois, três (amostras controles) (Figura 9), seis e oito apresentaram padrão de amplificação das sondas dentro da faixa da normalidade. O coeficiente de dosagem médio das sondas foi um.

Os pacientes quatro e sete apresentaram padrão de amplificação alterado das sondas DPY19L2 (DQ 1,53 e 1,49) condizente com microduplicação (Figura 9). Os coeficientes de dosagem de todas as sondas alteradas estão listados na tabela 4.

Sabe-se que alterações no gene DPY19L2 presente no cromossomo 12 está relacionado à globozoospermia (Harbuz et al., 2011). A globozoospermia é um tipo raro de teratozoospermia (morfologia anormal do espermatozoide), caracterizado por espermatozoides de cabeça arredondada com ausência de acrossomo. Sua origem é por anomalia na espermatogênese. Homens portadores de globozoospermia são inférteis (Dam et al., 2007). A análise de CNVs pelo CytoScan mostrou que o paciente apresentava CNVs do tipo duplicação no cromossomo 12 (Tabela 8), mas não na região onde a sonda de MLPA detectou a duplicação. O Paciente sete não apresentou CNVs no cromossomo 12. Não foi possível verificar se estes pacientes apresentaram alterações na morfologia dos espermatozoides devido ao fato deles serem azoospermicos.

Os pacientes cinco e nove apresentaram alterações nos padrões de amplificação das sondas do cromossomo Y. O paciente cinco apresentou oito sondas duplicadas na região AZFb e AZFc (Figura 10). O Paciente nove apresentou 11 sondas deletadas da região AZFc (Figura 11).

As sondas alteradas nos pacientes cinco e nove localizam-se nos principais genes citados nos trabalhos de revisão como pertencentes da região AZFc. Estudos mostram que os genes desta região estão envolvidos na espermatogênese e sua expressão é específica nas células da linhagem germinativa. Sua supressão só transmite consequências fenotípicas para o tecido testicular (Lahn & Page, 1999, 2002; Tse et al., 2003; Stouffs et al., 2004; Huang et al., 2008; Kim et al., 2009). Duplicações nesta região foram relatadas em alguns estudos e

nestes estudos eles associam ou não associam a duplicação com a infertilidade masculina (Lin et al 2007; Giachini et al., 2008; Ye et al., 2013).

Um estudo realizado utilizando o kit de MLPA P360 além de relatar a presença de microdeleções em alguns pacientes, também relatou a ocorrência de microduplicações na região AZF, mais especificamente na região AZFc (Bunyan et al., 2012). Este estudo comparou a eficiência da técnica padrão para detecção de microdeleção em pacientes inférteis (PCR Multiplex de STS) com a técnica de MLPA. Os resultados obtidos foram satisfatórios uma vez que a técnica de MLPA mostrou ser mais eficiente na identificação de microdeleções, revelando microdeleções em pacientes que tinham sido considerados normais pela técnica padrão e por detectar microduplicação, um resultado nunca descrito em estudos que utilizam a PCR de STS em seus estudos (Bunyan et al., 2012).

A técnica de MLPA mostrou ser uma técnica ideal para a detecção de alterações cromossômicas em um grande número de publicações, que vão desde a detecção de deleções de cópia única ou duplicações de genes autossômicos ou cromossomos sexuais (Bunyan et al., 2004; Bunyan et al., 2007) a análise de dosagem de regiões genômicas com número de cópias variável (Barber et al., 2008; Barber et al. 2010).

O primeiro estudo que mostrou a existência de microduplicação na região AZF foi realizado em 2003. O estudo fez uma análise molecular de 1200 cromossomos de homens da Península Ibérica e revelou duplicações na região AZFa mediada pela recombinação homóloga não alélica entre elementos retrovirais endógenos (HERV) que flanqueiam a região. Os autores concluíram que as duplicações encontradas então presentes na população estudada a pelo menos 17 gerações e, portanto, deve ser compatível com a fertilidade masculina nesta população.

O relato de duplicação da região AZF feito por Lin et al (2007) em homens inférteis Chineses de Taiwan revelou que a duplicação parcial da região AZFc no grupo estéril (7,0%) foi significativamente mais elevada do que no grupo controle fértil (0,9%) e a população geral de Taiwan (1,7%). O estudo concluiu que a duplicação parcial de AZFc é um fator de risco para a infertilidade masculina na população em Taiwan (Lin et al., 2007). Outro estudo realizado com homens inférteis Italianos também revelou duplicação na região AZFc, no entanto a conclusão deste estudo não relaciona a duplicação como um fator de risco para a falha na espermatogênese (Giachini et al., 2008). Um estudo mais recente realizado com 224 homens inférteis e 153 homens férteis chineses também revelou ter encontrado duplicação

na região AZFc. A frequência de duplicações parciais no grupo infértil (4,0%) é significativamente maior que a do grupo controle (0,7%), eles relacionaram a duplicação com a infertilidade destes pacientes (Ye et al., 2013).

Com o Auxílio da ferramenta Cytoregions do programa ChAS foi possível verificar se as deleções e duplicações das sondas de MLPA na região AZF do cromossomo Y também estavam presentes nas análises do CytoScan. A análise revelou que as alterações encontradas abrange uma grande área do cromossomo Y e que a deleções e as duplicações encontradas nos pacientes se sobrepõem (Figura 24). O Paciente cinco apresentou cinco CNVs do tipo deleção e o paciente nove apresentou duas CNVs do tipo deleção.

Figura 28: Representação da sobreposição das CNVs encontradas no cromossomo Y, na região AZF. Em azul está representado as 5 CNVs do tipo duplicação do paciente 5. Em marrom está representado as duas CNVs do tipo deleção no paciente 9. Figura gerada pelo programa ChAS

Deleções no cromossomo Y estão associadas a falhas na espermatogênese (McLachlan, Mallidis, Ma, Bhasin, & de Kretser, 1998), mas poucos estudos relatam as duplicações como causa provável da infertilidade. (R C Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993) (R C Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993) (R C Lee, Feinbaum, & Ambros, 1993). Um estudo realizado com homens chineses inférteis também encontrou duplicações na região AZF, eles concluíram que a duplicação parcial da região AZFc eleva o risco de infertilidade na

população (Lin et al. 2007). Um outro estudo também relacionou a duplicação parcial encontrada na região AZFc como sendo responsável pela infertilidade dos pacientes do estudo (Ye et al., 2013).

Os resultados deste trabalho mostram que a duplicação, assim como a deleção, também pode afetar a espermatogênese. Uma vez que observamos que o paciente cinco e nove eram azoospermicos. O que diferiu um paciente do outro foi a biopsia testicular. O paciente cinco apresentou parada de maturação das células germinativas e o paciente nove apresentou síndrome de células de Sertoli Only. Provavelmente a deleção dos genes da região AZF afeta mais a espermatogese do que a duplicação da mesma região. Mais estudos envolvendo duplicação na região AZF são necessários para poder afirmar com certeza que duplicações assim como deleções da região AZF causam a infertilidade masculina.

7.2 Analise Genômica

Para a análise genômica utilizamos 25 marcadores para detecção de CNVs do tipo deleção e 50 marcadores para CNVs do tipo Duplicação, minimizando a detecção de falso-positivos. O uso de um número maior de marcadores para detecção de duplicações é para neutralizar qualquer viés que possa ocorrer devido ao fato da duplicação de forma geral envolver grandes segmentos genômicos quando comparados a duplicação (Choy et al., 2010).

7.2.1 Perfil de CNVs no Genoma dos Pacientes com Azoospermia Obstrutiva e Azoospermia não obstrutiva

Do total de 94 CNVs detectadas, 75 corresponderam duplicação (80%) e 19 a deleção (23%). Como esperado, foram encontradas menos CNVs em homozigose do que em heterozigose, 88 e 6, respectivamente (Tabela 7), estando de acordo com outros trabalhos (Sharp et al., 2005; Tuzun et al., 2005).

Quarenta e uma CNVs foram de recorrência única (44%) e 53 (56%) foram de recorrência entre os pacientes controle (Azoospermia obstrutiva) e os pacientes do estudo

(Azoospermia não obstrutiva). Este relato está de acordo com o que foi encontrado por Shaikh et al. (2009) em que a maioria das CNVs detectadas em amostra de indivíduos controle foi classificada como não-única, recorrentes em mais de um indivíduo não relacionado. Em geral a sobreposição das CNVs recorrentes não é total.

A maioria das CNVs recorrentes apresenta pontos de quebra distintos, ou seja, apresenta o mesmo início, mas varia no término, e vice-versa, ou ainda, não compartilham posições iniciais e finais, porém se sobrepõem em mais de 90% da sequência. Dessa forma, as CNVs recorrentes são comumente categorizadas em CNVRs que representam a região de CNVs que se sobrepõe entre os indivíduos. No presente estudo, foram descritas 19 CNVRs que englobaram as 254 CNVs recorrentes (Tabela 7).

A incidência de CNVs idênticas é muito baixa, este fato pode ser reflexo da formação das CNVs através das altas taxas de mutações. Estima-se que a taxa de mutação locus-específica de CNVs é de $1,7 \times 10^{-6}$ a $1,0 \times 10^{-4}$ por locus (Lupski, 2007; van Ommen, 2005). Esta taxa é 100 a 10 mil CNVs vezes maior do que a taxa de substituição de nucleotídeos (SNPs) que é de $1,8-2,5 \times 10^{-8}$ por par de base por geração (Kondrashov, 2003; Nachman & Crowell, 2000). A taxa de mutação de SNPs é relativamente constante, já as taxas de mutação de CNVs podem variar em diferentes loci, o que provavelmente reflete diferenças nos mecanismos de formação das CNVs e na arquitetura genômica local ou regional susceptível à instabilidade genômica (X. Guo et al., 2009).

7.2.2 Classificação das CNVs

As CNVs encontradas neste estudo foram classificadas como benignas, potencialmente benignas, patogênicas, potencialmente patogênicas e significado clínico incerto.

Das 94 CNVs, 35 (37%) foram classificadas como benignas e 24 CNVs (26%) foram classificadas como potencialmente benignas para a infertilidade masculina. Estes resultados eram esperados, uma vez que se sabe que as variações no número de cópias entre os indivíduos implicam um papel contributivo das CNVs na variação humana normal (Ingelman-Sundberg, Sim, Gomez, & Rodriguez-Antona, 2007; Perry et al., 2007). Um estudo realizado com pacientes com falha na espermatogênese identificou um total de 42 CNVs, destas, 23 CNVs não foram associadas com a infertilidade masculina. Das 23 CNVs não relacionadas à

infertilidade nesse estudo quatro CNVs também estavam presentes no nosso estudo e foram classificadas como benigna ou potencialmente benigna (8p22, 10q11.22, 11p11.12 e 16p12.2) (Dong et al., 2015b).

Duas CNVs foram consideradas potencialmente benignas, apesar de estarem presentes no cromossomo Y e a análise feita no banco de dados do OMIM mostrar que os genes presentes nestas CNVs estão relacionados com o fenótipo de infertilidade.

O fato de um dos pacientes que apresentou a CNV Yq11.23 (paciente 3) ser do grupo controle e apresentar biopsia testicular normal mostrou que está CNV em particular quando encontrada sozinha, não estando associada a mais nenhuma CNV do tipo duplicação na região AZF, pode ser considerada benigna. Uma vez que observamos que a CNV do paciente três é praticamente do mesmo tamanho que a CNV do paciente cinco e também do mesmo tipo, duplicação (Tabela 16) mas o paciente cinco apresentou mais quatro CNVs do tipo duplicação que foi classificada como patogênica.

O paciente cinco apresentou falha na espermatogênese enquanto o paciente três apresentou espermatogênese normal. Os nossos resultados mostram que provavelmente a duplicação da CNV Yq11.23, quando está presente sozinha, pode não ser capaz de provocar falha na espermatogênese.

Foram classificadas sete CNVs (7%) como patogênicas. Todas as CNVs classificadas como patogênica estão presentes no cromossomo Y e apresentam Genes envolvidos na espermatogênese. O tamanho destas CNVs variaram de 230 kb a 3738 Mb. As CNVs classificadas como patogênicas foram encontradas nos pacientes quatro, cinco e nove e foram do tipo duplicação, duplicação e deleção respectivamente.

O paciente quatro apresentou uma CNV do tipo duplicação de 230kb, nesta CNV está presente o gene TSPY1. Três estudos associando CNV com o gene TSPY1 foram realizados. Dois destes estudos sugerem que a CNV TSPY1 esteja ligada com a falha na espermatogênese (Giachini et al., 2009b; Nickkholgh et al., 2010). Um outro estudo, que quantificou o número de cópias do gene TSPY1 em mais de dois mil homens chineses com infertilidade, revelou que pacientes com menos de 21 ou mais de 55 cópias do gene tem uma baixa produção de esperma ou um elevado risco na falha da espermatogênese quando comparados com pacientes com 21-35 cópias (Ying Shen et al., 2013). Estes estudos mostram que a variação no número de cópias podem interferir na fertilidade do homem.

As CNVs dos pacientes cinco e nove se sobrepõem (Figura 24). Elas abrangem uma grande parte do cromossomo Y onde estão presentes genes relacionados com a infertilidade como o CDY1, BPY2, DAZ1, DAZ2, DAZ3. O paciente cinco apresentou cinco CNVs do tipo duplicação, somando as cinco o total duplicado seria de 3527 Mb, o paciente nove apresentou duas CNVs do tipo deleção, somando as duas CNVs o total da deleção seria de 3738 Mb.

O gene CDY1 é um gene que codifica uma proteína com um cromodomínio e um domínio catalítico de histonas acetil transferase, estas proteínas estão presentes no núcleo das espermatídes. Vários estudos que envolvem este gene o associam a falha na espermatogênese (Giachini et al., 2008; S E Kleiman et al., 2001; Sandra E Kleiman et al., 2003).

O BPY2 codifica uma proteína que interage com a proteína ubiquitina ligase E3A, estudos revelam que alterações no número de cópias deste gene podem estar envolvidas com a infertilidade masculina (Ahmadi Rastegar et al., 2015; Chianese, Gunning, Giachini, Daguin, Balercia, Ars, Giacco, Filatov, et al., 2014; C. Lu et al., 2014). Um estudo envolvendo vários genes da região AZF incluindo o BPY2 sugere que ele em conjunto com outros genes pode ser usado como um biomarcador para diferenciar pacientes com SCOS e MA (Ahmadi Rastegar et al., 2015).

Os genes DAZ2 e DAZ3 são membros da família DAZ, codificam uma proteína que se liga ao RNA expresso nas células germinativas. Assim como os outros dois genes citados, estudos envolvendo os genes desta família mostram seu envolvimento com a infertilidade masculina em casos de oligozoospermia, criptorchidismo, microdeleções do cromossomo Y (A, Yang, Zhang, & Lin, 2006; Ferlin et al., 2004; Y. Zhang et al., 2015).

Estes resultados nos mostram que assim como as deleções do cromossomo Y causam infertilidade a duplicação também pode estar envolvida com a infertilidade de pacientes que apresentam duplicações do cromossomo Y, na região AZF. As alterações cromossômicas, tanto deleções como duplicações, provavelmente alteram a expressão dos genes da região afetada e com isso os processos biológicos que eles atuam. Podemos destacar que tanto a deleção quanto a duplicação podem causar um fenótipo de infertilidade nos homens, mas nossos dados revelam que a deleção causa um transtorno maior a espermatogênese quando comparado a duplicação, uma vez que o paciente com deleção apresentou em sua biopsia diagnóstico de síndrome de células de Sertoli Only e o paciente com duplicação apresentou parada de maturação das células germinativas.

As CNVs classificadas como potencialmente patogênicas estavam presentes nos cromossomos autossômicos e X (Tabela 19). Foram consideradas como potencialmente patogênicas nove CNVs uma do tipo deleção e oito do tipo duplicação, estas CNVs estavam presentes apenas no grupo de estudo (MA e SCOS).

O Paciente quatro apresentou três CNVs que consideramos potencialmente patogênicas, elas estão presentes no cromossomo quatro e doze. A CNV do cromossomo quatro está localizada na região 4q13.2. Apesar de ter apresentado uma alta frequência no DGV, nós consideramos ela potencialmente patogênica porque um estudo de CNVs em pacientes com oligozoospermia e síndrome de Células de Sertoli Only identificou esta CNV como um fator de risco para oligozoospermia e síndrome de Sertoli Only (Tüttelmann et al., 2011). Nesta CNV está presente o gene UGT2B15 que é responsável pela excreção de testosterona na urina (Jakobsson et al., 2006; Juul et al., 2009) e também tem papel na regulação de estrógeno. O cromossomo 12 apresentou duas CNVs com localização genômica 12p11.21 e 12q24.21. A CNV 12p11.21 apresentou o gene DDX11 que está envolvido com a embriogênese, espermatogênese e crescimento celular. A CNV 12q24.21 apresentou o gene SLC2A14, que é expresso no testículo (Wu & Freeze, 2002a).

Os pacientes seis e nove apresentaram cada um duas CNVs no cromossomo X (Tabela 19) onde estão presente os genes SHOX e DHRSX. O Gene SHOX é um pseudogene localizado na região PAR1 do cromossomo X. Chianese et al. (2014) relatou a primeira CNV ligada ao X que está associada a falha na espermatogênese. Esta CNV apresenta vários genes incluído o SHOX. O Gene DHRSX também foi encontrado em CNVs de pacientes com infertilidade masculina (Chianese, Gunning, Giachini, Daguin, Balercia, Ars, Giacco, Filatov, et al., 2014).

Vinte e duas CNVs foram classificadas com significado clínico incerto. Estas CNVs apresentaram frequência no DGV menor que 1% e todos apresentaram genes. Vinte CNVs apresentaram genes descritos no OMIM, mas não foi possível determinar se os genes presentes nestas CNVs estavam de alguma forma ligados a infertilidade masculina. Por não conseguir ligar os genes destas CNVs a infertilidade masculina classificamos estas CNVs como significado clínico incerto.

7.3 Analise dos MICRORNAS

Vários estudos demonstram a importância dos miRNAs no controle pós-transcricional de vários processos de desenvolvimento celular incluindo a espermatogênese (Papaioannou & Nef, 2010; Yu, Raabe, & Hecht, 2005). Até o presente momento poucos estudos foram realizados em tecido testicular de homens inférteis com diferentes histopatologias (Abu-Halima et al., 2014; Muñoz, Mata, Bassas, & Larriba, 2015).

Estudos realizados em tecido testicular demonstram que a expressão dos miRNAs se alteram dependendo da fase da espermatogênese (Buchold et al., 2010; J. Guo et al., 2009; Yan et al., 2007, 2009) e a meiose tardia e as células germinativas haploides são a principal fonte de miRNAs durante a espermatogênese (Bouhallier et al., 2010; X. Guo et al., 2009; Ro, Park, Sanders, McCarrey, & Yan, 2007).

Os estudos realizados com miRNAs mostram claramente o desempenho destas moléculas no desenvolvimento e/ou regulação da espermatogênese e que a alteração na expressão dos miRNAs contribui para a falha na espermatogênese. Estes estudos também sugerem que estes miRNAs desregulados podem ser utilizados como biomarcadores para o diagnóstico da infertilidade masculina (Abu-Halima et al., 2013; Gillis et al., 2007; Lian et al., 2009; Wang et al., 2011).

Nossos dados mostram que os pacientes com SCOS apresentam um padrão de expressão de miRNAs em biopsia testicular de homens inférteis com diferentes padrões histopatológicos. Os resultados obtidos mostram que os pacientes com parada de maturação e síndrome de células de Sertoli Only, apresentam uma assinatura na expressão dos miRNAs diferente quando comparados ao controle. A condição SCOS versus Ctrl apresentou 82 miRNAs diferencialmente expressos quando comparado ao controle (196 miRNAs), indicando que uma maior modulação de miRNAs também apresenta efeito na severidade da doença. A condição MA apresentou 81 miRNAs diferencialmente expressos quando comparado ao controle. As duas condições também compartilharam miRNAs, ao todo foram 30 miRNAs diferencialmente expressos compartilhados entre as duas condições (Figura 24 e Tabela 21). Os resultados apontam então uma possível relação dos miRNAs na maturação das células germinativas, como já visto na literatura.

Um estudo realizado com amostras de tecido testicular de pacientes inférteis com Parada de Maturação e Síndrome de células de Sertoli Only também identificou um perfil transcricional diferente em cada condição e miRNAs compartilhados nas duas condições. Este estudo identificou duas famílias de miRNAs diferencialmente expressos, a família miR-

449 (miR-449a, miR-449b*) e família miR-34 family (miR-34b*, miR-34b, miR-34c-5p)(Abu-Halima et al., 2014). Estas duas famílias são preferencialmente expressas no testículo (Bao et al., 2012; Bouhallier et al., 2010; Landgraf et al., 2007; Luo et al., 2010; Ro et al., 2007).

Nosso estudo também identificou a presença destas duas famílias. Os pacientes com síndrome de Células de Sertoli Only e Parada de Maturação quando comparados com o controle apresentaram os miRNA destas famílias hipoeexpressos. Os miRNAs destas duas famílias citadas também foram relatados como hipoeexpressos em pacientes com oligozoospermia, astenozoospermia e oligoastenozoospermia (Abu-Halima et al., 2013; Wang et al., 2011).

Nossos dados mostram que os pacientes com SCOS apresentam um padrão de expressão de miRNAs mais alterado do que os pacientes com MA. Estes resultados podem refletir as diferenças na composição do tipo de células germinativas presente nos pacientes, uma vez que se sabe que os pacientes com SCOS apresentam ausência das células germinativas nos testículos. Um estudo realizado com homens inférteis com diferentes histopatologias testiculares também obteve como resultado assinaturas de miRNA diferentes em cada condição (Muñoz et al., 2015).

O padrão de assinatura de cada condição histopatológica pode ser responsável pelas diferenças observadas na expressão de miRNAs entre os grupos MA e SCOS em comparação com o controle. As diferentes assinaturas de miRNAs encontradas nos pacientes SCOS e MA podem vir a servir para diferenciar um paciente azoospérmico do outro. Uma vez que o paciente com azoospermia e Parada de Maturação apresentam um padrão de expressão de miRNAs diferente do padrão do paciente com azoospermia e Síndrome de Células de Sertoli Only. Já os miRNAs compartilhados entre as duas condições pode vir a ser utilizados para identificar pacientes azoospérmicos. Uma vez que a assinatura compartilhada destes miRNAs levam a azoospermia nos dois grupos. Estudos realizados com pacientes com SCOS e MA também identificaram padrões de expressão de miRNA diferentes entre as duas condições e miRNAs compartilhados assim como os nossos resultados (Abu-Halima et al., 2014). Estudos com miRNAs em pacientes inférteis revelam que eles podem ser um potencial biomarcador para o diagnóstico de infertilidade (Khazaie & Nasr Esfahani, 2014).

Muñoz et al., (2015) avaliou a expressão diferencial dos miRNAs em amostras de tecido testicular com diferentes histopatologias. O estudo revelou um padrão diferencial na expressão dos miRNAs nas diferentes amostras de tecido. Eles centraram o estudo na correlação do padrão

de expressão dos miRNAs com o número de células germinativas maduras combinando ao valor de expressão de três miRNAs (miR-449a, miR-34c-5p e miR-122) como um teste preditivo para identificar a presença de células germinativas maduras na biópsia testicular, uma vez que estes miRNAs apresentaram níveis de expressão diferentes em cada condição histopatológica. Os nossos resultados também mostram que miR-449a, miR-34c-5p e miR-122 também apresentaram valores diferentes na expressão destes miRNAs em nossos pacientes. Os pacientes com SCOS apresentaram um *fold change* mais baixo que os pacientes com MA. Estes resultados evidenciam que de acordo com o grau de maturação das células germinativas podemos ter uma expressão aumentada ou diminuída destes miRNAs.

As alterações dos miRNAs das famílias miR-449, miR-34 sugerem um papel importante na reprodução masculina (Abu-Halima et al., 2014). A Alta expressão das duas famílias em SCOS e MA é possivelmente devido a expressão semelhante miR-449, miR-34 durante o desenvolvimento testicular e na espermatogênese do adulto. Notadamente as duas famílias de miRNAs estão localizadas no mesmo tipo de células germinativas (espermátides e espermatócitos) (Bao et al., 2012; Bouhallier et al., 2010; X. Guo et al., 2009).

Buscando relacionar funcionalmente a modulação dos miRNAs estudados, fizemos uma busca baseada, em banco de dados, dos possíveis mRNAs alvos dos miRNAs mais diferencialmente expressos em cada condição e então realizamos o enriquecimento funcional destes mRNAs alvos, esta análise nos permitiu avaliar quais processos biológicos estariam mais alterados nas patologias do aparelho reprodutor masculino estudadas. As figuras 25 a 27 ilustram estes resultados, nas quais observamos que notavelmente a maioria dos processos enriquecidos estão relacionados à progressão do ciclo celular, em geral divisão e crescimento celular, e a expressão gênica, seja na fase de transcrição ou tradução. Tais processos são imprescindíveis na germinação e maturação dos espermatozoides e nossos resultados mostram que a modulação dos miRNAs leva a desregulação dos mesmos, visto que a expressão anormal destes miRNAs reflete no controle pós transcricional de seus mRNAs alvos, os quais podem ter um impacto significativo na infertilidade masculina, como visto nos estudos de Abu-Halima et al. (2014).

As expressões de miR-449a e miR-449b são reguladas pelo fator de transcrição E2F 1 (E2F1), que promove a progressão do ciclo celular e induz a apoptose em células danificadas. A hiperexpressão de E2F1 leva ao aumento da apoptose de espermatócitos (Holmberg, Helin, Sehested, & Karlström, 1998; Marcet et al., 2011). A ausência do fator E2F1 provoca a

redução da proliferação das espermatogonias levando a atrofia testicular (60). Os miR-449a e miR-449b promovem a apoptose de uma maneira independente de p53 em linhagens celulares tumorais (Bou Kheir et al., 2011; Mciver, Roman, Nixon, & McLaughlin, 2012; Yang et al., 2009), a desregulação destes miRNAs observados em pacientes com deficiência da espermatogénese pode ter contribuído para o aumento da apoptose no tecido gonadal (Lian et al., 2009; Novotny et al., 2007; Voorhoeve et al., 2006).

Contudo, o efeito exato da alteração da expressão destes miRNAs encontrado neste trabalho será melhor elucidado posteriormente, quando cruzarmos os dados de expressão dos miRNAs e dos mRNAs destas mesmas amostras.

Ainda em relação à anotação funcional dos miRNAs diferencialmente expressos, encontramos, através do banco de dados HMDD v2, miRNAs associados à patologias do aparelho reprodutor masculino (Tabela 22).

Um estudo realizado em pacientes com azoospermia obstrutiva identificou o cluster miR-371, 2 e 3 hipoexpressos nestes pacientes. O estudo sugere que o miRNA-372 e miR-373 pode contribuir para o aumento da apoptose nos testículos destes pacientes, uma vez que sabe-se que estes miRNAs pode regular negativamente genes de apoptose, tendo um papel na inibição desse processo (Lian et al., 2009). Um dos processos biológicos enriquecido foi a apoptose, corroborando com os achados da literatura.

O levantamento feito no banco de dados HMDD v2 revelou que 13 miRNAs diferencialmente expressos em nossos pacientes também foram encontrados em estudos envolvendo câncer de próstata e testículo. Um estudo sugere que a infertilidade masculina pode ser um fator de risco para o desenvolvimento de câncer de Próstata (Fábio Escórcio Almeida, Severino Ribeiro, & Avelino Fraga, 2012).

O miR-125b foi diferencialmente expresso em células dependentes de andrógenos e células de câncer de próstata sugerindo que este miRNA atua como um oncogênese que contribui para a patogenicidade do câncer de próstata (Shi et al., 2007).

O estudo realizado com células de câncer de próstata mostrou que o cluster miR-99a, let-7c, miR-125b-2 estão envolvidos na regulação de genes induzidos por andrógenos. Este estudo validou nove mRNA alvos regulados negativamente por este cluster (D. Sun et al., 2014). Tanto o miRNA-125b e miRNA-99a, foram hipoexpressos na condição SCOS.

A condição SCOS apresentou miRNAs envolvidos com azoospermia, câncer de próstata e câncer de testículo, a condição MA apresentou miRNAs envolvidos apenas com

azoospermia e câncer de testículo. Estes resultados mostram a representatividade maior de miRNAs associados à doenças do aparelho reprodutor masculino no grupo de miRNAs diferencialmente expressos em SCOS.

Conclusões

8. Conclusões

A utilização da técnica de MLPA na análise de deleções ou duplicações do cromossomo Y na região AZF mostrou-se satisfatória, uma vez que o resultado obtido na análise foi confirmado pela técnica de CytoScan.

Duplicações na região AZF podem levar a azoospermia assim como a deleções da mesma região.

A falha na espermatogênese em pacientes com duplicação leva uma condição menos severa quando comparada com o paciente com deleção.

Alterações genômicas em alguns cromossomos autossômicos e no cromossomo X pode ter uma ligação com a falha na espermatogênese assim como alterações no cromossomo Y.

Os miRNAs identificados são susceptíveis de desempenhar um papel no desenvolvimento e / ou regulação da espermatogênese e alterações de sua expressão poderia contribuir direta ou indiretamente para anomalias de reprodução.

A expressão de miRNA nos pacientes com Parada de maturação de Células Germinativas e Síndrome de Células de Sertoli Only mostrou uma maior hipoeexpressão dos miRNAs do que hiperexpressão.

Uma maior desregulação na expressão dos miRNAs tem efeito mais severo na espermatogênese, uma vez que pacientes com SCOS tem uma expressão mais desregulada que e um epitélio germinativo mais alterado quando comparados com os paciente com MA

Alguns miRNAs encontrados neste estudo também foram descritos na literatura associados com azoospermia e neoplasias do aparelho germinativo o que ressalta a importância dos mesmos como possíveis biomarcadores para futuros exames moleculares menos invasivos em pacientes com infertilidade masculina.

Referências Bibliográficas

9. Referências Bibliográficas

- A, Z.-C., Yang, Y., Zhang, S.-Z., & Lin, L. (2006). Study on DAZ gene copy deletion in severe oligozoospermia sperm donor for ICSI. *Yi Chuan = Hereditas*, 28(9), 1057–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16963411>
- Abu-Halima, M., Backes, C., Leidinger, P., Keller, A., Lubbad, A. M., Hammadeh, M., & Meese, E. (2014). MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. *Fertility and Sterility*, 101, 78–86.e2. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.09.009>
- Abu-Halima, M., Hammadeh, M., Schmitt, J., Leidinger, P., Keller, A., Meese, E., & Backes, C. (2013). Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. *Fertility and Sterility*, 99(5), 1249–1255.e16. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.054>
- Ahmadi Rastegar, D., Sharifi Tabar, M., Alikhani, M., Parsamatin, P., Sahraneshin Samani, F., Sabbaghian, M., ... Salekdeh, G. H. (2015). Isoform-Level Gene Expression Profiles of Human Y Chromosome Azoospermia Factor Genes and Their X Chromosome Paralogues in the Testicular Tissue of Non-Obstructive Azoospermia Patients. *Journal of Proteome Research*, 14(9), 3595–605. <http://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00520>
- Aoki, V. W., & Carrell, D. T. (2003). Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian Journal of Andrology*, 5(4), 315–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14695982>
- Athalye, A. S., Madon, P. F., Naik, N. J., Naik, D. J., Gavas, S. S., Dhumal, S. B., ... Parikh, F. R. (2004). A Study of Y Chromosome Microdeletions in Infertile Indian Males. *Int J Hum Genet*, 4(3), 179–185.
- Baarends, W. M., van der Laan, R., & Grootegoed, J. A. (2000). Specific aspects of the ubiquitin system in spermatogenesis. *Journal of Endocrinological Investigation*, 23(9), 597–604. <http://doi.org/10.1007/BF03343782>
- Bao, J., Li, D., Wang, L., Wu, J., Hu, Y., Wang, Z., ... Xu, C. (2012). MicroRNA-449 and microRNA-34b/c function redundantly in murine testes by targeting E2F transcription factor-retinoblastoma protein (E2F-pRb) pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(26), 21686–98. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.328054>
- Blanco, P., Shlumukova, M., Sargent, C. A., Jobling, M. A., Avara, N., & Hurles, M. E. (2000).

Divergent outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism.

- Bochukova, E. G., Huang, N., Keogh, J., Henning, E., Purmann, C., Blaszczyk, K., ... Farooqi, I. S. (2010). Large, rare chromosomal deletions associated with severe early-onset obesity. *Nature*, 463(7281), 666–70. <http://doi.org/10.1038/nature08689>
- Bosch, E., & Jobling, M. A. (2003). Duplications of the AZFa region of the human Y chromosome are mediated by homologous recombination between HERVs and are compatible with male fertility. *Human Molecular Genetics*, 12(3), 341–347. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddg031>
- Bou Kheir, T., Futoma-Kazmierczak, E., Jacobsen, A., Krogh, A., Bardram, L., Hother, C., ... Friis-Hansen, L. (2011). miR-449 inhibits cell proliferation and is down-regulated in gastric cancer. *Molecular Cancer*, 10, 29. <http://doi.org/10.1186/1476-4598-10-29>
- Bouhallier, F., Allioli, N., Lavial, F., Chalmel, F., Perrard, M. H., Durand, P., ... Rouault, J. P. (2010). Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. *Rna*, 16(4), 720–731. <http://doi.org/10.1261/rna.1963810>
- Brown, G. M., Furlong, R. A., Sargent, C. A., Erickson, R. P., Longepied, G., Mitchell, M., ... Affara, N. A. (1998). Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the Sxrb interval of the mouse Y chromosome of the Dffry gene. *Human Molecular Genetics*, 7(1), 97–107. <http://doi.org/10.1093/hmg/7.1.97>
- Buchold, G. M., Coarfa, C., Kim, J., Milosavljevic, A., Gunaratne, P. H., & Matzuk, M. M. (2010). Analysis of MicroRNA Expression in the Prepubertal Testis. *PLoS ONE*, 5(12), e15317. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0015317>
- Bushnik, T., Cook, J. L., Yuzpe, A. A., Tough, S., & Collins, J. (2012). Estimating the prevalence of infertility in Canada. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 27(3), 738–46. <http://doi.org/10.1093/humrep/der465>
- Cappallo-Obermann, H., Von, K., Bullet, K., Schulze, W., & Spiess, A.-N. (2010). A biopsy sample reduction approach to identify significant alterations of the testicular transcriptome in the presence of Y-chromosomal microdeletions that are independent of germ cell composition.
- Caron, C., Pivot-Pajot, C., van Grunsven, L. A., Col, E., Lestrat, C., Rousseaux, S., & Khochbin, S. (2003). Cdy1: a new transcriptional co-repressor. *EMBO Reports*, 4(9), 877–82. <http://doi.org/10.1038/sj.embor.embor917>

- Carrara, R. C. V., Orellana, M. D., Fontes, A. M., Palma, P. V. B., Kashima, S., Mendes, M. R., ... Covas, D. T. (2007). Mesenchymal stem cells from patients with chronic myeloid leukemia do not express BCR-ABL and have absence of chimerism after allogeneic bone marrow transplant. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(1), 57–67. <http://doi.org/10.1590/S0100-879X2006005000055>
- Chandley, A. C., & Edmond, P. (1971). Meiotic studies on a subfertile patient with a ring Y chromosome. *Cytogenetics*, 10(4), 295–304. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5127018>
- Chianese, C., Gunning, A. C., Giachini, C., Daguin, F., Balercia, G., Ars, E., ... Filatov, D. (2014). X Chromosome-Linked CNVs in Male Infertility: Discovery of Overall Duplication Load and Recurrent, Patient-Specific Gains with Potential Clinical Relevance. *PLoS ONE*, 9(6), e97746. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0097746>
- Chianese, C., Gunning, A. C., Giachini, C., Daguin, F., Balercia, G., Ars, E., ... Krausz, C. (2014). X Chromosome-Linked CNVs in Male Infertility: Discovery of Overall Duplication Load and Recurrent, Patient-Specific Gains with Potential Clinical Relevance. *PLoS ONE*, 9(6), e97746. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0097746>
- Collier, B., Gorgoni, B., Loveridge, C., Cooke, H. J., & Gray, N. K. (2005). The DAZL family proteins are PABP-binding proteins that regulate translation in germ cells. *The EMBO Journal*, 24(14), 2656–66. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600738>
- Conrad, D. F., Pinto, D., Redon, R., Feuk, L., Gokcumen, O., Zhang, Y., ... Hurles, M. E. (2010). Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*, 464(7289), 704–712. <http://doi.org/10.1038/nature08516>
- Croce, C. M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature Reviews. Genetics*, 10(10), 704–14. <http://doi.org/10.1038/nrg2634>
- Dada, R., Gupta, N. P., & Kucheria, K. (2004). Yq microdeletions--azoospermia factor candidate genes and spermatogenic arrest. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, 15(3), 176–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15331583>
- Diskin, S. J., Hou, C., Glessner, J. T., Attiyeh, E. F., Laudenslager, M., Bosse, K., ... Maris, J. M. (2009). Copy number variation at 1q21.1 associated with neuroblastoma. *Nature*, 459(7249), 987–991. <http://doi.org/10.1038/nature08035>
- Ditton, H. J., Zimmer, J., Kamp, C., Meyts, E. R.-D., & Vogt, P. H. (2004). The AZFa gene DBY (DDX3Y) is widely transcribed but the protein is limited to the male germ cells by translation control. *Human Molecular Genetics*, 13(19), 2333–2341.

<http://doi.org/10.1093/hmg/ddh240>

- Dong, Y., Pan, Y., Wang, R., Zhang, Z., Xi, Q., & Liu, R. (2015a). Copy number variations in spermatogenic failure patients with chromosomal abnormalities and unexplained azoospermia. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 16041–16049. <http://doi.org/10.4238/2015.December.7.17>
- Dong, Y., Pan, Y., Wang, R., Zhang, Z., Xi, Q., & Liu, R.-Z. (2015b). Copy number variations in spermatogenic failure patients with chromosomal abnormalities and unexplained azoospermia. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 16041–16049. <http://doi.org/10.4238/2015.December.7.17>
- Dorus, S., Gilbert, S. L., Forster, M. L., Barndt, R. J., & Lahn, B. T. (2003). The CDY-related gene family: coordinated evolution in copy number, expression profile and protein sequence. *Human Molecular Genetics*, 12(14), 1643–1650. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddg185>
- Duty, S. M., Silva, M. J., Barr, D. B., Brock, J. W., Ryan, L., Chen, Z., ... Hauser, R. (2003). Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 14(3), 269–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12859026>
- Eggers, S., Deboer, K. D., Van Den Bergen, J., Gordon, L., White, S. J., Jamsai, D., ... O'bryan, M. K. (2015). Copy number variation associated with meiotic arrest in idiopathic male infertility. *Fertility and Sterility*, 103, 214–219. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.09.030>
- Fábio Escórcio Almeida, Severino Ribeiro, & Avelino Fraga. (2012). Artigos de Revisão. *Acta Urológica*, 2, 52–57. Retrieved from <http://www.apurologia.pt/acta/2-2012/inf-masc-poss-fact-risc.pdf>
- Ferlin, A., Arredi, B., Speltra, E., Cazzadore, C., Selice, R., Garolla, A., ... Foresta, C. (2007). Molecular and Clinical Characterization of Y Chromosome Microdeletions in Infertile Men: A 10-Year Experience in Italy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(3), 762–770. <http://doi.org/10.1210/jc.2006-1981>
- Ferlin, A., Bettella, A., Tessari, A., Salata, E., Dallapiccola, B., & Foresta, C. (2004). Analysis of the DAZ gene family in cryptorchidism and idiopathic male infertility. *Fertility and Sterility*, 81(4), 1013–8. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.08.053>

- Finnegan, E. F., Pasquinelli, A. E. (2013) MicroRNA biogenesis: regulating the regulators. *Critical Reviews Biochemistry Molecular Biology* 48, 51-68.
- Gatta, V., Raicu, F., Ferlin, A., Antonucci, I., Scioletti, A. P., Garolla, A., ... Stuppia, L. (2010). Testis transcriptome analysis in male infertility: new insight on the pathogenesis of oligo-azoospermia in cases with and without AZFc microdeletion. *BMC Genomics*, 11, 401. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-11-401>
- Giachini, C., Laface, I., Guarducci, E., Balercia, G., Forti, G., & Krausz, C. (2008). Partial AZFc deletions and duplications: clinical correlates in the Italian population. *Human Genetics*, 124(4), 399–410. <http://doi.org/10.1007/s00439-008-0561-1>
- Giachini, C., Nuti, F., Turner, D. J., Laface, I., Xue, Y., Daguin, F., ... Krausz, C. (2009a). TSPY1 copy number variation influences spermatogenesis and shows differences among Y lineages. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(10), 4016–4022. <http://doi.org/10.1210/jc.2009-1029>
- Giachini, C., Nuti, F., Turner, D. J., Laface, I., Xue, Y., Daguin, F., ... Krausz, C. (2009b). TSPY1 Copy Number Variation Influences Spermatogenesis and Shows Differences among Y Lineages. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(10), 4016–4022. <http://doi.org/10.1210/jc.2009-1029>
- Gillis, A. J. M., Stoop, H. J., Hersmus, R., Oosterhuis, J. W., Sun, Y., Chen, C., ... Looijenga, L. H. J. (2007). High-throughput microRNAome analysis in human germ cell tumours. *The Journal of Pathology*, 213(3), 319–28. <http://doi.org/10.1002/path.2230>
- Grayson, B. L., Smith, M. E., Thomas, J. W., Wang, L., Dexheimer, P., Jeffrey, J., ... Aune, T. M. (2010). Genome-wide analysis of copy number variation in type 1 diabetes. *PloS One*, 5(11), e15393. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0015393>
- Guo, J., Miao, Y., Xiao, B., Huan, R., Jiang, Z., Meng, D., & Wang, Y. (2009). Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24(4), 652–657. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05666.x>
- Guo, X., Su, B., Zhou, Z., Sha, J., Liu, J., Lewis, B., ... Lempicki, R. (2009). Rapid evolution of mammalian X-linked testis microRNAs. *BMC Genomics*, 10(1), 97. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-10-97>
- Hall, N. M., Brown, G. M., Furlong, R. A., Sargent, C. A., Mitchell, M., Rocha, D., & Affara, N. A. (2003). Usp9y (ubiquitin-specific protease 9 gene on the Y) is associated with a functional promoter and encodes an intact open reading frame homologous to Usp9x

- that is under selective constraint. *Mammalian Genome*, 14(7), 437–447. <http://doi.org/10.1007/s00335-002-3068-4>
- Hansen, S., Eichler, E. E., Fullerton, S. M., & Carrell, D. (2010). SPANX gene variation in fertile and infertile males. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 55, 18–26. <http://doi.org/10.3109/19396360903312015>
- Hellani, A., Al-Hassan, S., Iqbal, M. A., & Coskun, S. (2006). Y chromosome microdeletions in infertile men with idiopathic oligo- or azoospermia. *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction*, 3, 1. <http://doi.org/10.1186/1743-1050-3-1>
- Henrichsen, C. N., Vinckenbosch, N., Zöllner, S., Chaignat, E., Pradervand, S., Schütz, F., ... Reymond, A. (2009). Segmental copy number variation shapes tissue transcriptomes. *Nature Genetics*, 41(4), 424–9. <http://doi.org/10.1038/ng.345>
- Holmberg, C., Helin, K., Sehested, M., & Karlström, O. (1998). E2F-1-Induced p53-independent apoptosis in transgenic mice. *Oncogene*, 17(2), 143–155. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1201915>
- Hopps, C. V., Mielnik, A., Goldstein, M., Palermo, G. D., Rosenwaks, Z., & Schlegel, P. N. (2003). Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Human Reproduction*, 18(8), 1660–1665. <http://doi.org/10.1093/humrep/deg348>
- lafrate, A. J. et al. (2004). Detection of large-scale variation in the human genome. *Nature genetics*, 36(9), 949-95.
- Ikeda, M., Aleksic, B., Kirov, G., Kinoshita, Y., Yamanouchi, Y., Kitajima, T., ... Iwata, N. (2010). Copy number variation in schizophrenia in the Japanese population. *Biological Psychiatry*, 67(3), 283–6. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.08.034>
- Ingelman-Sundberg, M., Sim, S. C., Gomez, A., & Rodriguez-Antona, C. (2007). Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeigenetic and clinical aspects. *Pharmacology & Therapeutics*, 116(3), 496–526. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.09.004>
- Jacob, K., Albrecht, S., Sollier, C., Faury, D., Sader, E., Montpetit, A., ... Jabado, N. (2009). Duplication of 7q34 is specific to juvenile pilocytic astrocytomas and a hallmark of cerebellar and optic pathway tumours. *British Journal of Cancer*, 101(4), 722–33. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605179>

- Jakobsson, J., Ekström, L., Inotsume, N., Garle, M., Lorentzon, M., Ohlsson, C., ... Rane, A. (2006). Large differences in testosterone excretion in Korean and Swedish men are strongly associated with a UDP-glucuronosyl transferase 2B17 polymorphism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(2), 687–93. <http://doi.org/10.1210/jc.2005-1643>
- Juul, A., Sørensen, K., Aksglaede, L., Garn, I., Rajpert-De Meyts, E., Hullstein, I., ... Ottesen, A. M. (2009). A Common Deletion in the Uridine Diphosphate Glucuronyltransferase (UGT) 2B17 Gene Is a Strong Determinant of Androgen Excretion in Healthy Pubertal Boys. <http://doi.org/10.1210/jc.2008-1984>
- Kamali, M., Baghestani, A. R., Kashfi, F., Kashani, H., Tavajohi, S., & Amirchaghmaghi, E. (2007). A Survey on Infertility in Royan Institute, 2, 6.
- Kee, K., Angeles, V. T., Flores, M., Nguyen, H. N., & Reijo Pera, R. A. (2009). Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature*, 462(7270), 222–5. <http://doi.org/10.1038/nature08562>
- Khazaie, Y., & Nasr Esfahani, M. H. (2014). MicroRNA and male infertility: A potential for diagnosis. *International Journal of Fertility and Sterility*, 8(2), 113–118.
- Khvorova, A., Reynolds, A., Jayasena, S. D. (2003) Functional siRNAs and miRNAs exhibit strand bias. *Cell* 115(2),209-216. [http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674\(03\)00801-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0092-8674(03)00801-8)
- Kleiman, S. E., Lagziel, A., Yogev, L., Botchan, A., Paz, G., & Yavetz, H. (2001). Expression of CDY1 may identify complete spermatogenesis. *Fertility and Sterility*, 75(1), 166–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163833>
- Kleiman, S. E., Yogev, L., Hauser, R., Botchan, A., Bar-Shira Maymon, B., Schreiber, L., ... Yavetz, H. (2003). Members of the CDY family have different expression patterns: CDY1 transcripts have the best correlation with complete spermatogenesis. *Human Genetics*, 113(6), 486–92. <http://doi.org/10.1007/s00439-003-0990-9>
- Kondrashov, A. S. (2003). Direct estimates of human per nucleotide mutation rates at 20 loci causing Mendelian diseases. *Human Mutation*, 21(1), 12–27. <http://doi.org/10.1002/humu.10147>
- Krausz, C. (2010). Genetic Testing of Male Infertility. In *Reproductive Endocrinology and Infertility* (pp. 431–444). New York, NY: Springer New York. http://doi.org/10.1007/978-1-4419-1436-1_27

- Krausz, C. (2011). Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(2), 271–85. <http://doi.org/10.1016/j.beem.2010.08.006>
- Krausz, C., Quintana-Murci, L., & McElreavey, K. (2000). Prognostic value of Y deletion analysis: What is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Human Reproduction*, 15(7), 1431–1434. <http://doi.org/10.1093/humrep/15.7.1431>
- Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Brown, L. G., Minx, P. J., Cordum, H. S., Waterston, R. H., ... Page, D. C. (2001). The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nature Genetics*, 29(3), 279–286. <http://doi.org/10.1038/ng757>
- Lahn, B. T., Page, D. C., Cooke, H. J., Brown, W. R., Rappold, G. A., Helms, C., ... Hendriks, W. (1997). Functional coherence of the human Y chromosome. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5338), 675–80. <http://doi.org/10.1126/science.278.5338.675>
- Lahn, B. T., Tang, Z. L., Zhou, J., Barndt, R. J., Parvinen, M., Allis, C. D., & Page, D. C. (2002). Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(13), 8707–12. <http://doi.org/10.1073/pnas.082248899>
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., ... Tuschl, T. (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, 129(7), 1401–14. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.040>
- Ledig, S., Röpke, A., & Wieacker, P. (2010). Copy number variants in premature ovarian failure and ovarian dysgenesis. *Sexual Development: Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation*, 4(4–5), 225–32. <http://doi.org/10.1159/000314958>
- Ledig, S., Schippert, C., Strick, R., Beckmann, M. W., Oppelt, P. G., & Wieacker, P. (2011). Recurrent aberrations identified by array-CGH in patients with Mayer-Rokitansky-K € uster-Hauser syndrome. *Fertility and Sterility*, 95, 1589–1594. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.07.1062>
- Lee, K. H., Lee, S., Kim, B., Chang, S., Kim, S. W., Paick, J.-S., & Rhee, K. (2006). Dazl can bind to dynein motor complex and may play a role in transport of specific mRNAs. *The EMBO Journal*, 25(18), 4263–70. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601304>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–54.

Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8252621>

- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., Ambros, V., Ahringer, J., Kimble, J., Ahringer, J., ... Zuker, M. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854. [http://doi.org/10.1016/0092-8674\(93\)90529-Y](http://doi.org/10.1016/0092-8674(93)90529-Y)
- Leke, R. J., Oduma, J. A., Bassol-Mayagoitia, S., Bacha, A. M., & Grigor, K. M. (1993). Regional and geographical variations in infertility: effects of environmental, cultural, and socioeconomic factors. *Environmental Health Perspectives*, (Suppl 2), 73–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8243409>
- Lewis, R. (2004). *Genética Humana - Conceitos e Aplicações*. Guanabara Koogan, 5th ed.
- Lian, J., Zhang, X., Tian, H., Liang, N., Wang, Y., Liang, C., ... Sun, F. (2009). Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 7(1), 13. <http://doi.org/10.1186/1477-7827-7-13>
- Lo Giacco, D., Chianese, C., Ars, E., Ruiz-Castañé, E., Forti, G., & Krausz, C. (2014). Recurrent X chromosome-linked deletions: discovery of new genetic factors in male infertility. *Journal of Medical Genetics*, 51(5), 340–4. <http://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101988>
- Lu, C., Jiang, J., Zhang, R., Wang, Y., Xu, M., Qin, Y., ... Wang, X. (2014). Gene copy number alterations in the azoospermia-associated AZFc region and their effect on spermatogenic impairment. *Molecular Human Reproduction*, 20(9), 836–843. <http://doi.org/10.1093/molehr/gau043>
- Lu, C., Jiang, J., Zhang, R., Wang, Y., Xu, M., Qin, Y., ... Wang, X. (2014). Gene copy number alterations in the azoospermia-associated AZFc region and their effect on spermatogenic impairment. *Molecular Human Reproduction*, 20(9), 836–43. <http://doi.org/10.1093/molehr/gau043>
- Luo, L., Ye, L., Liu, G., Shao, G., Zheng, R., Ren, Z., ... Li, F. (2010). Microarray-based approach identifies differentially expressed microRNAs in porcine sexually immature and mature testes. *PloS One*, 5(8), e11744. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0011744>
- Lupski, J. R. (2007). Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nature Genetics*, 39(7s), S43–S47. <http://doi.org/10.1038/ng2084>
- Machev, N., Saut, N., Longepied, G., Terriou, P., Navarro, A., Levy, N., ... Mitchell, M. J.

- (2004). Sequence family variant loss from the AZFc interval of the human Y chromosome, but not gene copy loss, is strongly associated with male infertility. *Journal of Medical Genetics*, 41(11), 814–25. <http://doi.org/10.1136/jmg.2004.022111>
- Marcet, B., Chevalier, B., Luxardi, G., Coraux, C., Zaragosi, L.-E., Cibois, M., ... Barbry, P. (2011). Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nature Cell Biology*, 13(6), 694–701. <http://doi.org/10.1038/ncb2241>
- Mciver, S. C., Roman, S. D., Nixon, B., & McLaughlin, E. A. (2012). miRNA and mammalian male germ cells. *Human Reproduction Update*, 18(1), 44–59. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmr041>
- McLachlan, R. I., Mallidis, C., Ma, K., Bhasin, S., & de Kretser, D. M. (1998). Genetic disorders and spermatogenesis. *Reproduction, Fertility, and Development*, 10(1), 97–104. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9727599>
- Mortimer, D. (1994). *Practical laboratory andrology*. New York.
- Muñoz, X., Mata, A., Bassas, L., & Larriba, S. (2015). Altered miRNA Signature of Developing Germ-cells in Infertile Patients Relates to the Severity of Spermatogenic Failure and Persists in Spermatozoa. *Nature Publishing Group*. <http://doi.org/10.1038/srep17991>
- Nachman, M. W., & Crowell, S. L. (2000). Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. *Genetics*, 156(1), 297–304. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10978293>
- Navarro-Costa, P., Gonçalves, J., & Plancha, C. E. (2010). The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility. *Human Reproduction Update*, 16(5), 525–42. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmq005>
- Navarro-Costa, P., Plancha, C. E., & Gonçalves, J. (2010). Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility? *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 936569. <http://doi.org/10.1155/2010/936569>
- Nickkholgh, B., Noordam, M. J., Hovingh, S. E., van Pelt, A. M. M., van der Veen, F., Repping, S., ... al., et. (2010). Y chromosome TSPY copy numbers and semen quality. *Fertility and Sterility*, 94(5), 1744–1747. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.09.051>
- Novotny, G. W., Sonne, S. B., Nielsen, J. E., Jonstrup, S. P., Hansen, M. A., Skakkebaek, N. E., ... Leffers, H. (2007). Translational repression of E2F1 mRNA in carcinoma in situ and

- normal testis correlates with expression of the miR-17-92 cluster. *Cell Death and Differentiation*, 14(4), 879–882. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402090>
- O’Roak, B. J., Vives, L., Girirajan, S., Karakoc, E., Krumm, N., Coe, B. P., ... Eichler, E. E. (2012). Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*, 485(7397), 246–50. <http://doi.org/10.1038/nature10989>
- Papaioannou, M. D., & Nef, S. (2010). microRNAs in the testis: building up male fertility. *Journal of Andrology*, 31(1), 26–33. <http://doi.org/10.2164/jandrol.109.008128>
- Perry, G. H., Dominy, N. J., Claw, K. G., Lee, A. S., Fiegler, H., Redon, R., ... Stone, A. C. (2007). Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nature Genetics*, 39(10), 1256–60. <http://doi.org/10.1038/ng2123>
- Quintana-Murci, L., & Fellous, M. (2001). The human Y chromosome: the biological role of a “functional wasteland”. *Journal of Biomedicine and Biotechnology @BULLET*, 1(1), 18–24. Retrieved from <http://jbb.hindawi.com>
- Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K. R., Feuk, L., Perry, G. H., Andrews, T. D., ... Hurles, M. E. (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444(7118), 444–454. <http://doi.org/10.1038/nature05329>
- Repping, S., Skaletsky, H., Brown, L., van Daalen, S. K. M., Korver, C. M., Pyntikova, T., ... Rozen, S. (2003). Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nature Genetics*, 35(3), 247–51. <http://doi.org/10.1038/ng1250>
- Repping, S., Skaletsky, H., Lange, J., Silber, S., Van Der Veen, F., Oates, R. D., ... Rozen, S. (2002). Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *American Journal of Human Genetics*, 71(4), 906–22. <http://doi.org/10.1086/342928>
- Reynolds, N., & Cooke, H. J. (2005). Role of the DAZ genes in male fertility. *Reproductive Biomedicine Online*, 10(1), 72–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15705297>
- Ro, S., Park, C., Sanders, K. M., McCarrey, J. R., & Yan, W. (2007). Cloning and expression profiling of testis-expressed microRNAs. *Developmental Biology*, 311(2), 592–602. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.009>
- Rocak, S., & Linder, P. (2004). DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism.

- Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(3), 232–241. <http://doi.org/10.1038/nrm1335>
- Rowe, P. J., & World Health Organization. (2000a). *WHO manual for the standardized investigation, diagnosis, and management of the infertile male*. Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press.
- Rowe, P. J., & World Health Organization. (2000b). *WHO manual for the standardized investigation, diagnosis, and management of the infertile male*. Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press.
- Rucker, G. B., Mielnik, A., King, P., Goldstein, M., & Schlegel, P. N. (1998). Preoperative screening for genetic abnormalities in men with nonobstructive azoospermia before testicular sperm extraction. *The Journal of Urology*, 160(6 Pt 1), 2068–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9817325>
- Sanyal, A., Lajoie, B. R., Jain, G., & Dekker, J. (2012). The long-range interaction landscape of gene promoters. *Nature*, 489. <http://doi.org/10.1038/nature11279>
- Sebat, J. et al. (2004). Large-scale copy number polymorphism in the human genome. *Science*, 305(5683), 525–8.
- Sebat, J. (2007). Major changes in our DNA lead to major changes in our thinking. *Nature Genetics*, 39(7s), S3–S5. <http://doi.org/10.1038/ng2095>
- Sharpe, R. M. (2004). How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *BMJ*, 328(7437), 447–451. <http://doi.org/10.1136/bmj.328.7437.447>
- Shen, Y., Yan, Y., Liu, Y., Zhang, S., Yang, D., Zhang, P., ... Yang, Y. (2013). A significant effect of the TSPY1 copy number on spermatogenesis efficiency and the phenotypic expression of the gr/gr deletion. *Human Molecular Genetics*, 22(8), 1679–1695. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddt004>
- Shen, Y., Yan, Y., Liu, Y., Zhang, S., Yang, D., Zhang, P., ... Yang, Y. (2013). A significant effect of the TSPY1 copy number on spermatogenesis efficiency and the phenotypic expression of the gr/gr deletion. *Human Molecular Genetics*, 22(8), 1679–1695. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddt004>
- Shi, X.-B., Xue, L., Yang, J., Ma, A.-H., Zhao, J., Xu, M., ... deVere White, R. W. (2007). An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America*, 104(50), 19983–8. <http://doi.org/10.1073/pnas.0706641104>
- Simoni, M., Tüttelmann, F., Gromoll, J., & Nieschlag, E. (2008). Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Münster experience. *Reproductive Biomedicine Online*, 16(2), 289–303. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18284889>
- Stefansson, H., Rujescu, D., Cichon, S., Pietiläinen, O. P. H., Ingason, A., Steinberg, S., ... Myin-Germeys, I. (2008). Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature*, 455(7210), 232–236. <http://doi.org/10.1038/nature07229>
- Stouffs, K., Lissens, W., Landuyt, L. Van, Tournaye, H., Steirteghem, A. Van, & Liebaers, I. (2001). Characterization of the genomic organization, localization and expression of four PRY genes (PRY1, PRY2, PRY3 and PRY4). *Molecular Human Reproduction*, 7(7), 603–610. <http://doi.org/10.1093/molehr/7.7.603>
- Stouffs, K., Lissens, W., Verheyen, G., Landuyt, L. Van, Goossens, A., Tournaye, H., ... Liebaers, I. (2004). Expression pattern of the Y-linked PRY gene suggests a function in apoptosis but not in spermatogenesis. *Molecular Human Reproduction*, 10(1), 15–21. <http://doi.org/10.1093/molehr/gah010>
- Stouffs, K., Vandermaelen, D., Massart, A., Menten, B., Vergult, S., Tournaye, H., & Lissens, W. (2012a). Array comparative genomic hybridization in male infertility. *Human Reproduction*, 27(3), 921–929. <http://doi.org/10.1093/humrep/der440>
- Stouffs, K., Vandermaelen, D., Massart, A., Menten, B., Vergult, S., Tournaye, H., & Lissens, W. (2012b). Array comparative genomic hybridization in male infertility. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 27(3), 921–9. <http://doi.org/10.1093/humrep/der440>
- Stranger, B. E., Forrest, M. S., Dunning, M., Ingle, C. E., Beazley, C., Thorne, N., ... Dermitzakis, E. T. (2007). Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5813), 848–53. <http://doi.org/10.1126/science.1136678>
- Suganthi, R., Vijesh, V. V., Vandana, N., & Fathima Ali Benazir, J. (2014). Y chorosomal microdeletion screening in the workup of male infertility and its current status in India. *International Journal of Fertility & Sterility*, 7(4), 253–66. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24520494>
- Sun, C., Skaletsky, H., Birren, B., Devon, K., Tang, Z., Silber, S., ... Page, D. C. (1999). An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y.

- Nature Genetics*, 23(4), 429–32. <http://doi.org/10.1038/70539>
- Sun, C., Skaletsky, H., Rozen, S., Gromoll, J., Nieschlag, E., Oates, R., & Page, D. C. (2000). Deletion of azoospermia factor a (AZFa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses. *Human Molecular Genetics*, 9(15), 2291–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11001932>
- Sun, D., Layer, R., Mueller, A. C., Cichewicz, M. A., Negishi, M., Paschal, B. M., & Dutta, A. (2014). Regulation of several androgen-induced genes through the repression of the miR-99a/let-7c/miR-125b-2 miRNA cluster in prostate cancer cells HHS Public Access. *Oncogene. March*, 13(3311), 1448–1457. <http://doi.org/10.1038/onc.2013.77>
- Tarabay, Y., Kieffer, E., Teletin, M., Celebi, C., Van Montfoort, A., Zamudio, N., ... Viville, S. (2013). The mammalian-specific Tex19.1 gene plays an essential role in spermatogenesis and placenta-supported development. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 28(8), 2201–14. <http://doi.org/10.1093/humrep/det129>
- Tiepolo, L., & Zuffardi, O. (1976). Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Human Genetics*, 34(2), 119–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1002136>
- Tüttelmann, F., Simoni, M., Kliesch, S., Ledig, S., Dworniczak, B., Wieacker, P., & Röpke, A. (2011). Copy Number Variants in Patients with Severe Oligozoospermia and Sertoli-Cell-Only Syndrome. *PLoS ONE*, 6(4), e19426. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0019426>
- Van Ommen, G.-J. B. (2005). Frequency of new copy number variation in humans. *Nature Genetics*, 37(4), 333–334. <http://doi.org/10.1038/ng0405-333>
- Vogt, P., Edelmann, A., Kirsch, S., Henegariu, O., Hirschmann, P., Kiesewetter, F., ... Haidl, G. (1996). Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Human Molecular Genetics*, 5(7), 933–943. <http://doi.org/10.1093/hmg/5.7.933>
- Vogt, P. H. (1998). Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Molecular Human Reproduction*, 4(8), 739–744. <http://doi.org/10.1093/molehr/4.8.739>
- Vogt, P. H., Falcao, C. L., Hanstein, R., & Zimmer, J. (2008). The AZF proteins. *International Journal of Andrology*, 31(4), 383–394. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2008.00890.x>
- Vollrath, D., Foote, S., Hilton, A., Brown, L. G., Beer-Romero, P., Bogan, J. S., & Page, D. C.

- (1992). The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5079), 52–9. <http://doi.org/10.1126/science.1439769>
- Voorhoeve, P. M., le Sage, C., Schrier, M., Gillis, A. J. M., Stoop, H., Nagel, R., ... Agami, R. (2006). A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*, 124(6), 1169–81. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.037>
- Wain, L. V.; Tobin, M. D., Eds. (2011). Copy number variation. *Methods Mol Biol*, 713, .167-83, *Methods Mol Biol*, 2010/12/15
- Wang, C., Yang, C., Chen, X., Yao, B., Yang, C., Zhu, C., ... Zhang, C. (2011). Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clinical Chemistry*, 57(12), 1722–1731. <http://doi.org/10.1373/clinchem.2011.169714>
- Wei, W., Fitzgerald, T., Ayub, Q., Massaia, A., Smith, B. B., Dominiczak, A. A., ... Xue, Y. (2015). Copy number variation in the human Y chromosome in the UK population. *Human Genetics*, 134, 789–800. <http://doi.org/10.1007/s00439-015-1562-5>
- White, S., Ohnesorg, T., Notini, A., Roeszler, K., Hewitt, J., Daggag, H., ... Sinclair, A. (2011). Copy Number Variation in Patients with Disorders of Sex Development Due to 46,XY Gonadal Dysgenesis. *PLoS ONE*, 6(3), e17793. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0017793>
- Wong, E. Y. ., Tse, J. Y. ., Yao, K.-M., Tam, P.-C., & Yeung, W. S. . (2002). VCY2 protein interacts with the HECT domain of ubiquitin-protein ligase E3A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(5), 1104–1111. [http://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02040-5](http://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02040-5)
- Wong, E. Y. M. (2003). Identification and Characterization of Human VCY2-Interacting Protein: VCY2IP-1, a Microtubule-Associated Protein-Like Protein. *Biology of Reproduction*, 70(3), 775–784. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.103.018531>
- Wong, E. Y. M., Tse, J. Y. M., Yao, K.-M., Lui, V. C. H., Tam, P.-C., & Yeung, W. S. B. (2004). Identification and characterization of human VCY2-interacting protein: VCY2IP-1, a microtubule-associated protein-like protein. *Biology of Reproduction*, 70(3), 775–84. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.103.018531>
- Wu, X., & Freeze, H. H. (2002a). GLUT14, a Duplicon of GLUT3, Is Specifically Expressed in Testis as Alternative Splice Forms. *Genomics*, 80(6), 553–557. <http://doi.org/10.1006/geno.2002.7010>

- Yan, N., Lu, Y., Sun, H., Qiu, W., Tao, D., Liu, Y., ... Ma, Y. (2009). Microarray profiling of microRNAs expressed in testis tissues of developing primates. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26(4), 179–186. <http://doi.org/10.1007/s10815-009-9305-y>
- Yan, N., Lu, Y., Sun, H., Tao, D., Zhang, S., Liu, W., & Ma, Y. (2007). A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues. *Reproduction*, 134(1), 73–79. <http://doi.org/10.1530/REP-07-0056>
- Yang, X., Feng, M., Jiang, X., Wu, Z., Li, Z., Aau, M., & Yu, Q. (2009). miR-449a and miR-449b are direct transcriptional targets of E2F1 and negatively regulate pRb-E2F1 activity through a feedback loop by targeting CDK6 and CDC25A. *Genes & Development*, 23(20), 2388–93. <http://doi.org/10.1101/gad.1819009>
- Yu, Z., Raabe, T., & Hecht, N. B. (2005). MicroRNA Mirn122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage. *Biology of Reproduction*, 73(3), 427–33. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.105.040998>
- Zhang, F., Gu, W., Hurles, M. E., & Lupski, J. R. (2009). Copy Number Variation in Human Health, Disease, and Evolution. <http://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164217>
- Zhang, Y., Li, M., Xiao, F., Teng, R., Zhang, C., Lan, A., ... Yang, X. (2015). Impact of partial DAZ1/2 deletion and partial DAZ3/4 deletion on male infertility. *Gene*, 571(1), 9–16. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2015.07.083>

Apêndices

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Apêndice 1

Departamento de Genética
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o Sr. para participar da pesquisa **“Estudos de Expressão Gênica em Tecido Testicular de Homens Azoospermicos ou Oligospermicos com ausência ou presença de Microdeleções da Região AZF em Yq11”**, sob a responsabilidade da pesquisadora Camila Calixto Moreira Dias.

Esta pesquisa tem como objetivo descrever como os genes da região AZF do cromossomo Y estão atuando na formação dos espermatozoides em pacientes férteis e inférteis. Acreditamos que este estudo seja importante porque a região AZF do cromossomo Y possui genes que são responsáveis exclusivamente pelo processo de formação dos espermatozoides (espermatogêneses) no testículo. Poder comparar como estes genes se expressam (atuam) em tecido testicular de pacientes férteis e inférteis será de suma importância para uma melhor compreensão da formação dos espermatozoides.

As amostras para esse projeto serão procedentes de pacientes atendidos no ambulatório de infertilidade da Urologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.

Para participar desta pesquisa, você deverá autorizar a utilização de um pequeno fragmento do seu material de biópsia, aproximadamente 0,5 cm de tecido (que corresponde mais ou menos ao tamanho de uma ervilha), que será coletado durante a biópsia testicular solicitada pelo médico que acompanha seu tratamento. A retirada deste material para a nossa pesquisa não interfere na análise da biópsia testicular solicitada pelo médico. Para complementar a pesquisa, você também deverá autorizar a retirada de 10 ml de sangue (que corresponde a duas colheres de chá) por punção de uma veia do braço. Em geral, a coleta de sangue por punção, não traz riscos para o doador. Porém, eventualmente, alguns pacientes, aproximadamente 1%, podem apresentar reações durante ou após a coleta de sangue, como por exemplo: queda de pressão arterial; tonturas; hematomas; náuseas e vômitos; sudorese fria; dor local e dificuldade de movimentar o braço. A maioria dessas manifestações é de natureza leve, não compromete a saúde do paciente e necessita apenas de um tempo maior em repouso ou de infusão de soro fisiológico. Após a coleta do material, tanto o sangue quanto o fragmento de biópsia serão processados no Laboratório de Genética Humana e Biologia Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para exame de Cariótipo (Cariótipo é a representação do conjunto de cromossomos presentes numa célula de um indivíduo), extração de DNA e RNA, triagem de presença ou ausência de microdeleção na região AZF (verificar se o cromossomo Y tem algum pedacinho faltando). Após o término da pesquisa as amostras coletadas (sangue e tecido testicular) e processadas (DNA e RNA) serão descartadas. Desta forma garantimos a você que o material doado para esta pesquisa não será utilizado em outras pesquisas.

Se depois de consentir em sua participação o senhor desistir de continuar participando, tem o direito e a liberdade de retirar seu consentimento em qualquer fase da pesquisa, seja antes ou depois da coleta dos dados, independente do motivo e sem nenhum prejuízo ao seu tratamento. O Sr não terá nenhuma despesa e também não receberá nenhuma remuneração. Os resultados da pesquisa serão analisados e publicados, mas sua identidade não será divulgada, sendo guardada em sigilo. Para qualquer outra informação o Sr poderá

entrar em contato com a pesquisadora no endereço, Avenida Bandeirantes – 3900, Departamento de Genética Bloco I ou pelo telefone (16) 3315-3256, ou poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa – CEP/FMRP telefone (16) 3602-2228. O Sr receberá uma via do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, assinado e rubricado em todas as páginas por você e pelo pesquisador responsável.

Consentimento Pós-Informação

Após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e ter tido a oportunidade de conversar com o pesquisador responsável, para esclarecer todas as minhas dúvidas, acredito estar suficientemente informado, ficando claro para mim que minha participação é voluntária e que posso retirar este consentimento a qualquer momento sem penalidades ou perda de qualquer benefício. Estou ciente também dos objetivos da pesquisa, dos procedimentos aos quais serei submetido, dos possíveis danos ou riscos deles provenientes e da garantia de confidencialidade. Diante do exposto expresso minha concordância de espontânea vontade em participar deste estudo.

_____	_____	Data ____/____/____
Nome do participante	Assinatura	
_____	_____	Data ____/____/____
Nome do responsável	Assinatura	

Eu, declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste voluntário (ou de seu representante legal) para a participação neste estudo.

_____	_____	Data ____/____/____
Camila Calixto Moreira Dias		
Pesquisadora responsável	Assinatura	

Contato pesquisadora responsável:

Camila Calixto Moreira Dias– milla_cm@yahoo.com.br
Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.
Endereço: Avenida Bandeirantes, nº 3900. CEP 14049-900
Bairro: Monte Alegre, Ribeirão Preto-SP
Telefone Lab. Genética Humana: (16) 3315- 3256
Comitê de Ética em Pesquisa – CEP: (16) 3602-2228 / email: cep@hcrp.usp.br

Apêndice 2: MicroRNAs diferencialmente expressos. Valores de P, e P ajustado por FDR. Estão presentes na tabela apenas os MicroRNAs com anotação completa no mirBase (N=318)

Condição	ID sonda Affymetrix	ID miRBase	MicroRNA	Fold Change	Valor de P (ajustado FDR)	Cromossomo	Posição Genômica
SCOS vs Ctrl	20501232	hsa-miR-372-3p	MIMAT0000724	-17,03	0,006236	chr19	54291185-54291207
SCOS vs Ctrl	20504414	hsa-miR-449b-5p	MIMAT0003327	-208,47	0,017019	chr5	54466534-54466555
SCOS vs Ctrl	20504577	hsa-miR-449c-5p	MIMAT0010251	-26,25	0,034709	chr5	54468141-54468165
SCOS vs Ctrl	20502367	hsa-miR-449a	MIMAT0001541	-318,03	0,034709	chr5	54466414-54466435
SCOS vs Ctrl	20504415	hsa-miR-449b-3p	MIMAT0009203	-50,78	0,036281	chr5	54466495-54466516
SCOS vs Ctrl	20534821	hsa-mir-34c	MI0000743	-11,34	0,036281	chr11	111384164-111384240
SCOS vs Ctrl	20501237	hsa-miR-375	MIMAT0000728	-11,76	0,036281	chr2	219866370-219866391
SCOS vs Ctrl	20504391	hsa-miR-638	MIMAT0003308	-1,95	0,036281	chr19	10829095-10829119
SCOS vs Ctrl	20501168	hsa-miR-34b-5p	MIMAT0000685	-29,63	0,055196	chr11	111383675-111383697
SCOS vs Ctrl	20503856	hsa-miR-516b-5p	MIMAT0002859	-20,4	0,055196	chr19	54228711-54228732
SCOS vs Ctrl	20528733	hsa-miR-7704	MIMAT0030019	-1,79	0,055196	chr2	177053571-177053589
SCOS vs Ctrl	20537531	hsa-mir-6788	MI0022633	1,54	0,063472	chr18	10759582-10759647
SCOS vs Ctrl	20504298	hsa-miR-574-3p	MIMAT0003239	2,36	0,065219	chr4	38869713-38869734
SCOS vs Ctrl	20501170	hsa-miR-34c-5p	MIMAT0000686	-168,91	0,065219	chr11	111384176-111384198
SCOS vs Ctrl	20504186	hsa-miR-455-5p	MIMAT0003150	5,81	0,065219	chr9	116971729-116971750
SCOS vs Ctrl	20503908	hsa-miR-532-3p	MIMAT0004780	2,06	0,065219	chrX	49767810-49767831
SCOS vs Ctrl	20500767	hsa-miR-125b-2-3p	MIMAT0004603	2,14	0,065219	chr21	17962610-17962631
SCOS vs Ctrl	20501169	hsa-miR-34b-3p	MIMAT0004676	-29,67	0,065219	chr11	111383712-111383733
SCOS vs Ctrl	20503823	hsa-miR-519c-5p	MIMAT0002831	-19,58	0,065219	chr19	54189738-54189759
SCOS vs Ctrl	20503829	hsa-miR-519b-5p	MIMAT0005454	-19,58	0,065219	chr19	54198479-54198500
SCOS vs Ctrl	20503833	hsa-miR-523-5p	MIMAT0005449	-19,58	0,065219	chr19	54201654-54201675
SCOS vs Ctrl	20503858	hsa-miR-518e-5p	MIMAT0005450	-19,58	0,065219	chr19	54233107-54233128
SCOS vs Ctrl	20503866	hsa-miR-522-5p	MIMAT0005451	-19,58	0,065219	chr19	54254480-54254501
SCOS vs Ctrl	20503868	hsa-miR-519a-5p	MIMAT0005452	-19,58	0,065219	chr19	54255665-54255686
SCOS vs Ctrl	20500726	hsa-miR-122-5p	MIMAT0000421	-76,43	0,065219	chr18	56118320-56118341
SCOS vs Ctrl	20500179	hsa-miR-98-5p	MIMAT0000096	5,77	0,065219	chrX	53583260-53583281
SCOS vs Ctrl	20500730	hsa-miR-125b-5p	MIMAT0000423	1,55	0,065219	chr11	121970517-121970538

SCOS vs Ctrl	20518892	hsa-miR-4497	MIMAT0019032	-2,37	0,065219	chr12	110271155-110271171
SCOS vs Ctrl	20526866	hsa-miR-7153-5p	MIMAT0028216	-23,26	0,065219	chr18	11654918-11654940
SCOS vs Ctrl	20537870	hsa-mir-7154	MI0023614	-8,36	0,069044	chr11	45713254-45713326
SCOS vs Ctrl	20534830	hsa-mir-361	MI0000760	1,69	0,069044	chrX	85158641-85158712
SCOS vs Ctrl	20503807	hsa-miR-193b-5p	MIMAT0004767	2,54	0,07175	chr16	14397837-14397858
SCOS vs Ctrl	20502441	hsa-miR-433-3p	MIMAT0001627	4,41	0,07175	chr14	101348286-101348307
SCOS vs Ctrl	20518904	hsa-miR-4507	MIMAT0019044	-1,82	0,07175	chr14	106324294-106324313
SCOS vs Ctrl	20519679	hsa-miR-4787-5p	MIMAT0019956	-1,95	0,076221	chr3	50712524-50712545
SCOS vs Ctrl	20503814	hsa-miR-512-3p	MIMAT0002823	-15,37	0,079941	chr19	54169983-54170004
SCOS vs Ctrl	20514163	hsa-miR-2861	MIMAT0013802	-2,24	0,079989	chr9	130548250-130548268
SCOS vs Ctrl	20500146	hsa-miR-23a-3p	MIMAT0000078	1,85	0,079989	chr19	13947409-13947429
SCOS vs Ctrl	20537848	hsa-mir-7108	MI0022959	-1,77	0,079989	chr19	2434912-2434998
SCOS vs Ctrl	20525426	hsa-miR-6732-5p	MIMAT0027365	-1,61	0,082846	chr1	37945836-37945855
SCOS vs Ctrl	20518623	hsa-miR-3935	MIMAT0018350	-8,97	0,098938	chr16	56279489-56279510
SCOS vs Ctrl	20529782	hsa-miR-8072	MIMAT0030999	-1,74	0,098938	chr12	123849361-123849380
SCOS vs Ctrl	20526880	hsa-miR-7159-5p	MIMAT0028228	-16,47	0,098938	chr6	33866912-33866932
SCOS vs Ctrl	20501293	hsa-miR-331-3p	MIMAT0000760	1,85	0,098938	chr12	95702256-95702276
SCOS vs Ctrl	20515627	hsa-miR-320e	MIMAT0015072	2,12	0,098938	chr19	47212551-47212568
SCOS vs Ctrl	20526172	hsa-miR-7107-5p	MIMAT0028111	-1,58	0,101091	chr12	121882129-121882150
SCOS vs Ctrl	20501234	hsa-miR-373-3p	MIMAT0000726	-17,85	0,10635	chr19	54292002-54292024
SCOS vs Ctrl	20525420	hsa-miR-6729-5p	MIMAT0027359	-1,98	0,111784	chr1	12089220-12089241
SCOS vs Ctrl	20501197	hsa-miR-361-5p	MIMAT0000703	1,74	0,125249	chrX	85158686-85158707
SCOS vs Ctrl	20517910	hsa-miR-1273e	MIMAT0018079	-2,09	0,125249	chr17	64425069-64425170
SCOS vs Ctrl	20501172	hsa-miR-299-5p	MIMAT0002890	4,27	0,125249	chr14	101490137-101490158
SCOS vs Ctrl	20500117	hsa-let-7c-5p	MIMAT0000064	1,74	0,142931	chr21	17912158-17912179
SCOS vs Ctrl	20537869	hsa-mir-7153	MI0023613	-3,57	0,143646	chr18	11654884-11654940
SCOS vs Ctrl	20518819	hsa-miR-4444	MIMAT0018962	-2,12	0,143646	chr2	178077496-178077513
SCOS vs Ctrl	20515624	hsa-miR-3188	MIMAT0015070	-2,21	0,145614	chr19	18392939-18392961
SCOS vs Ctrl	20500442	hsa-miR-34a-5p	MIMAT0000255	1,63	0,147331	chr1	9211794-9211815
SCOS vs Ctrl	20506771	hsa-miR-1227-5p	MIMAT0022941	-1,77	0,14779	chr19	2234132-2234148

SCOS vs Ctrl	20500121	hsa-let-7e-5p	MIMAT0000066	2,06	0,157616	chr19	52196046-52196067
SCOS vs Ctrl	20500799	hsa-miR-195-3p	MIMAT0004615	3,35	0,163308	chr17	6920947-6920968
SCOS vs Ctrl	20537039	hsa-mir-4785	MI0017430	-1,62	0,163308	chr2	161264321-161264393
SCOS vs Ctrl	20500393	hsa-miR-196a-5p	MIMAT0000226	7,9	0,163308	chr12	54385546-54385567
SCOS vs Ctrl	20504187	hsa-miR-455-3p	MIMAT0004784	2,75	0,163308	chr9	116971767-116971787
SCOS vs Ctrl	20535083	hsa-mir-424	MI0001446	1,78	0,167397	chrX	133680644-133680741
SCOS vs Ctrl	20500120	hsa-let-7d-3p	MIMAT0004484	2,35	0,172108	chr9	96941177-96941198
SCOS vs Ctrl	20503886	hsa-miR-505-5p	MIMAT0004776	2,57	0,172453	chrX	139006355-139006376
SCOS vs Ctrl	20526878	hsa-miR-7161-5p	MIMAT0028232	-14,95	0,172453	chr6	159030739-159030761
SCOS vs Ctrl	20500721	hsa-miR-23b-3p	MIMAT0000418	1,65	0,172453	chr9	97847547-97847567
SCOS vs Ctrl	20500743	hsa-miR-138-5p	MIMAT0000430	-4,65	0,172453	chr16	56892439-56892461
SCOS vs Ctrl	20500720	hsa-miR-23b-5p	MIMAT0004587	2,65	0,172453	chr9	97847509-97847530
SCOS vs Ctrl	20515573	hsa-miR-3154	MIMAT0015028	-5,44	0,172453	chr9	131007235-131007256
SCOS vs Ctrl	20500192	hsa-miR-105-5p	MIMAT0000102	-5,31	0,17964	chrX	151560737-151560759
SCOS vs Ctrl	20503855	hsa-miR-520g-3p	MIMAT0002858	-20,28	0,17964	chr19	54225474-54225497
SCOS vs Ctrl	20501229	hsa-miR-371a-5p	MIMAT0004687	-4,27	0,17964	chr19	54290934-54290953
SCOS vs Ctrl	20534637	hsa-mir-320a	MI0000542	1,91	0,17964	chr8	22102475-22102556
SCOS vs Ctrl	20517704	hsa-miR-4324	MIMAT0016876	4,32	0,17964	chr19	49812064-49812083
SCOS vs Ctrl	20525557	hsa-miR-6798-5p	MIMAT0027496	-1,84	0,184568	chr19	49513168-49513190
SCOS vs Ctrl	20503808	hsa-miR-193b-3p	MIMAT0002819	1,65	0,185562	chr16	14397874-14397895
SCOS vs Ctrl	20502125	hsa-miR-424-5p	MIMAT0001341	3,25	0,188219	chrX	133680710-133680731
SCOS vs Ctrl	20520208	hsa-miR-5006-5p	MIMAT0021033	-1,82	0,188219	chr13	42142491-42142511
SCOS vs Ctrl	20503839	hsa-miR-526a	MIMAT0002845	-7,54	0,188219	chr19	54209520-54209541
SCOS vs Ctrl	20503840	hsa-miR-520c-5p	MIMAT0005455	-7,54	0,188219	chr19	54210722-54210743
SCOS vs Ctrl	20503862	hsa-miR-518d-5p	MIMAT0005456	-7,54	0,188219	chr19	54238146-54238167
SCOS vs Ctrl	20500723	hsa-miR-27b-3p	MIMAT0000419	1,83	0,188219	chr9	97847787-97847807
SCOS vs Ctrl	20518839	hsa-miR-4459	MIMAT0018981	-1,85	0,188219	chr5	53371390-53371411
SCOS vs Ctrl	20503796	hsa-miR-202-3p	MIMAT0002811	1,76	0,188219	chr10	135061042-135061061
SCOS vs Ctrl	20519433	hsa-miR-4651	MIMAT0019715	-2,13	0,188219	chr7	75544524-75544543
SCOS vs Ctrl	20503835	hsa-miR-518f-5p	MIMAT0002841	-7,2	0,188219	chr19	54203284-54203305

SCOS vs Ctrl	20500112	hsa-let-7a-5p	MIMAT0000062	1,69	0,188219	chr11	122017276-122017297
SCOS vs Ctrl	20500148	hsa-miR-24-3p	MIMAT0000080	1,57	0,188571	chr19	13947103-13947124
SCOS vs Ctrl	20525396	hsa-miR-6724-5p	MIMAT0025856	-2,17	0,190225	chr21	8205315-8205406
SCOS vs Ctrl	20503882	hsa-miR-503-5p	MIMAT0002874	2,21	0,190225	chrX	133680401-133680423
SCOS vs Ctrl	20500731	hsa-miR-125b-1-3p	MIMAT0004592	3,01	0,190225	chr11	121970477-121970498
SCOS vs Ctrl	20502126	hsa-miR-424-3p	MIMAT0004749	1,72	0,190225	chrX	133680674-133680694
SCOS vs Ctrl	20504420	hsa-miR-654-5p	MIMAT0003330	4,23	0,190225	chr14	101506571-101506592
SCOS vs Ctrl	20503859	hsa-miR-518e-3p	MIMAT0002861	-4,3	0,190225	chr19	54233145-54233165
SCOS vs Ctrl	20534345	hsa-let-7d	MI0000065	1,74	0,190225	chr9	96941116-96941202
SCOS vs Ctrl	20537087	hsa-mir-5095	MI0018001	-1,77	0,190225	chr1	53400602-53400689
SCOS vs Ctrl	20500395	hsa-miR-197-3p	MIMAT0000227	1,87	0,190225	chr1	110141562-110141583
SCOS vs Ctrl	20501179	hsa-miR-296-3p	MIMAT0004679	-3,19	0,190225	chr20	57392681-57392702
SCOS vs Ctrl	20503800	hsa-miR-432-5p	MIMAT0002814	4,62	0,190225	chr14	101350833-101350855
SCOS vs Ctrl	20535800	hsa-mir-1233-1	MI0006323	-1,94	0,190225	chr15	34674270-34674351
SCOS vs Ctrl	20536520	hsa-mir-1233-2	MI0015973	-1,94	0,190225	chr15	34820491-34820572
SCOS vs Ctrl	20500484	hsa-miR-221-3p	MIMAT0000278	2,32	0,192366	chrX	45605608-45605630
SCOS vs Ctrl	20525699	hsa-miR-6869-5p	MIMAT0027638	-2,44	0,192807	chr20	1373584-1373605
SCOS vs Ctrl	20535210	hsa-mir-503	MI0003188	1,91	0,192807	chrX	133680358-133680428
SCOS vs Ctrl	20501281	hsa-miR-337-5p	MIMAT0004695	2,55	0,192961	chr14	101340852-101340872
SCOS vs Ctrl	20519409	hsa-miR-4634	MIMAT0019691	-1,94	0,192961	chr5	174178746-174178764
SCOS vs Ctrl	20503818	hsa-miR-515-3p	MIMAT0002827	-4,07	0,192961	chr19	54182307-54182328
SCOS vs Ctrl	20509070	hsa-miR-320d	MIMAT0006764	2,4	0,195872	chr13	41301964-41301982
SCOS vs Ctrl	20525467	hsa-miR-6753-5p	MIMAT0027406	-2,55	0,195872	chr11	67812261-67812282
SCOS vs Ctrl	20525416	hsa-miR-6727-5p	MIMAT0027355	-2,14	0,195872	chr1	1247919-1247941
SCOS vs Ctrl	20500159	hsa-miR-28-3p	MIMAT0004502	1,75	0,195872	chr3	188406622-188406643
SCOS vs Ctrl	20535218	hsa-mir-509-1	MI0003196	1,98	0,196078	chrX	146342050-146342143
SCOS vs Ctrl	20535638	hsa-mir-509-2	MI0005530	1,98	0,196078	chrX	146340278-146340368
SCOS vs Ctrl	20535683	hsa-mir-509-3	MI0005717	1,98	0,196078	chrX	146341170-146341244
SCOS vs Ctrl	20524035	hsa-miR-6125	MIMAT0024598	-2,01	0,196078	chr12	62654199-62654218
SCOS vs Ctrl	20519048	hsa-miR-3960	MIMAT0019337	-1,78	0,196078	chr9	130548158-130548177

SCOS vs Ctrl	20522180	hsa-miR-5739	MIMAT0023116	-4,44	0,196078	chr22	28855913-28855932
SCOS vs Ctrl	20500157	hsa-miR-27a-3p	MIMAT0000084	1,61	0,196078	chr19	13947261-13947281
SCOS vs Ctrl	20519497	hsa-miR-4689	MIMAT0019778	-2,12	0,196078	chr1	5922771-5922792
SCOS vs Ctrl	20500460	hsa-miR-204-5p	MIMAT0000265	3,38	0,198545	chr9	73424947-73424968
SCOS vs Ctrl	20503891	hsa-miR-506-3p	MIMAT0002878	2,34	0,203028	chrX	146312271-146312291
SCOS vs Ctrl	20520576	hsa-miR-5195-3p	MIMAT0021127	-3,37	0,204	chr14	107259125-107259145
SCOS vs Ctrl	20519495	hsa-miR-1343-3p	MIMAT0019776	1,8	0,204	chr11	34963435-34963456
SCOS vs Ctrl	20525721	hsa-miR-6880-5p	MIMAT0027660	-1,97	0,204	chr12	124821762-124821783
SCOS vs Ctrl	20519566	hsa-miR-4726-5p	MIMAT0019845	-2,55	0,207386	chr17	36875944-36875966
SCOS vs Ctrl	20525433	hsa-miR-6735-3p	MIMAT0027372	-3,74	0,210639	chr1	43914261-43914282
SCOS vs Ctrl	20517833	hsa-miR-3620-5p	MIMAT0022967	-1,86	0,210639	chr1	228284986-228285007
SCOS vs Ctrl	20521825	hsa-miR-5585-3p	MIMAT0022286	-3,48	0,210639	chr1	32552587-32552608
SCOS vs Ctrl	20520198	hsa-miR-5001-5p	MIMAT0021021	-1,83	0,210639	chr2	233415240-233415263
SCOS vs Ctrl	20518817	hsa-miR-4442	MIMAT0018960	-1,82	0,210639	chr3	25706366-25706382
SCOS vs Ctrl	20503827	hsa-miR-526b-5p	MIMAT0002835	-5,89	0,210639	chr19	54197660-54197682
SCOS vs Ctrl	20500115	hsa-let-7b-5p	MIMAT0000063	1,67	0,21064	chr22	46509571-46509592
SCOS vs Ctrl	20504419	hsa-miR-411-3p	MIMAT0004813	5,33	0,210871	chr14	101489712-101489733
SCOS vs Ctrl	20525435	hsa-miR-6736-3p	MIMAT0027374	-11,12	0,211643	chr1	145584461-145584481
SCOS vs Ctrl	20500715	hsa-let-7i-5p	MIMAT0000415	2,11	0,211916	chr12	62997471-62997492
SCOS vs Ctrl	20515638	hsa-miR-3196	MIMAT0015080	-2,02	0,212745	chr20	61870140-61870157
SCOS vs Ctrl	20526174	hsa-miR-7108-5p	MIMAT0028113	-1,89	0,212745	chr19	2434978-2434998
SCOS vs Ctrl	20533408	ENSG00000238612	ENSG00000238612	-1,55	0,212745	chr17	65403959-65404062
SCOS vs Ctrl	20517729	hsa-miR-4270	MIMAT0016900	-2,61	0,212745	chr3	15537786-15537805
SCOS vs Ctrl	20501278	hsa-miR-328-3p	MIMAT0000752	2,06	0,212745	chr16	67236230-67236251
SCOS vs Ctrl	20500154	hsa-miR-26b-5p	MIMAT0000083	3,1	0,212745	chr2	219267380-219267400
SCOS vs Ctrl	20525453	hsa-miR-6746-5p	MIMAT0027392	-2,27	0,212745	chr11	61645724-61645745
SCOS vs Ctrl	20518446	hsa-miR-3921	MIMAT0018196	3,11	0,212745	chr3	99683169-99683191
SCOS vs Ctrl	20517726	hsa-miR-4269	MIMAT0016897	6,97	0,212745	chr2	240227167-240227187
SCOS vs Ctrl	20506781	hsa-miR-1233-5p	MIMAT0022943	-2,39	0,212745	chr15	34674327-34674348
SCOS vs Ctrl	20504569	hsa-miR-1271-5p	MIMAT0005796	1,74	0,212745	chr5	175794963-175794984

SCOS vs Ctrl	20537548	hsa-mir-6804	MI0022649	-1,7	0,212745	chr19	55742253-55742320
SCOS vs Ctrl	20504562	hsa-miR-320b	MIMAT0005792	2,05	0,212745	chr1	117214409-117214430
SCOS vs Ctrl	20501171	hsa-miR-34c-3p	MIMAT0004677	-39,49	0,212745	chr11	111384209-111384230
SCOS vs Ctrl	20517919	hsa-miR-3665	MIMAT0018087	-1,91	0,212745	chr13	78272210-78272227
SCOS vs Ctrl	20519701	hsa-miR-4800-5p	MIMAT0019978	-2,09	0,212745	chr4	2251854-2251874
SCOS vs Ctrl	20500848	hsa-miR-320a	MIMAT0000510	1,84	0,212745	chr8	22102488-22102509
SCOS vs Ctrl	20525661	hsa-miR-6850-5p	MIMAT0027600	-2,03	0,212745	chr8	146017355-146017376
SCOS vs Ctrl	20525603	hsa-miR-6821-5p	MIMAT0027542	-1,8	0,215399	chr22	50356514-50356536
SCOS vs Ctrl	20503103	hsa-miR-485-5p	MIMAT0002175	3,44	0,218691	chr14	101521764-101521785
SCOS vs Ctrl	20519461	hsa-miR-4667-5p	MIMAT0019743	-4,58	0,219021	chr9	35608093-35608114
SCOS vs Ctrl	20500713	hsa-let-7g-5p	MIMAT0000414	1,9	0,219252	chr3	52302352-52302373
SCOS vs Ctrl	20509237	hsa-miR-1915-3p	MIMAT0007892	-2,16	0,220588	chr10	21785505-21785524
SCOS vs Ctrl	20500181	hsa-miR-99a-5p	MIMAT0000097	1,72	0,224756	chr21	17911421-17911442
SCOS vs Ctrl	20535667	hsa-mir-885	MI0005560	-2,04	0,224756	chr3	10436173-10436246
SCOS vs Ctrl	20500771	hsa-miR-127-3p	MIMAT0000446	2,69	0,224756	chr14	101349372-101349393
SCOS vs Ctrl	20518946	hsa-miR-4539	MIMAT0019082	-2,38	0,224756	chr14	106323682-106323703
SCOS vs Ctrl	20504563	hsa-miR-320c	MIMAT0005793	1,87	0,224756	chr18	19263520-19263539
SCOS vs Ctrl	20500119	hsa-let-7d-5p	MIMAT0000065	1,66	0,224756	chr9	96941123-96941144
SCOS vs Ctrl	20519589	hsa-miR-4739	MIMAT0019868	-2,05	0,226921	chr17	77681025-77681049
SCOS vs Ctrl	20512260	hsa-miR-2276-3p	MIMAT0011775	-2,97	0,226921	chr13	24736608-24736629
SCOS vs Ctrl	20504299	hsa-miR-575	MIMAT0003240	-2,53	0,226921	chr4	83674505-83674523
SCOS vs Ctrl	20503809	hsa-miR-497-5p	MIMAT0002820	1,66	0,226921	chr17	6921298-6921318
SCOS vs Ctrl	20536308	hsa-mir-320e	MI0014234	1,56	0,226921	chr19	47212550-47212602
SCOS vs Ctrl	20509229	hsa-miR-1910-3p	MIMAT0026917	-1,95	0,226921	chr16	85775237-85775256
SCOS vs Ctrl	20529774	hsa-miR-8064	MIMAT0030991	-3,67	0,226921	chr3	52880539-52880558
SCOS vs Ctrl	20501228	hsa-miR-370-3p	MIMAT0000722	3,83	0,226921	chr14	101377523-101377544
SCOS vs Ctrl	20504433	hsa-miR-421	MIMAT0003339	3,31	0,229166	chrX	73438227-73438249
SCOS vs Ctrl	20505799	hsa-miR-374b-5p	MIMAT0004955	3,77	0,229166	chrX	73438422-73438443
SCOS vs Ctrl	20525561	hsa-miR-6800-5p	MIMAT0027500	-2,02	0,229166	chr19	50335279-50335299
SCOS vs Ctrl	20535144	hsa-mir-202	MI0003130	1,85	0,229166	chr10	135061015-135061124

SCOS vs Ctrl	20500123	hsa-let-7f-5p	MIMAT0000067	2,94	0,229166	chr9	96938635-96938656
SCOS vs Ctrl	20515648	hsa-miR-514b-3p	MIMAT0015088	1,56	0,229305	chrX	146331679-146331699
SCOS vs Ctrl	20517916	hsa-miR-3663-3p	MIMAT0018085	-3,55	0,230174	chr10	118927206-118927228
SCOS vs Ctrl	20537544	hsa-mir-6800	MI0022645	-2,04	0,233335	chr19	50335275-50335356
SCOS vs Ctrl	20526885	hsa-miR-7162-3p	MIMAT0028235	-4,82	0,233335	chr10	30657526-30657544
SCOS vs Ctrl	20523020	hsa-miR-6088	MIMAT0023713	-2,46	0,233335	chr19	45939912-45939931
SCOS vs Ctrl	20500745	hsa-miR-140-5p	MIMAT0000431	1,72	0,233335	chr16	69967006-69967027
SCOS vs Ctrl	20519488	hsa-miR-4684-3p	MIMAT0019770	-2,04	0,233335	chr1	23046059-23046080
SCOS vs Ctrl	20519494	hsa-miR-1343-5p	MIMAT0027038	-1,7	0,233335	chr11	34963398-34963419
SCOS vs Ctrl	20534574	hsa-mir-122	MI0000442	-1,52	0,233335	chr18	56118306-56118390
SCOS vs Ctrl	20504218	hsa-miR-487b-3p	MIMAT0003180	2,49	0,233335	chr14	101512842-101512863
SCOS vs Ctrl	20503875	hsa-miR-500a-5p	MIMAT0004773	3,01	0,233335	chrX	49773051-49773073
SCOS vs Ctrl	20501224	hsa-miR-376c-3p	MIMAT0000720	3,05	0,233335	chr14	101506069-101506089
SCOS vs Ctrl	20503799	hsa-miR-493-3p	MIMAT0003161	3,42	0,233335	chr14	101335453-101335474
SCOS vs Ctrl	20535910	hsa-mir-1281	MI0006428	-1,53	0,233335	chr22	41488517-41488570
SCOS vs Ctrl	20500399	hsa-miR-199a-5p	MIMAT0000231	2,38	0,233335	chr1	172113732-172113754
SCOS vs Ctrl	20525585	hsa-miR-6812-5p	MIMAT0027524	-1,79	0,233335	chr20	44054155-44054179
SCOS vs Ctrl	20506896	hsa-miR-664a-5p	MIMAT0005948	2,47	0,233559	chr1	220373928-220373951
SCOS vs Ctrl	20536489	hsa-mir-4270	MI0015878	-1,54	0,233559	chr3	15537746-15537815
MA vs Ctrl	20509233	hsa-miR-1913	MIMAT0007888	1,99	0,47455	chr6	166922852-166922873
MA vs Ctrl	20525517	hsa-miR-6778-5p	MIMAT0027456	-1,56	0,47455	chr17	18244174-18244195
MA vs Ctrl	20500440	hsa-miR-10b-5p	MIMAT0000254	1,73	0,47455	chr2	177015057-177015079
MA vs Ctrl	20525557	hsa-miR-6798-5p	MIMAT0027496	-1,66	0,47455	chr19	49513168-49513190
MA vs Ctrl	20537870	hsa-mir-7154	MI0023614	-5,55	0,47455	chr11	45713254-45713326
MA vs Ctrl	20537869	hsa-mir-7153	MI0023613	-4,15	0,561597	chr18	11654884-11654940
MA vs Ctrl	20526866	hsa-miR-7153-5p	MIMAT0028216	-26,97	0,561597	chr18	11654918-11654940
MA vs Ctrl	20523016	hsa-miR-6084	MIMAT0023709	3,11	0,561597	chr1	20960249-20960268
MA vs Ctrl	20535800	hsa-mir-1233-1	MI0006323	-1,77	0,561597	chr15	34674270-34674351
MA vs Ctrl	20536520	hsa-mir-1233-2	MI0015973	-1,77	0,561597	chr15	34820491-34820572
MA vs Ctrl	20503104	hsa-miR-485-3p	MIMAT0002176	2,45	0,827953	chr14	101521801-101521822

MA vs Ctrl	20504365	hsa-miR-619-3p	MIMAT0003288	1,66	0,827953	chr12	109230699-109230722
MA vs Ctrl	20525433	hsa-miR-6735-3p	MIMAT0027372	-4,19	0,827953	chr1	43914261-43914282
MA vs Ctrl	20517910	hsa-miR-1273e	MIMAT0018079	-1,54	0,827953	chr17	64425069-64425170
MA vs Ctrl	20525435	hsa-miR-6736-3p	MIMAT0027374	-10,36	0,827953	chr1	145584461-145584481
MA vs Ctrl	20501244	hsa-miR-379-5p	MIMAT0000733	2,09	0,827953	chr14	101488408-101488428
MA vs Ctrl	20519589	hsa-miR-4739	MIMAT0019868	-1,55	0,827953	chr17	77681025-77681049
MA vs Ctrl	20517717	hsa-miR-4327	MIMAT0016889	-1,66	0,827953	chr21	31747668-31747686
MA vs Ctrl	20525683	hsa-miR-6860	MIMAT0027622	-2,06	0,827953	chr11	66813154-66813175
MA vs Ctrl	20519433	hsa-miR-4651	MIMAT0019715	-1,75	0,827953	chr7	75544524-75544543
MA vs Ctrl	20500736	hsa-miR-132-5p	MIMAT0004594	-1,69	0,827953	chr17	1953259-1953280
MA vs Ctrl	20525589	hsa-miR-6814-5p	MIMAT0027528	1,53	0,827953	chr21	43166975-43166996
MA vs Ctrl	20503842	hsa-miR-518c-5p	MIMAT0002847	-1,81	0,827953	chr19	54212012-54212034
MA vs Ctrl	20521825	hsa-miR-5585-3p	MIMAT0022286	-3,52	0,827953	chr1	32552587-32552608
MA vs Ctrl	20526880	hsa-miR-7159-5p	MIMAT0028228	-13,86	0,827953	chr6	33866912-33866932
MA vs Ctrl	20518832	hsa-miR-4452	MIMAT0018974	1,56	0,827953	chr4	87463638-87463660
MA vs Ctrl	20519473	hsa-miR-4673	MIMAT0019755	-2,22	0,827953	chr9	139414056-139414077
MA vs Ctrl	20537147	hsa-mir-5572	MI0019117	-1,59	0,827953	chr15	80873444-80873580
MA vs Ctrl	20515627	hsa-miR-320e	MIMAT0015072	1,96	0,827953	chr19	47212551-47212568
MA vs Ctrl	20519439	hsa-miR-4655-5p	MIMAT0019721	-1,53	0,827953	chr7	1883859-1883880
MA vs Ctrl	20501179	hsa-miR-296-3p	MIMAT0004679	-1,54	0,827953	chr20	57392681-57392702
MA vs Ctrl	20519677	hsa-miR-4786-5p	MIMAT0019954	-1,73	0,827953	chr2	240882480-240882501
MA vs Ctrl	20517921	hsa-miR-3667-5p	MIMAT0018089	-1,51	0,827953	chr22	49937085-49937106
MA vs Ctrl	20525503	hsa-miR-6771-5p	MIMAT0027442	-1,86	0,827953	chr16	50326532-50326553
MA vs Ctrl	20519570	hsa-miR-4728-5p	MIMAT0019849	-1,51	0,827953	chr17	37882749-37882771
MA vs Ctrl	20517820	hsa-miR-3613-5p	MIMAT0017990	3,85	0,827953	chr13	50570601-50570622
MA vs Ctrl	20525663	hsa-miR-6851-5p	MIMAT0027602	-2,33	0,827953	chr9	33467906-33467928
MA vs Ctrl	20519576	hsa-miR-4732-5p	MIMAT0019855	-2,16	0,827953	chr17	27188718-27188740
MA vs Ctrl	20504299	hsa-miR-575	MIMAT0003240	-1,72	0,827953	chr4	83674505-83674523
MA vs Ctrl	20519497	hsa-miR-4689	MIMAT0019778	-1,62	0,827953	chr1	5922771-5922792
MA vs Ctrl	20517937	hsa-miR-3679-3p	MIMAT0018105	1,52	0,827953	chr2	134884739-134884760

MA vs Ctrl	20504187	hsa-miR-455-3p	MIMAT0004784	1,58	0,827953	chr9	116971767-116971787
MA vs Ctrl	20503103	hsa-miR-485-5p	MIMAT0002175	1,71	0,827953	chr14	101521764-101521785
MA vs Ctrl	20515650	hsa-miR-1273d	MIMAT0015090	-1,82	0,827953	chr1	10287785-10287809
MA vs Ctrl	20515573	hsa-miR-3154	MIMAT0015028	-2,16	0,827953	chr9	131007235-131007256
MA vs Ctrl	20500726	hsa-miR-122-5p	MIMAT0000421	-35,74	0,827953	chr18	56118320-56118341
MA vs Ctrl	20500781	hsa-miR-149-3p	MIMAT0004609	-1,55	0,827953	chr2	241395473-241395493
MA vs Ctrl	20500782	hsa-miR-150-5p	MIMAT0000451	1,74	0,827953	chr19	50004089-50004110
MA vs Ctrl	20526868	hsa-miR-7154-5p	MIMAT0028218	-2,95	0,827953	chr11	45713304-45713326
MA vs Ctrl	20517701	hsa-miR-4322	MIMAT0016873	-1,89	0,827953	chr19	10341131-10341151
MA vs Ctrl	20501237	hsa-miR-375	MIMAT0000728	-2,84	0,827953	chr2	219866370-219866391
MA vs Ctrl	20525711	hsa-miR-6875-5p	MIMAT0027650	-2,67	0,827953	chr7	100465663-100465683
MA vs Ctrl	20501172	hsa-miR-299-5p	MIMAT0002890	1,94	0,827953	chr14	101490137-101490158
MA vs Ctrl	20525450	hsa-miR-6744-5p	MIMAT0027389	-2,04	0,827953	chr11	1277840-1277858
MA vs Ctrl	20534821	hsa-mir-34c	MI0000743	-2,6	0,827953	chr11	111384164-111384240
MA vs Ctrl	20536263	hsa-mir-3160-1	MI0014189	3,31	0,827953	chr11	46473355-46473439
MA vs Ctrl	20501160	hsa-miR-29c-3p	MIMAT0000681	1,61	0,827953	chr1	207975210-207975231
MA vs Ctrl	20504420	hsa-miR-654-5p	MIMAT0003330	2,23	0,827953	chr14	101506571-101506592
MA vs Ctrl	20504556	hsa-miR-550a-3-5p	MIMAT0020925	-1,74	0,827953	chr7	29720405-29720424
MA vs Ctrl	20509070	hsa-miR-320d	MIMAT0006764	1,99	0,827953	chr13	41301964-41301982
MA vs Ctrl	20503800	hsa-miR-432-5p	MIMAT0002814	2,71	0,827953	chr14	101350833-101350855
MA vs Ctrl	20519461	hsa-miR-4667-5p	MIMAT0019743	-1,81	0,827953	chr9	35608093-35608114
MA vs Ctrl	20536040	hsa-mir-2682	MI0012063	-1,58	0,827953	chr1	98510798-98510907
MA vs Ctrl	20518801	hsa-miR-4429	MIMAT0018944	2,04	0,827953	chr2	11680778-11680797
MA vs Ctrl	20504364	hsa-miR-619-5p	MIMAT0026622	-1,6	0,827953	chr12	109230738-109230759
MA vs Ctrl	20504189	hsa-miR-539-3p	MIMAT0022705	1,52	0,827953	chr14	101513706-101513727
MA vs Ctrl	20525723	hsa-miR-6881-5p	MIMAT0027662	-1,92	0,827953	chr15	74703747-74703768
MA vs Ctrl	20515550	hsa-miR-3141	MIMAT0015010	-1,57	0,827953	chr5	153975605-153975623
MA vs Ctrl	20504577	hsa-miR-449c-5p	MIMAT0010251	-11,11	0,827953	chr5	54468141-54468165
MA vs Ctrl	20525475	hsa-miR-6757-5p	MIMAT0027414	-1,54	0,827953	chr12	53450733-53450754
MA vs Ctrl	20503859	hsa-miR-518e-3p	MIMAT0002861	-2,64	0,827953	chr19	54233145-54233165

MA vs Ctrl	20500400	hsa-miR-199a-3p	MIMAT0000232	1,65	0,827953	chr1	172113694-172113715
MA vs Ctrl	20500458	hsa-miR-199b-3p	MIMAT0004563	1,65	0,827953	chr9	131007024-131007045
MA vs Ctrl	20505207	hsa-miR-770-5p	MIMAT0003948	1,53	0,827953	chr14	101318746-101318768
MA vs Ctrl	20519595	hsa-miR-4743-5p	MIMAT0019874	-1,81	0,827953	chr18	46196973-46196995
MA vs Ctrl	20522033	hsa-miR-5698	MIMAT0022491	-1,97	0,827953	chr1	154077038-154077059
MA vs Ctrl	20519545	hsa-miR-4716-3p	MIMAT0019827	-2,44	0,827953	chr15	49461276-49461297
MA vs Ctrl	20525549	hsa-miR-6794-5p	MIMAT0027488	-1,56	0,827953	chr19	12963079-12963098
MA vs Ctrl	20501249	hsa-miR-381-3p	MIMAT0000736	2,15	0,827953	chr14	101512305-101512326
MA vs Ctrl	20501233	hsa-miR-373-5p	MIMAT0000725	-3,77	0,827953	chr19	54291964-54291985
MA vs Ctrl	20537576	hsa-mir-6832	MI0022677	-1,55	0,827953	chr6	31601564-31601635
SCOS vs MA	20503856	hsa-miR-516b-5p	MIMAT0002859	-17,6	0,426036	chr19	54228711-54228732
SCOS vs MA	20503811	hsa-miR-181d-5p	MIMAT0002821	1,55	0,426036	chr19	13985724-13985746
SCOS vs MA	20528733	hsa-miR-7704	MIMAT0030019	-1,72	0,426036	chr2	177053571-177053589
SCOS vs MA	20518721	hsa-miR-642b-3p	MIMAT0018444	-2,09	0,426036	chr19	46178199-46178220
SCOS vs MA	20525453	hsa-miR-6746-5p	MIMAT0027392	-2,16	0,426036	chr11	61645724-61645745
SCOS vs MA	20525420	hsa-miR-6729-5p	MIMAT0027359	-1,95	0,426036	chr1	12089220-12089241
SCOS vs MA	20503823	hsa-miR-519c-5p	MIMAT0002831	-9,13	0,426036	chr19	54189738-54189759
SCOS vs MA	20503829	hsa-miR-519b-5p	MIMAT0005454	-9,13	0,426036	chr19	54198479-54198500
SCOS vs MA	20503833	hsa-miR-523-5p	MIMAT0005449	-9,13	0,426036	chr19	54201654-54201675
SCOS vs MA	20503858	hsa-miR-518e-5p	MIMAT0005450	-9,13	0,426036	chr19	54233107-54233128
SCOS vs MA	20503866	hsa-miR-522-5p	MIMAT0005451	-9,13	0,426036	chr19	54254480-54254501
SCOS vs MA	20503868	hsa-miR-519a-5p	MIMAT0005452	-9,13	0,426036	chr19	54255665-54255686
SCOS vs MA	20504391	hsa-miR-638	MIMAT0003308	-2,07	0,426036	chr19	10829095-10829119
SCOS vs MA	20525721	hsa-miR-6880-5p	MIMAT0027660	-1,52	0,426036	chr12	124821762-124821783
SCOS vs MA	20525467	hsa-miR-6753-5p	MIMAT0027406	-1,92	0,439127	chr11	67812261-67812282
SCOS vs MA	20519679	hsa-miR-4787-5p	MIMAT0019956	-1,89	0,439127	chr3	50712524-50712545
SCOS vs MA	20514163	hsa-miR-2861	MIMAT0013802	-2,08	0,439127	chr9	130548250-130548268
SCOS vs MA	20526878	hsa-miR-7161-5p	MIMAT0028232	-30,03	0,439127	chr6	159030739-159030761
SCOS vs MA	20501293	hsa-miR-331-3p	MIMAT0000760	2,05	0,439127	chr12	95702256-95702276
SCOS vs MA	20525699	hsa-miR-6869-5p	MIMAT0027638	-2,35	0,439127	chr20	1373584-1373605

SCOS vs MA	20504187	hsa-miR-455-3p	MIMAT0004784	1,74	0,439127	chr9	116971767-116971787
SCOS vs MA	20500393	hsa-miR-196a-5p	MIMAT0000226	5,12	0,439127	chr12	54385546-54385567
SCOS vs MA	20503891	hsa-miR-506-3p	MIMAT0002878	2,55	0,439127	chrX	146312271-146312291
SCOS vs MA	20506896	hsa-miR-664a-5p	MIMAT0005948	2,66	0,486303	chr1	220373928-220373951
SCOS vs MA	20519048	hsa-miR-3960	MIMAT0019337	-1,61	0,562827	chr9	130548158-130548177
SCOS vs MA	20523016	hsa-miR-6084	MIMAT0023709	-7,15	0,563197	chr1	20960249-20960268
SCOS vs MA	20536555	hsa-mir-3651	MI0016051	2,01	0,594046	chr9	95054740-95054829
SCOS vs MA	20500120	hsa-let-7d-3p	MIMAT0004484	1,57	0,594046	chr9	96941177-96941198
SCOS vs MA	20504419	hsa-miR-411-3p	MIMAT0004813	5,01	0,60649	chr14	101489712-101489733
SCOS vs MA	20525426	hsa-miR-6732-5p	MIMAT0027365	-2,07	0,60649	chr1	37945836-37945855
SCOS vs MA	20503796	hsa-miR-202-3p	MIMAT0002811	1,52	0,60649	chr10	135061042-135061061
SCOS vs MA	20504434	hsa-miR-542-5p	MIMAT0003340	2,05	0,60649	chrX	133675430-133675452
SCOS vs MA	20524035	hsa-miR-6125	MIMAT0024598	-1,66	0,60649	chr12	62654199-62654218
SCOS vs MA	20500777	hsa-miR-138-1-3p	MIMAT0004607	-2,84	0,60649	chr3	44155766-44155787
SCOS vs MA	20534575	hsa-mir-124-1	MI0000443	-6,85	0,60649	chr8	9760898-9760982
SCOS vs MA	20534578	hsa-mir-124-2	MI0000444	-6,85	0,60649	chr8	65291706-65291814
SCOS vs MA	20534580	hsa-mir-124-3	MI0000445	-6,85	0,60649	chr20	61809852-61809938
SCOS vs MA	20518446	hsa-miR-3921	MIMAT0018196	4,31	0,60649	chr3	99683169-99683191
SCOS vs MA	20537531	hsa-mir-6788	MI0022633	1,54	0,60649	chr18	10759582-10759647
SCOS vs MA	20503882	hsa-miR-503-5p	MIMAT0002874	1,96	0,60649	chrX	133680401-133680423

Anexo de Publicação**MANUSCRIPT****Copy number variation analysis in azoospermic men with germ maturation cell arrest and Sertolli cell-only syndrome**

Camila C. M. Dias¹, Amanda F. Assis¹, Fernanda Bueno¹, Wilson A. Silva-Jr¹, João M. Pina-Neto¹

1-Department of Genetics, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo (USP). Ribeirão Preto, São Paulo, Brazil

ABSTRACT

Infertility is a public health problem with significant social, economic and psychological impact. Worldwide, the incidence of infertility in the general population is estimated at 10-15%. Approximately 50% of infertility of couples is male origin. In more than half of infertile men, the cause of infertility is unknown (idiopathic). Etiologically, male infertility has genetic and non-genetic causes. Studies show that CNVs can also be related to male infertility, specifically in the failure of spermatogenesis. CNVs found in both the Y and in the autosomes chromosomes were also associated with possible failures in spermatogenesis. This work aimed to promote the analysis of large-scale distribution of CNVs in testicular biopsy samples from patients with azoospermia. For this purpose we used the CytoScan HDTM Affymetrix methodology. Through analysis of CNVs, we found 94 CNVs in sexual and autosomes chromosomes, 35 (37%) were classified as benign CNVs, 24 (23%) as a potentially benign seven CNVs (7.4%) as pathogenic and 7 were classified as potentially pathogenic. All CNVs classified as pathogenic are present on the Y chromosome, five CNVs are of duplication type and two are deletion type. The duplication type CNV was found in

MA patients and deletion type CNV was found in SCOS patient. We identified that CNVs overlap and when analyzed jointed - as a single CNV of each condition - they have a similar size. These CNVs have genes involved in spermatogenesis. CNVs classified as potentially pathogenic were present in autosomes and in the X chromosome. In these CNVs were present genes that were associated with failure in spermatogenesis. Our results show that changes in the number of copies (CNVs) on the Y chromosome lead to male infertility and CNVs in autosomes and X chromosomes may lead to male infertility also that the deletion type changes can lead to a failure of spermatogenesis greater than the duplication type alterations.

INTRODUCTION

Infertility is a public health problem with significant social, economic and psychological impacts (Suganthi et al., 2014). Worldwide, the incidence of infertility in the general population is estimated to be about 10-15% (Bushnik et al., 2012). It is defined as the reduction or absence of the ability to conceive or produce a viable offspring after a year of unprotected sex (Rowe & World Health Organization., 2000b). Approximately 50% of infertility of couples are male origin (Kamali et al., 2007).

Etiologically, male infertility presents genetic and not genetic causes. Among the genetic causes we can mention, Klinefelter syndrome, androgen receptor mutation, the regulator gene mutation transmembrane conductance cystic fibrosis (CFTR), classic chromosomal abnormalities, meiotic abnormalities, microdeletions of AZF, etc. Chromosomal abnormalities are found much more frequently in infertile men, with an incidence of 4-16% in the incidence of 0.4% in the fertile population (Csilla Krausz, 2010).

Recent years have seen the emergence of copy number variation (CNV) as an important source of genetic and phenotypic diversity (Redon et al., 2006) . Copy number variations are submicroscopic chromosomal duplications or deletions of at least 1 kb in length and are prevalent within the human genome (Redon et al., 2006). Although most CNVs are benign, alterations to the genomic architecture can have severe phenotypic implications through disruption of gene function and alteration to gene expression levels (Conrad et al., 2010; X. Guo et al., 2009; Henrichsen et al., 2009; Stranger et al., 2007)

A number of human conditions including epilepsy, autism, schizophrenia, and disorders of sex development have been associated with CNVs (O’Roak et al., 2012; Stefansson et al., 2008; White et al., 2011). More recently, evidence has emerged that CNVs may be an important determinant of male infertility (Stouffs et al., 2012b; Tüttelmann et al., 2011)

The aim of this study was to identify CNVs in autosomes and sex chromosomes of the type of deletion or duplication that may be involved in male infertility.

MATERIALS AND METHODS

All human samples were obtained with the approval of the ethics committee of Hospital das Clinicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Informed consent was given by all participants involved in the study.

Patient Selection

The genetic analysis was performed using five patients with nonobstrutive azoospermia, three with germ **cell** maturation **arrest** (GA) – named patients 4,5 and 6 - two with Sertolli Sell Only syndrome (SCOS) – named patients 7 and 9 -, confirmed by histopathology. Patients with known causes of male infertility were excluded, including those with obstructive azoospermia, chromosomal abnormalities (numerical and structural), Y chromosome microdeletions, cryptorchidism, varicocele, and previous cancer treatment.

DNA extraction was performed using the Kit Wizard® Genomic DNA Purification (Promega Corp., Madison, WI, USA) following the manufacturer's instructions.

Affymetrix Array Hybridization

For CNV analysis it was used GeneChip System CytoScan HDTM platform (Affymetrix®) with the compatible reagents, following the manufacturer’s instructions. The

CytoScan HDTM oligonucleotide chip contains probes with power to detect structural changes covering the whole genome, more than 2.6 million probes. The samples were processed according to the CytoScan HD standard protocol (Affymetrix Inc., Santa Clara, CA, USA).

The determination of CNVs (deletion or duplication) from data generated by microarray was performed by Chromosome Analysis Suite software v.1.2.2 (TEAS) (Affymetrix®).

CNVs classification

For analysis and classification of CNVs it was used the following database: DGV - Database of Genomic Variants (<http://projects.tcag.ca/variation>), Decipher - Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources (<http://www.sanger.ac.uk/PostGenomics/DECIPHER/>) and OMIM® (Online Mendelian Inheritance in Man) that are pathogenic CNVs databases found in individuals worldwide.

The classification of CNVs was performed based on the results obtained by the analysis of ChAS program, which shows the size, location of CNVs, if they present coding genes or not and if present in the databases cited above. After analysis and based on the classification guidelines published by Kearney et al (2011), CNVs were classified as follows:

Benign CNVs - present in healthy population with a frequency higher than one per cent and they do not have genes related to male infertility or have no genes;

Potentially benign CNVs - present in the healthy population with a frequency equal to or less than one percent and which do not have genes or genes that are not related to infertility;

Pathogenic CNVs - described in the literature as pathogenic to male infertility, presenting genes related to male infertility and large CNV that are not described in the literature with the same size of that observed in the patients of this study, but that may overlap a lower range with clinical significance;

Potentially pathogenic CNVs - identified in this way by having relevant genes, and that appears in the literature as a possible cause of male infertility.

CNVs with uncertain clinical significance - not described or described as rare in DGV less frequently than one percent and presenting genes with likely pathogenic, pathogenic, likely benign, benign and uncertain clinical significance classification.

MLPA Analysis

The MLPA analysis (Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification) was performed by the SALSA MLPA kit probemix p360-A1 Y-Chromosome Microdeletions.

This kit was designed to detect deletion/duplication of one or more DNA sequences of the AZF region in the Y chromosome.

MLPA reactions were performed according to manufacturer's protocol (MRC-Holland®, Amsterdam, Netherlands). To evaluate the quality of the experiment and perform data normalization and analysis it was used the Coffakyser.NET software (MRC-Holland, Amsterdam, The Netherlands).

RESULTS AND DISCUSSION

It is often difficult to interpret the pathogenicity of a CNV due to variable expression of the remaining allele and incomplete penetrance that could cause or not, clinical consequences in different family members (Tarabay et al., 2013). In recent years, various CNVs present in the human genome has been associated with complex genetic diseases, including câncer (Croce, 2009), diabetes (Grayson et al., 2010), obesity (Bochukova et al., 2010), neurodegenerative diseases, such as autism (Sebat, 2007) and schizophrenia (Ikeda et al., 2010).

The CNVs found in this study were classified as benign, potentially benign, potentially pathogenic, uncertain clinical significance and pathogenic.

Of the 94 CNVs, 35 (37%) were classified as benign and 24 (26%) were classified as potentially benign CNVs for male infertility. These results were expected since it is known

that variations in copy number among individuals constitute a contributory role of CNV in normal human variation (Ingelman-Sundberg et al., 2007, Perry et al, 2007). A study of (Dong et al., 2015a) Dong et al (2015) with patients presenting failure spermatogenesis identified a total of 42 CNVs, of these 23 CNVs were not associated with male infertility, of these, four CNVs were also present in our study and were classified as benign or potentially benign (8p22, 10q11.22, 11p11.12 and 16p12.2).

Two CNVs, in spite of being present in the Y chromosome and analysis of the OMIM database showing that the genes present in these CNVs are related to infertility phenotype, were considered potentially benign. The fact that one of the patients who presented the CNV Yq11.23 (patient 3) is the control group and presents normal testicular biopsy showed that this CNV, particularly, when found alone, not associated with any more CNV duplication in AZF region, can be considered benign. Once we observe that the patient 3 CNV is almost the same size as patient 5 CNV and also the same type, duplication (Table 1), but the patient 5 presented four more CNVs of duplication type that has been classified as pathogenic. The patient 5 has failure in spermatogenesis while patient 3 had normal spermatogenesis. Thus, our results suggest that duplication of CNV Yq11.23, when present alone, may not be able to cause failure in spermatogenesis.

CNVs classified as potentially pathogenic were present in autosomal and X chromosomes (Table 2). Nine CNVs were considered potentially pathogenic, one of deletion type and eight replication type, these CNVs were only present in the study groups (MA and SCOS).

Patient 4 presented three CNVs that we considered potentially pathogenic, they are present in chromosomes 4 and 12. The CNV of chromosome 4 is located at 4q13.2 region. Despite having a high frequency displayed on DGV, we considered it potentially pathogenic, because a study in patients with oligoospermia and Sertoli Cell Only syndrome, identified this CNV as a risk factor (Tüttelmann et al., 2011). At this CNV is present the gene UGT2B15 which is responsible for testosterone excretion in urine (Jakobsson et al., 2006; Juul et al., 2009) and also it has a role in estrogen regulation. Chromosome 12 presented two CNVs with genomic location 12p11.21 and 12q24.21. The CNV 12p11.21 presented the gene

DDX11 that is involved in embryogenesis, spermatogenesis and cell growth. CNV 12q24.21 presented the gene SLC2A14 that is expressed in the testis (Wu & Freeze, 2002b).

Patients 6 and 9 presented, each, two CNVs at chromosome X (Table 2) on which are present the genes SHOX e DHRSX. SHOX gene is a pseudogene located on PAR1 region at chromosome X. (Chianese, Gunning, Giachini, Daguin, Balercia, Ars, Giacco, Ruiz-Castañé, et al., 2014) Chianese et al. (2014), reported the first X-linked CNV associated to the failure of spermatogenesis. This CNV exhibit a lot of genes including SHOX. DHRS gene was also found in CNVs of patients with male infertility (Chianese, Gunning, Giachini, Daguin, Balercia, Ars, Giacco, Filatov, et al., 2014).

Twenty-two CNVs were classified as uncertain clinical significance. These CNVs showed a frequency at DGV lower than 1% and all of them have coding genes. Twenty CNVs presented genes described at OMIM, but it was not possible to determine if these genes were somehow linked to male infertility.

We classified seven CNVs (7%) as pathogenic. All of them are present at Y chromosome and have genes involved in spermatogenesis. The length of these CNVs ranged from 230kb to 3738Mb. The CNVs classified as pathogenic were found in patients 4, 5 and 9 and they were duplication, duplication and deletion type respectively.

Patient 4 has a CNV of duplication type with 230kb, at this CNV is the TSPY1 gene. We found three studies that associated CNV with TSPY1 gene. Two of them suggest that CNV TSPY1 is linked to failure of spermatogenesis (Giachini et al., 2009b; Nickkholgh et al., 2010). Other study, that quantified the number of TSPY1 copies in more than two thousand Chinese men with infertility, showed that patients with less than 21 or more than 35 copies of the gene have a low sperm production or a high risk of failure of spermatogenesis when compared with patients with 21 to 35 copies (Y. Shen et al., 2013). These studies show that the variation in the number of gene copies can interfere in the fertility of man.

CNVs of patients 5 and 9 are overlapped (Fig 1). They cover a large part of the Y chromosome where genes related to infertility are present as CDY1, BPY2, DAZ1, DAZ2, DAZ3. Patient 5 has 5 CNVs duplication type, sum them we find a total of 3527Mb duplicated. Patient 9 has 2 CNVs deletion type, representing a total of 3738 Mb deleted.

CDY1 gene codes a protein with a chromo domain and a catalytic domain of histone acetil-transferase, these proteins are present in the nuclei of spermatids. Several studies involving this gene associate it with failure of spermatogenesis (Giachini et al., 2008; S E Kleiman et al., 2001; Sandra E Kleiman et al., 2003). BPY2 encodes a protein that interacts with the ligase ubiquitin protein E3A, studies show that changes in the number of copies of this gene may be involved in male infertility (Ahmadi Rastegar et al., 2015; Chianese, Gunning, Giachini, Daguin, Balercia, Ars, Giacco, Ruiz-Castañé, et al., 2014; Chuncheng Lu et al., 2014). A study involving several genes at AZF region, including BPY2, suggests that it together with other genes can be used as a biomarker to differentiate patients with SCOS and MA (Ahmadi Rastegar et al., 2015). DAZ2 and DAZ3 genes are members of the DAZ family, which encodes a protein binding to RNA expressed in germ cells. Just like the other two mentioned genes, studies of the genes of this family show their involvement with male infertility in cases of oligozoospermia, criptorchidismo and microdeletions of the Y chromosome (A et al., 2006; Ferlin et al., 2004; Y. Zhang et al., 2015).

By means of MLPA technique was also possible to identify duplications and deletions in the Y chromosome in the AZF region of patients 5 and 9 respectively. Duplications and deletions of the MLPA kit probes corresponded the same regions of the CNVs found in these patients by CytoScan technique (Figure 2 and 3).

We can highlight that both, the deletion and duplication, can cause infertility phenotype in men, but our data show that deletion causes a greater disorder spermatogenesis when compared to duplication, once the patient with deletion had in his biopsy a diagnosis of Sertoli cells only syndrome and the patient with duplication presented germ cell maturation arrest.

CONCLUDING REMARKS

CNVs can induce a pathogenic effect in various ways as structural changes in the regulatory region of genes, increase or decrease in coding regions of proteins which can have a direct effect on the levels of mRNA. The studies of CNVs in infertile patients are still at

the beginning. Despite being at the beginning, these studies have demonstrate that somehow these genomic variations may be involved in male infertility.

Our results show that both CNVs present in the Y chromosome as in the autosomes may also be involved with the failure of spermatogenesis.

Like the Y chromosome deletions cause infertility, duplication may also be involved with infertility patients with duplications of the AZF region in the Y chromosome. Chromosomal aberrations, both deletions and duplications probably alter the expression of genes of the affected region and thus the biological processes that they act. We can highlight that both the deletion as duplication can cause infertility phenotype in men, but our data show that deletion causes a greater disorder spermatogenesis when compared to duplication once the patient with a deletion had a biopsy diagnosis of Sertoli Cells Only syndrome and the patient with duplication presented germ cell maturation arrest.

REFERENCES

- A, Z.-C., Yang, Y., Zhang, S.-Z., & Lin, L. (2006). [Study on DAZ gene copy deletion in severe oligozoospermia sperm donor for ICSI]. *Yi Chuan = Hereditas*, 28(9), 1057–60. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16963411>
- Abu-Halima, M., Backes, C., Leidinger, P., Keller, A., Lubbad, A. M., Hammadeh, M., & Meese, E. (2014). MicroRNA expression profiles in human testicular tissues of infertile men with different histopathologic patterns. *Fertility and Sterility*, 101, 78–86.e2. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.09.009>
- Abu-Halima, M., Hammadeh, M., Schmitt, J., Leidinger, P., Keller, A., Meese, E., & Backes, C. (2013). Altered microRNA expression profiles of human spermatozoa in patients with different spermatogenic impairments. *Fertility and Sterility*, 99(5), 1249–1255.e16. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.11.054>
- Ahmadi Rastegar, D., Sharifi Tabar, M., Alikhani, M., Parsamatin, P., Sahraneshin Samani, F., Sabbaghian, M., ... Salekdeh, G. H. (2015). Isoform-Level Gene Expression Profiles of Human Y Chromosome Azoospermia Factor Genes and Their X Chromosome Paralog in

- the Testicular Tissue of Non-Obstructive Azoospermia Patients. *Journal of Proteome Research*, 14(9), 3595–605. <http://doi.org/10.1021/acs.jproteome.5b00520>
- Aoki, V. W., & Carrell, D. T. (2003). Human protamines and the developing spermatid: their structure, function, expression and relationship with male infertility. *Asian Journal of Andrology*, 5(4), 315–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14695982>
- Athalye, A. S., Madon, P. F., Naik, N. J., Naik, D. J., Gavas, S. S., Dhumal, S. B., ... Parikh, F. R. (2004). A Study of Y Chromosome Microdeletions in Infertile Indian Males. *Int J Hum Genet*, 4(3), 179–185.
- Baarends, W. M., van der Laan, R., & Grootegoed, J. A. (2000). Specific aspects of the ubiquitin system in spermatogenesis. *Journal of Endocrinological Investigation*, 23(9), 597–604. <http://doi.org/10.1007/BF03343782>
- Bao, J., Li, D., Wang, L., Wu, J., Hu, Y., Wang, Z., ... Xu, C. (2012). MicroRNA-449 and microRNA-34b/c function redundantly in murine testes by targeting E2F transcription factor-retinoblastoma protein (E2F-pRb) pathway. *The Journal of Biological Chemistry*, 287(26), 21686–98. <http://doi.org/10.1074/jbc.M111.328054>
- Blanco, P., Shlumukova, M., Sargent, C. A., Jobling, M. A., Avara, N., & Hurles, M. E. (2000). Divergent outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism.
- Bochukova, E. G., Huang, N., Keogh, J., Henning, E., Purmann, C., Blaszczyk, K., ... Farooqi, I. S. (2010). Large, rare chromosomal deletions associated with severe early-onset obesity. *Nature*, 463(7281), 666–70. <http://doi.org/10.1038/nature08689>
- Bosch, E., & Jobling, M. A. (2003). Duplications of the AZFa region of the human Y chromosome are mediated by homologous recombination between HERVs and are compatible with male fertility. *Human Molecular Genetics*, 12(3), 341–347. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddg031>
- Bou Kheir, T., Futoma-Kazmierczak, E., Jacobsen, A., Krogh, A., Bardram, L., Hother, C., ... Friis-Hansen, L. (2011). miR-449 inhibits cell proliferation and is down-regulated in gastric cancer. *Molecular Cancer*, 10, 29. <http://doi.org/10.1186/1476-4598-10-29>
- Bouhallier, F., Alloli, N., Lavial, F., Chalmel, F., Perrard, M. H., Durand, P., ... Rouault, J. P.

- (2010). Role of miR-34c microRNA in the late steps of spermatogenesis. *Rna*, 16(4), 720–731. <http://doi.org/10.1261/rna.1963810>
- Brown, G. M., Furlong, R. A., Sargent, C. A., Erickson, R. P., Longepied, G., Mitchell, M., ... Affara, N. A. (1998). Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the Sxrb interval of the mouse Y chromosome of the Dffry gene. *Human Molecular Genetics*, 7(1), 97–107. <http://doi.org/10.1093/hmg/7.1.97>
- Buchold, G. M., Coarfa, C., Kim, J., Milosavljevic, A., Gunaratne, P. H., & Matzuk, M. M. (2010). Analysis of MicroRNA Expression in the Prepubertal Testis. *PLoS ONE*, 5(12), e15317. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0015317>
- Bushnik, T., Cook, J. L., Yuzpe, A. A., Tough, S., & Collins, J. (2012). Estimating the prevalence of infertility in Canada. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 27(3), 738–46. <http://doi.org/10.1093/humrep/der465>
- Cappallo-Obermann, H., Von, K., Bullet, K., Schulze, W., & Spiess, A.-N. (2010). A biopsy sample reduction approach to identify significant alterations of the testicular transcriptome in the presence of Y-chromosomal microdeletions that are independent of germ cell composition.
- Caron, C., Pivot-Pajot, C., van Grunsven, L. A., Col, E., Lestrat, C., Rousseaux, S., & Khochbin, S. (2003). Cdy1: a new transcriptional co-repressor. *EMBO Reports*, 4(9), 877–82. <http://doi.org/10.1038/sj.embor.embor917>
- Carrara, R. C. V., Orellana, M. D., Fontes, A. M., Palma, P. V. B., Kashima, S., Mendes, M. R., ... Covas, D. T. (2007). Mesenchymal stem cells from patients with chronic myeloid leukemia do not express BCR-ABL and have absence of chimerism after allogeneic bone marrow transplant. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, 40(1), 57–67. <http://doi.org/10.1590/S0100-879X2006005000055>
- Chandley, A. C., & Edmond, P. (1971). Meiotic studies on a subfertile patient with a ring Y chromosome. *Cytogenetics*, 10(4), 295–304. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5127018>
- Chianese, C., Gunning, A. C., Giachini, C., Daguin, F., Balercia, G., Ars, E., ... Filatov, D. (2014). X Chromosome-Linked CNVs in Male Infertility: Discovery of Overall Duplication Load

- and Recurrent, Patient-Specific Gains with Potential Clinical Relevance. *PLoS ONE*, 9(6), e97746. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0097746>
- Chianese, C., Gunning, A. C., Giachini, C., Daguin, F., Balercia, G., Ars, E., ... Krausz, C. (2014). X Chromosome-Linked CNVs in Male Infertility: Discovery of Overall Duplication Load and Recurrent, Patient-Specific Gains with Potential Clinical Relevance. *PLoS ONE*, 9(6), e97746. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0097746>
- Collier, B., Gorgoni, B., Loveridge, C., Cooke, H. J., & Gray, N. K. (2005). The DAZL family proteins are PABP-binding proteins that regulate translation in germ cells. *The EMBO Journal*, 24(14), 2656–66. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7600738>
- Conrad, D. F., Pinto, D., Redon, R., Feuk, L., Gokcumen, O., Zhang, Y., ... Hurles, M. E. (2010). Origins and functional impact of copy number variation in the human genome. *Nature*, 464(7289), 704–712. <http://doi.org/10.1038/nature08516>
- Croce, C. M. (2009). Causes and consequences of microRNA dysregulation in cancer. *Nature Reviews. Genetics*, 10(10), 704–14. <http://doi.org/10.1038/nrg2634>
- Dada, R., Gupta, N. P., & Kucheria, K. (2004). Yq microdeletions--azoospermia factor candidate genes and spermatogenic arrest. *Journal of Biomolecular Techniques : JBT*, 15(3), 176–83. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15331583>
- Diskin, S. J., Hou, C., Glessner, J. T., Attiyeh, E. F., Laudenslager, M., Bosse, K., ... Maris, J. M. (2009). Copy number variation at 1q21.1 associated with neuroblastoma. *Nature*, 459(7249), 987–991. <http://doi.org/10.1038/nature08035>
- Ditton, H. J., Zimmer, J., Kamp, C., Meyts, E. R.-D., & Vogt, P. H. (2004). The AZFa gene DBY (DDX3Y) is widely transcribed but the protein is limited to the male germ cells by translation control. *Human Molecular Genetics*, 13(19), 2333–2341. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddh240>
- Dong, Y., Pan, Y., Wang, R., Zhang, Z., Xi, Q., & Liu, R. (2015a). Copy number variations in spermatogenic failure patients with chromosomal abnormalities and unexplained azoospermia. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 16041–16049. <http://doi.org/10.4238/2015.December.7.17>
- Dong, Y., Pan, Y., Wang, R., Zhang, Z., Xi, Q., & Liu, R.-Z. (2015b). Copy number variations in spermatogenic failure patients with chromosomal abnormalities and unexplained

- azoospermia. *Genetics and Molecular Research*, 14(4), 16041–16049. <http://doi.org/10.4238/2015.December.7.17>
- Dorus, S., Gilbert, S. L., Forster, M. L., Barndt, R. J., & Lahn, B. T. (2003). The CDY-related gene family: coordinated evolution in copy number, expression profile and protein sequence. *Human Molecular Genetics*, 12(14), 1643–1650. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddg185>
- Duty, S. M., Silva, M. J., Barr, D. B., Brock, J. W., Ryan, L., Chen, Z., ... Hauser, R. (2003). Phthalate exposure and human semen parameters. *Epidemiology (Cambridge, Mass.)*, 14(3), 269–77. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12859026>
- Eggers, S., Deboer, K. D., Van Den Bergen, J., Gordon, L., White, S. J., Jamsai, D., ... O'bryan, M. K. (2015). Copy number variation associated with meiotic arrest in idiopathic male infertility. *Fertility and Sterility*, 103, 214–219. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.09.030>
- Fábio Escórcio Almeida, Severino Ribeiro, & Avelino Fraga. (2012). Artigos de Revisão. *Acta Urológica*, 2, 52–57. Retrieved from <http://www.apurologia.pt/acta/2-2012/inf-masc-poss-fact-risc.pdf>
- Ferlin, A., Arredi, B., Speltra, E., Cazzadore, C., Selice, R., Garolla, A., ... Foresta, C. (2007). Molecular and Clinical Characterization of Y Chromosome Microdeletions in Infertile Men: A 10-Year Experience in Italy. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 92(3), 762–770. <http://doi.org/10.1210/jc.2006-1981>
- Ferlin, A., Bettella, A., Tessari, A., Salata, E., Dallapiccola, B., & Foresta, C. (2004). Analysis of the DAZ gene family in cryptorchidism and idiopathic male infertility. *Fertility and Sterility*, 81(4), 1013–8. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2003.08.053>
- Gatta, V., Raicu, F., Ferlin, A., Antonucci, I., Scioletti, A. P., Garolla, A., ... Stuppia, L. (2010). Testis transcriptome analysis in male infertility: new insight on the pathogenesis of oligo-azoospermia in cases with and without AZFc microdeletion. *BMC Genomics*, 11, 401. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-11-401>
- Giachini, C., Laface, I., Guarducci, E., Balercia, G., Forti, G., & Krausz, C. (2008). Partial AZFc deletions and duplications: clinical correlates in the Italian population. *Human Genetics*, 124(4), 399–410. <http://doi.org/10.1007/s00439-008-0561-1>

- Giachini, C., Nuti, F., Turner, D. J., Laface, I., Xue, Y., Daguin, F., ... Krausz, C. (2009a). TSPY1 copy number variation influences spermatogenesis and shows differences among Y lineages. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 94(10), 4016–4022. <http://doi.org/10.1210/jc.2009-1029>
- Giachini, C., Nuti, F., Turner, D. J., Laface, I., Xue, Y., Daguin, F., ... Krausz, C. (2009b). TSPY1 Copy Number Variation Influences Spermatogenesis and Shows Differences among Y Lineages. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 94(10), 4016–4022. <http://doi.org/10.1210/jc.2009-1029>
- Gillis, A. J. M., Stoop, H. J., Hersmus, R., Oosterhuis, J. W., Sun, Y., Chen, C., ... Looijenga, L. H. J. (2007). High-throughput microRNAome analysis in human germ cell tumours. *The Journal of Pathology*, 213(3), 319–28. <http://doi.org/10.1002/path.2230>
- Grayson, B. L., Smith, M. E., Thomas, J. W., Wang, L., Dexheimer, P., Jeffrey, J., ... Aune, T. M. (2010). Genome-wide analysis of copy number variation in type 1 diabetes. *PloS One*, 5(11), e15393. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0015393>
- Guo, J., Miao, Y., Xiao, B., Huan, R., Jiang, Z., Meng, D., & Wang, Y. (2009). Differential expression of microRNA species in human gastric cancer versus non-tumorous tissues. *Journal of Gastroenterology and Hepatology*, 24(4), 652–657. <http://doi.org/10.1111/j.1440-1746.2008.05666.x>
- Guo, X., Su, B., Zhou, Z., Sha, J., Liu, J., Lewis, B., ... Lempicki, R. (2009). Rapid evolution of mammalian X-linked testis microRNAs. *BMC Genomics*, 10(1), 97. <http://doi.org/10.1186/1471-2164-10-97>
- Hall, N. M., Brown, G. M., Furlong, R. A., Sargent, C. A., Mitchell, M., Rocha, D., & Affara, N. A. (2003). Usp9y (ubiquitin-specific protease 9 gene on the Y) is associated with a functional promoter and encodes an intact open reading frame homologous to Usp9x that is under selective constraint. *Mammalian Genome*, 14(7), 437–447. <http://doi.org/10.1007/s00335-002-3068-4>
- Hansen, S., Eichler, E. E., Fullerton, S. M., & Carrell, D. (2010). SPANX gene variation in fertile and infertile males. *Systems Biology in Reproductive Medicine*, 55, 18–26. <http://doi.org/10.3109/19396360903312015>
- Hellani, A., Al-Hassan, S., Iqbal, M. A., & Coskun, S. (2006). Y chromosome microdeletions in

- infertile men with idiopathic oligo- or azoospermia. *Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction*, 3, 1. <http://doi.org/10.1186/1743-1050-3-1>
- Henrichsen, C. N., Vinckenbosch, N., Zöllner, S., Chaignat, E., Pradervand, S., Schütz, F., ... Reymond, A. (2009). Segmental copy number variation shapes tissue transcriptomes. *Nature Genetics*, 41(4), 424–9. <http://doi.org/10.1038/ng.345>
- Holmberg, C., Helin, K., Sehested, M., & Karlström, O. (1998). E2F-1-Induced p53-independent apoptosis in transgenic mice. *Oncogene*, 17(2), 143–155. <http://doi.org/10.1038/sj.onc.1201915>
- Hopps, C. V., Mielnik, A., Goldstein, M., Palermo, G. D., Rosenwaks, Z., & Schlegel, P. N. (2003). Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Human Reproduction*, 18(8), 1660–1665. <http://doi.org/10.1093/humrep/deg348>
- Ikeda, M., Aleksic, B., Kirov, G., Kinoshita, Y., Yamanouchi, Y., Kitajima, T., ... Iwata, N. (2010). Copy number variation in schizophrenia in the Japanese population. *Biological Psychiatry*, 67(3), 283–6. <http://doi.org/10.1016/j.biopsych.2009.08.034>
- Ingelman-Sundberg, M., Sim, S. C., Gomez, A., & Rodriguez-Antona, C. (2007). Influence of cytochrome P450 polymorphisms on drug therapies: pharmacogenetic, pharmacoeepigenetic and clinical aspects. *Pharmacology & Therapeutics*, 116(3), 496–526. <http://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2007.09.004>
- Jacob, K., Albrecht, S., Sollier, C., Faury, D., Sader, E., Montpetit, A., ... Jabado, N. (2009). Duplication of 7q34 is specific to juvenile pilocytic astrocytomas and a hallmark of cerebellar and optic pathway tumours. *British Journal of Cancer*, 101(4), 722–33. <http://doi.org/10.1038/sj.bjc.6605179>
- Jakobsson, J., Ekström, L., Inotsume, N., Garle, M., Lorentzon, M., Ohlsson, C., ... Rane, A. (2006). Large differences in testosterone excretion in Korean and Swedish men are strongly associated with a UDP-glucuronosyl transferase 2B17 polymorphism. *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 91(2), 687–93. <http://doi.org/10.1210/jc.2005-1643>
- Juul, A., Sørensen, K., Aksglaede, L., Garn, I., Rajpert-De Meyts, E., Hullstein, I., ... Ottesen, A. M. (n.d.). A Common Deletion in the Uridine Diphosphate Glucuronyltransferase (UGT)

- 2B17 Gene Is a Strong Determinant of Androgen Excretion in Healthy Pubertal Boys.
<http://doi.org/10.1210/jc.2008-1984>
- Kamali, M., Baghestani, A. R., Kashfi, F., Kashani, H., Tavajohi, S., & Amirchaghmaghi, E. (2007). A Survey on Infertility in Royan Institute, 2, 6.
- Kee, K., Angeles, V. T., Flores, M., Nguyen, H. N., & Reijo Pera, R. A. (2009). Human DAZL, DAZ and BOULE genes modulate primordial germ-cell and haploid gamete formation. *Nature*, 462(7270), 222–5. <http://doi.org/10.1038/nature08562>
- Khazaie, Y., & Nasr Esfahani, M. H. (2014). MicroRNA and male infertility: A potential for diagnosis. *International Journal of Fertility and Sterility*, 8(2), 113–118.
- Kleiman, S. E., Lagziel, A., Yogev, L., Botchan, A., Paz, G., & Yavetz, H. (2001). Expression of CDY1 may identify complete spermatogenesis. *Fertility and Sterility*, 75(1), 166–73. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11163833>
- Kleiman, S. E., Yogev, L., Hauser, R., Botchan, A., Bar-Shira Maymon, B., Schreiber, L., ... Yavetz, H. (2003). Members of the CDY family have different expression patterns: CDY1 transcripts have the best correlation with complete spermatogenesis. *Human Genetics*, 113(6), 486–92. <http://doi.org/10.1007/s00439-003-0990-9>
- Kondrashov, A. S. (2003). Direct estimates of human per nucleotide mutation rates at 20 loci causing Mendelian diseases. *Human Mutation*, 21(1), 12–27. <http://doi.org/10.1002/humu.10147>
- Krausz, C. (2010). Genetic Testing of Male Infertility. In *Reproductive Endocrinology and Infertility* (pp. 431–444). New York, NY: Springer New York. http://doi.org/10.1007/978-1-4419-1436-1_27
- Krausz, C. (2011). Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Practice & Research. Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(2), 271–85. <http://doi.org/10.1016/j.beem.2010.08.006>
- Krausz, C., Quintana-Murci, L., & McElreavey, K. (2000). Prognostic value of Y deletion analysis: What is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Human Reproduction*, 15(7), 1431–1434. <http://doi.org/10.1093/humrep/15.7.1431>
- Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Brown, L. G., Minx, P. J., Cordum, H. S., Waterston, R.

- H., ... Page, D. C. (2001). The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nature Genetics*, 29(3), 279–286. <http://doi.org/10.1038/ng757>
- Lahn, B. T., Page, D. C., Cooke, H. J., Brown, W. R., Rappold, G. A., Helms, C., ... Hendriks, W. (1997). Functional coherence of the human Y chromosome. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5338), 675–80. <http://doi.org/10.1126/science.278.5338.675>
- Lahn, B. T., Tang, Z. L., Zhou, J., Barndt, R. J., Parvinen, M., Allis, C. D., & Page, D. C. (2002). Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 99(13), 8707–12. <http://doi.org/10.1073/pnas.082248899>
- Landgraf, P., Rusu, M., Sheridan, R., Sewer, A., Iovino, N., Aravin, A., ... Tuschl, T. (2007). A mammalian microRNA expression atlas based on small RNA library sequencing. *Cell*, 129(7), 1401–14. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2007.04.040>
- Ledig, S., Röpke, A., & Wieacker, P. (2010). Copy number variants in premature ovarian failure and ovarian dysgenesis. *Sexual Development: Genetics, Molecular Biology, Evolution, Endocrinology, Embryology, and Pathology of Sex Determination and Differentiation*, 4(4–5), 225–32. <http://doi.org/10.1159/000314958>
- Ledig, S., Schippert, C., Strick, R., Beckmann, M. W., Oppelt, P. G., & Wieacker, P. (2011). Recurrent aberrations identified by array-CGH in patients with Mayer-Rokitansky-K € uster-Hauser syndrome. *Fertility and Sterility*, 95, 1589–1594. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2010.07.1062>
- Lee, K. H., Lee, S., Kim, B., Chang, S., Kim, S. W., Paick, J.-S., & Rhee, K. (2006). Dazl can bind to dynein motor complex and may play a role in transport of specific mRNAs. *The EMBO Journal*, 25(18), 4263–70. <http://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601304>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., & Ambros, V. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–54. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8252621>
- Lee, R. C., Feinbaum, R. L., Ambros, V., Ahringer, J., Kimble, J., Ahringer, J., ... Zuker, M. (1993). The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell*, 75(5), 843–854. <http://doi.org/10.1016/0092->

8674(93)90529-Y

- Leke, R. J., Oduma, J. A., Bassol-Mayagoitia, S., Bacha, A. M., & Grigor, K. M. (1993). Regional and geographical variations in infertility: effects of environmental, cultural, and socioeconomic factors. *Environmental Health Perspectives*, (Suppl 2), 73–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8243409>
- Lewis, R. (2004). *GENÉTICA HUMANA - CONCEITOS E APLICAÇÕES* (G. KOOGAN, Ed.) (5th ed.).
- Lian, J., Zhang, X., Tian, H., Liang, N., Wang, Y., Liang, C., ... Sun, F. (2009). Altered microRNA expression in patients with non-obstructive azoospermia. *Reproductive Biology and Endocrinology : RB&E*, 7(1), 13. <http://doi.org/10.1186/1477-7827-7-13>
- Lo Giacco, D., Chianese, C., Ars, E., Ruiz-Castañé, E., Forti, G., & Krausz, C. (2014). Recurrent X chromosome-linked deletions: discovery of new genetic factors in male infertility. *Journal of Medical Genetics*, 51(5), 340–4. <http://doi.org/10.1136/jmedgenet-2013-101988>
- Lu, C., Jiang, J., Zhang, R., Wang, Y., Xu, M., Qin, Y., ... Wang, X. (2014). Gene copy number alterations in the azoospermia-associated AZFc region and their effect on spermatogenic impairment. *Molecular Human Reproduction*, 20(9), 836–843. <http://doi.org/10.1093/molehr/gau043>
- Lu, C., Jiang, J., Zhang, R., Wang, Y., Xu, M., Qin, Y., ... Wang, X. (2014). Gene copy number alterations in the azoospermia-associated AZFc region and their effect on spermatogenic impairment. *Molecular Human Reproduction*, 20(9), 836–43. <http://doi.org/10.1093/molehr/gau043>
- Luo, L., Ye, L., Liu, G., Shao, G., Zheng, R., Ren, Z., ... Li, F. (2010). Microarray-based approach identifies differentially expressed microRNAs in porcine sexually immature and mature testes. *PloS One*, 5(8), e11744. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0011744>
- Lupski, J. R. (2007). Genomic rearrangements and sporadic disease. *Nature Genetics*, 39(7s), S43–S47. <http://doi.org/10.1038/ng2084>
- Machev, N., Saut, N., Longepied, G., Terriou, P., Navarro, A., Levy, N., ... Mitchell, M. J. (2004). Sequence family variant loss from the AZFc interval of the human Y chromosome, but not gene copy loss, is strongly associated with male infertility. *Journal*

- of Medical Genetics*, 41(11), 814–25. <http://doi.org/10.1136/jmg.2004.022111>
- Marcet, B., Chevalier, B., Luxardi, G., Coraux, C., Zaragosi, L.-E., Cibois, M., ... Barbry, P. (2011). Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nature Cell Biology*, 13(6), 694–701. <http://doi.org/10.1038/ncb2241>
- Mciver, S. C., Roman, S. D., Nixon, B., & McLaughlin, E. A. (2012). miRNA and mammalian male germ cells. *Human Reproduction Update*, 18(1), 44–59. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmr041>
- McLachlan, R. I., Mallidis, C., Ma, K., Bhasin, S., & de Kretser, D. M. (1998). Genetic disorders and spermatogenesis. *Reproduction, Fertility, and Development*, 10(1), 97–104. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9727599>
- Mortimer, D. (1994). *Practical laboratory andrology*. New York.
- Muñoz, X., Mata, A., Bassas, L., & Larriba, S. (2015). Altered miRNA Signature of Developing Germ-cells in Infertile Patients Relates to the Severity of Spermatogenic Failure and Persists in Spermatozoa. *Nature Publishing Group*. <http://doi.org/10.1038/srep17991>
- Nachman, M. W., & Crowell, S. L. (2000). Estimate of the mutation rate per nucleotide in humans. *Genetics*, 156(1), 297–304. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10978293>
- Navarro-Costa, P., Gonçalves, J., & Plancha, C. E. (2010). The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility. *Human Reproduction Update*, 16(5), 525–42. <http://doi.org/10.1093/humupd/dmq005>
- Navarro-Costa, P., Plancha, C. E., & Gonçalves, J. (2010). Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: thriller or filler for male (in)fertility? *Journal of Biomedicine & Biotechnology*, 2010, 936569. <http://doi.org/10.1155/2010/936569>
- Nickkholgh, B., Noordam, M. J., Hovingh, S. E., van Pelt, A. M. M., van der Veen, F., Repping, S., ... al., et. (2010). Y chromosome TSPY copy numbers and semen quality. *Fertility and Sterility*, 94(5), 1744–1747. <http://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.09.051>
- Novotny, G. W., Sonne, S. B., Nielsen, J. E., Jonstrup, S. P., Hansen, M. A., Skakkebaek, N. E., ... Leffers, H. (2007). Translational repression of E2F1 mRNA in carcinoma in situ and

- normal testis correlates with expression of the miR-17-92 cluster. *Cell Death and Differentiation*, 14(4), 879–882. <http://doi.org/10.1038/sj.cdd.4402090>
- O’Roak, B. J., Vives, L., Girirajan, S., Karakoc, E., Krumm, N., Coe, B. P., ... Eichler, E. E. (2012). Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature*, 485(7397), 246–50. <http://doi.org/10.1038/nature10989>
- Papaioannou, M. D., & Nef, S. (2010). microRNAs in the testis: building up male fertility. *Journal of Andrology*, 31(1), 26–33. <http://doi.org/10.2164/jandrol.109.008128>
- Perry, G. H., Dominy, N. J., Claw, K. G., Lee, A. S., Fiegler, H., Redon, R., ... Stone, A. C. (2007). Diet and the evolution of human amylase gene copy number variation. *Nature Genetics*, 39(10), 1256–60. <http://doi.org/10.1038/ng2123>
- Quintana-Murci, L., & Fellous, M. (2001). The human Y chromosome: the biological role of a “functional wasteland” *Journal of Biomedicine and Biotechnology @BULLET*, 1(1), 18–24. Retrieved from <http://jbb.hindawi.com>
- Redon, R., Ishikawa, S., Fitch, K. R., Feuk, L., Perry, G. H., Andrews, T. D., ... Hurles, M. E. (2006). Global variation in copy number in the human genome. *Nature*, 444(7118), 444–454. <http://doi.org/10.1038/nature05329>
- Repping, S., Skaletsky, H., Brown, L., van Daalen, S. K. M., Korver, C. M., Pyntikova, T., ... Rozen, S. (2003). Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nature Genetics*, 35(3), 247–51. <http://doi.org/10.1038/ng1250>
- Repping, S., Skaletsky, H., Lange, J., Silber, S., Van Der Veen, F., Oates, R. D., ... Rozen, S. (2002). Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *American Journal of Human Genetics*, 71(4), 906–22. <http://doi.org/10.1086/342928>
- Reynolds, N., & Cooke, H. J. (2005). Role of the DAZ genes in male fertility. *Reproductive Biomedicine Online*, 10(1), 72–80. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15705297>
- Ro, S., Park, C., Sanders, K. M., McCarrey, J. R., & Yan, W. (2007). Cloning and expression profiling of testis-expressed microRNAs. *Developmental Biology*, 311(2), 592–602. <http://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.09.009>

- Rocak, S., & Linder, P. (2004). DEAD-box proteins: the driving forces behind RNA metabolism. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 5(3), 232–241. <http://doi.org/10.1038/nrm1335>
- Rowe, P. J., & World Health Organization. (2000a). *WHO manual for the standardized investigation, diagnosis, and management of the infertile male*. Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press.
- Rowe, P. J., & World Health Organization. (2000b). *WHO manual for the standardized investigation, diagnosis, and management of the infertile male*. Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press.
- Rucker, G. B., Mielnik, A., King, P., Goldstein, M., & Schlegel, P. N. (1998). Preoperative screening for genetic abnormalities in men with nonobstructive azoospermia before testicular sperm extraction. *The Journal of Urology*, 160(6 Pt 1), 2068–71. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9817325>
- Sanyal, A., Lajoie, B. R., Jain, G., & Dekker, J. (2012). The long-range interaction landscape of gene promoters. *Nature*, 489. <http://doi.org/10.1038/nature11279>
- Sebat, J. (2007). Major changes in our DNA lead to major changes in our thinking. *Nature Genetics*, 39(7s), S3–S5. <http://doi.org/10.1038/ng2095>
- Sharpe, R. M. (2004). How strong is the evidence of a link between environmental chemicals and adverse effects on human reproductive health? *BMJ*, 328(7437), 447–451. <http://doi.org/10.1136/bmj.328.7437.447>
- Shen, Y., Yan, Y., Liu, Y., Zhang, S., Yang, D., Zhang, P., ... Yang, Y. (2013). A significant effect of the TSPY1 copy number on spermatogenesis efficiency and the phenotypic expression of the gr/gr deletion. *Human Molecular Genetics*, 22(8), 1679–1695. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddt004>
- Shen, Y., Yan, Y., Liu, Y., Zhang, S., Yang, D., Zhang, P., ... Yang, Y. (2013). A significant effect of the TSPY1 copy number on spermatogenesis efficiency and the phenotypic expression of the gr/gr deletion. *Human Molecular Genetics*, 22(8), 1679–1695. <http://doi.org/10.1093/hmg/ddt004>
- Shi, X.-B., Xue, L., Yang, J., Ma, A.-H., Zhao, J., Xu, M., ... deVere White, R. W. (2007). An androgen-regulated miRNA suppresses Bak1 expression and induces androgen-independent growth of prostate cancer cells. *Proceedings of the National Academy of*

- Sciences of the United States of America*, 104(50), 19983–8.
<http://doi.org/10.1073/pnas.0706641104>
- Simoni, M., Tüttelmann, F., Gromoll, J., & Nieschlag, E. (2008). Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: the extended Münster experience. *Reproductive Biomedicine Online*, 16(2), 289–303. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18284889>
- Stefansson, H., Rujescu, D., Cichon, S., Pietiläinen, O. P. H., Ingason, A., Steinberg, S., ... Myin-Germeys, I. (2008). Large recurrent microdeletions associated with schizophrenia. *Nature*, 455(7210), 232–236. <http://doi.org/10.1038/nature07229>
- Stouffs, K., Lissens, W., Landuyt, L. Van, Tournaye, H., Steirteghem, A. Van, & Liebaers, I. (2001). Characterization of the genomic organization, localization and expression of four PRY genes (PRY1, PRY2, PRY3 and PRY4). *Molecular Human Reproduction*, 7(7), 603–610. <http://doi.org/10.1093/molehr/7.7.603>
- Stouffs, K., Lissens, W., Verheyen, G., Landuyt, L. Van, Goossens, A., Tournaye, H., ... Liebaers, I. (2004). Expression pattern of the Y-linked PRY gene suggests a function in apoptosis but not in spermatogenesis. *Molecular Human Reproduction*, 10(1), 15–21. <http://doi.org/10.1093/molehr/gah010>
- Stouffs, K., Vandermaelen, D., Massart, A., Menten, B., Vergult, S., Tournaye, H., & Lissens, W. (2012a). Array comparative genomic hybridization in male infertility. *Human Reproduction*, 27(3), 921–929. <http://doi.org/10.1093/humrep/der440>
- Stouffs, K., Vandermaelen, D., Massart, A., Menten, B., Vergult, S., Tournaye, H., & Lissens, W. (2012b). Array comparative genomic hybridization in male infertility. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 27(3), 921–9. <http://doi.org/10.1093/humrep/der440>
- Stranger, B. E., Forrest, M. S., Dunning, M., Ingle, C. E., Beazley, C., Thorne, N., ... Dermitzakis, E. T. (2007). Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science (New York, N.Y.)*, 315(5813), 848–53. <http://doi.org/10.1126/science.1136678>
- Suganthi, R., Vijesh, V. V., Vandana, N., & Fathima Ali Benazir, J. (2014). Y chorosomal microdeletion screening in the workup of male infertility and its current status in India. *International Journal of Fertility & Sterility*, 7(4), 253–66. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24520494>

- Sun, C., Skaletsky, H., Birren, B., Devon, K., Tang, Z., Silber, S., ... Page, D. C. (1999). An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. *Nature Genetics*, 23(4), 429–32. <http://doi.org/10.1038/70539>
- Sun, C., Skaletsky, H., Rozen, S., Gromoll, J., Nieschlag, E., Oates, R., & Page, D. C. (2000). Deletion of azoospermia factor a (AZFa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses. *Human Molecular Genetics*, 9(15), 2291–6. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11001932>
- Sun, D., Layer, R., Mueller, A. C., Cichewicz, M. A., Negishi, M., Paschal, B. M., & Dutta, A. (2014). Regulation of several androgen-induced genes through the repression of the miR-99a/let-7c/miR-125b-2 miRNA cluster in prostate cancer cells HHS Public Access. *Oncogene. March*, 13(3311), 1448–1457. <http://doi.org/10.1038/onc.2013.77>
- Tarabay, Y., Kieffer, E., Teletin, M., Celebi, C., Van Montfoort, A., Zamudio, N., ... Viville, S. (2013). The mammalian-specific Tex19.1 gene plays an essential role in spermatogenesis and placenta-supported development. *Human Reproduction (Oxford, England)*, 28(8), 2201–14. <http://doi.org/10.1093/humrep/det129>
- Tiepolo, L., & Zuffardi, O. (1976). Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Human Genetics*, 34(2), 119–24. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1002136>
- Tüttelmann, F., Simoni, M., Kliesch, S., Ledig, S., Dworniczak, B., Wieacker, P., & Röpke, A. (2011). Copy Number Variants in Patients with Severe Oligozoospermia and Sertoli-Cell-Only Syndrome. *PLoS ONE*, 6(4), e19426. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0019426>
- van Ommen, G.-J. B. (2005). Frequency of new copy number variation in humans. *Nature Genetics*, 37(4), 333–334. <http://doi.org/10.1038/ng0405-333>
- Vogt, P., Edelmann, A., Kirsch, S., Henegariu, O., Hirschmann, P., Kiesewetter, F., ... Haidl, G. (1996). Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Human Molecular Genetics*, 5(7), 933–943. <http://doi.org/10.1093/hmg/5.7.933>
- Vogt, P. H. (1998). Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Molecular Human Reproduction*, 4(8), 739–744.

<http://doi.org/10.1093/molehr/4.8.739>

- Vogt, P. H., Falcao, C. L., Hanstein, R., & Zimmer, J. (2008). The AZF proteins. *International Journal of Andrology*, 31(4), 383–394. <http://doi.org/10.1111/j.1365-2605.2008.00890.x>
- Vollrath, D., Foote, S., Hilton, A., Brown, L. G., Beer-Romero, P., Bogan, J. S., & Page, D. C. (1992). The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science (New York, N.Y.)*, 258(5079), 52–9. <http://doi.org/10.1126/science.1439769>
- Voorhoeve, P. M., le Sage, C., Schrier, M., Gillis, A. J. M., Stoop, H., Nagel, R., ... Agami, R. (2006). A genetic screen implicates miRNA-372 and miRNA-373 as oncogenes in testicular germ cell tumors. *Cell*, 124(6), 1169–81. <http://doi.org/10.1016/j.cell.2006.02.037>
- Wang, C., Yang, C., Chen, X., Yao, B., Yang, C., Zhu, C., ... Zhang, C. (2011). Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. *Clinical Chemistry*, 57(12), 1722–1731. <http://doi.org/10.1373/clinchem.2011.169714>
- Wei, W., Fitzgerald, T., Ayub, Q., Massaia, A., Smith, B. B., Dominiczak, A. A., ... Xue, Y. (2015). Copy number variation in the human Y chromosome in the UK population. *Human Genetics*, 134, 789–800. <http://doi.org/10.1007/s00439-015-1562-5>
- White, S., Ohnesorg, T., Notini, A., Roeszler, K., Hewitt, J., Daggag, H., ... Sinclair, A. (2011). Copy Number Variation in Patients with Disorders of Sex Development Due to 46,XY Gonadal Dysgenesis. *PLoS ONE*, 6(3), e17793. <http://doi.org/10.1371/journal.pone.0017793>
- Wong, E. Y. ., Tse, J. Y. ., Yao, K.-M., Tam, P.-C., & Yeung, W. S. . (2002). VCY2 protein interacts with the HECT domain of ubiquitin-protein ligase E3A. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 296(5), 1104–1111. [http://doi.org/10.1016/S0006-291X\(02\)02040-5](http://doi.org/10.1016/S0006-291X(02)02040-5)
- Wong, E. Y. M. (2003). Identification and Characterization of Human VCY2-Interacting Protein: VCY2IP-1, a Microtubule-Associated Protein-Like Protein. *Biology of Reproduction*, 70(3), 775–784. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.103.018531>
- Wong, E. Y. M., Tse, J. Y. M., Yao, K.-M., Lui, V. C. H., Tam, P.-C., & Yeung, W. S. B. (2004). Identification and characterization of human VCY2-interacting protein: VCY2IP-1, a

- microtubule-associated protein-like protein. *Biology of Reproduction*, 70(3), 775–84. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.103.018531>
- Wu, X., & Freeze, H. H. (2002a). GLUT14, a Duplicon of GLUT3, Is Specifically Expressed in Testis as Alternative Splice Forms. *Genomics*, 80(6), 553–557. <http://doi.org/10.1006/geno.2002.7010>
- Wu, X., & Freeze, H. H. (2002b). GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. *Genomics*, 80(6), 553–7. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12504846>
- Yan, N., Lu, Y., Sun, H., Qiu, W., Tao, D., Liu, Y., ... Ma, Y. (2009). Microarray profiling of microRNAs expressed in testis tissues of developing primates. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 26(4), 179–186. <http://doi.org/10.1007/s10815-009-9305-y>
- Yan, N., Lu, Y., Sun, H., Tao, D., Zhang, S., Liu, W., & Ma, Y. (2007). A microarray for microRNA profiling in mouse testis tissues. *Reproduction*, 134(1), 73–79. <http://doi.org/10.1530/REP-07-0056>
- Yang, X., Feng, M., Jiang, X., Wu, Z., Li, Z., Aau, M., & Yu, Q. (2009). miR-449a and miR-449b are direct transcriptional targets of E2F1 and negatively regulate pRb-E2F1 activity through a feedback loop by targeting CDK6 and CDC25A. *Genes & Development*, 23(20), 2388–93. <http://doi.org/10.1101/gad.1819009>
- Yu, Z., Raabe, T., & Hecht, N. B. (2005). MicroRNA Mirn122a reduces expression of the posttranscriptionally regulated germ cell transition protein 2 (Tnp2) messenger RNA (mRNA) by mRNA cleavage. *Biology of Reproduction*, 73(3), 427–33. <http://doi.org/10.1095/biolreprod.105.040998>
- Zhang, F., Gu, W., Hurles, M. E., & Lupski, J. R. (n.d.). Copy Number Variation in Human Health, Disease, and Evolution. <http://doi.org/10.1146/annurev.genom.9.081307.164217>
- Zhang, Y., Li, M., Xiao, F., Teng, R., Zhang, C., Lan, A., ... Yang, X. (2015). Impact of partial DAZ1/2 deletion and partial DAZ3/4 deletion on male infertility. *Gene*, 571(1), 9–16. <http://doi.org/10.1016/j.gene.2015.07.083>

FIGURES AND TABLES:

Fig 1- Representation of the CNV overlapping found on the Y chromosome in the AZF region. In blue is shown the five CNVs of duplication type of patient 5. In brown is represented both CNVs of deletion type of patient 9. Figure generated by ChAS program

Fig 2 - Amplification altered pattern of the probes of patient 5. The graph shows the change in the pattern of amplification of BPY2, DAZ, CDY1B and CDY2A probes.

Fig 3 - Amplification altered pattern of the probes of patient 11. The graph shows the change in the pattern of amplification of BPY2, DAZ, CDY1B e RBMY2CP probes.

Table 1 – CNVs classified as pathogenic.

CNVR	Patient	Type	Size (Kb)	Location Genomics	Start	End	Genes	OMIM	DGV	aDGV
-	4	Duplicação	230	Yp11.2	9168143	9398468	TTTY20, FAM197Y5, FAM197Y2, TSPY8, TSPY4, TSPY3, TSPY1	TSPY1 (480100)	0%	0%
-	5	Duplicação	269	Yq11.23	27227609	27496305	TTTY4, TTTY4B, TTTY4C, TTTY17A, TTTY17B, TTTY17C		3%	1%
-	5	Duplicação	504	Yq11.23	27674551	28178527	CDY1, CDY1B, TTTY3B, TTTY3	TTTY3 (400036)	4%	0%
17	5	Duplicação	517	Yq11.223	25848006	26365325	TTTY3B, TTTY3, CDY1B, CDY1, CSPG4P1Y, GOLGA2P3Y, GOLGA2P2Y	CDY1 (400016), CSPG4P1Y (400034), GOLGA2P2Y (400035)	0%	0%
	9	Deleção	872	Yq11.223	24644460	25515984	PRY2, PRY, TTTY17B, TTTY17C, TTTY17A, TTTY4B, TTTY4C, TTTY4, BPY2B, BPY2C, BPY2, DAZ1, DAZ4, DAZ3, DAZ2	TTTY17A (400040), TTTY4 (400037), DAZ1 (400003)	32%	0%
18	5	Duplicação	753	Yq11.223	24651462	25404172	PRY2, PRY, TTTY17B, TTTY17C, TTTY17A, TTTY4B, TTTY4C, TTTY4, BPY2B, BPY2C, BPY2, DAZ1, DAZ4, DAZ3, DAZ2	TTTY17A (400040), TTTY4 (400037), DAZ1 (400003)	4%	1%
	9	Deleção	2812	Yq11.223	25570468	28382367	TTTY3B, TTTY3, CDY1B, CDY1, CSPG4P1Y, GOLGA2P3Y, GOLGA2P2Y, TTTY17A, TTTY17C, TTTY17B, TTTY4, TTTY4B, TTTY4C, BPY2B, BPY2C, BPY2, DAZ4, DAZ3, DAZ2	CDY1 (400016), CSPG4P1Y (400034), GOLGA2P2Y (400035), BPY2 (400013), DAZ3 (400027), DAZ2 (400026), TTTY3 (400036)	0%	0%

aDGV – database of 3000 people present in healthy teas program ChAS

Table 2 - CNVs classified as potentially pathogenic

CNVR	Patient	Type	Size (Kb)	Location Genomics	Start	End	Genes	OMIM	DGV
-	4	Deleção	116	4q13.2	69435888	69551731	UGT2B15	UGT2B15 (600069)	20
-	4	Duplicação	174	12p11.21	31232956	31407111	DDX11	DDX11 (601150)	7
-	4	Duplicação	164	12p13.31	7971020	8134669	SLC2A14, SLC2A3	SLC2A14 (611039), SLC2A3 (138170)	3,2
16	6	Duplicação	311	Xp22.33	528480	839488	SHOX	SHOX (312865), SHOX (400020)	0
	6	Duplicação	216	Xp22.33	2054897	2270566	DHRX		<1
	9	Duplicação	273	Xp22.33	566009	839486	SHOX	SHOX (312865), SHOX (400020)	< 1
	9	Duplicação	142	Xp22.33	2128347	2270566	DHRX		< 1