UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - USP
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

MARIA VICTORIA CORTEZ DE OLIVEIRA LIMA

Caracterização genômica de homens inférteis com falência espermato gênica primária

Genomic characterization of infertile men with primary spermatogenic failure

RIBEIRÃO PRETO – SP
2018

MARIA VICTORIA CORTEZ DE OLIVEIRA LIMA

Caracterização genômica de homens inférteis com falência espermatogênica primária

Genomic characterization of infertile men with primary spermatogenic failure

Dissertação apresentada à Universidade de São Paulo, como requisito para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Área de concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Regina Martelli

**RIBEIRÃO PRETO – SP
2018**

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

Lima, Maria Victoria Cortez de Oliveira

Caracterização genômica de homens inférteis com falência espermatogênica primária. Ribeirão Preto, São Paulo, 2018.

149 p.:il.;30cm

Dissertação de Mestrado – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo, Área de concentração: Genética.

Orientadora: Martelli, Lúcia R.

1. Espermatogênese; 2. Infertilidade masculina; 3. Reprodução humana.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Maria Victoria Cortez de Oliveira Lima

Título: Caracterização genômica de homens inférteis com falência espermatogênica primária

Dissertação de mestrado apresentada à
Universidade de São Paulo, como requisito para
obtenção do título de Mestre em Ciências pela
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto.

Área de concentração: Genética

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Regina Martelli

Aprovada em : ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof(a). Dr(a). _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais **Manoel Agripino** e **Maria das Graças**,
meus irmãos **Manuela** e **Samuel**
e ao meu namorado **Lucas**.

“As pessoas são solitárias porque constroem muros ao invés de pontes.”
O Pequeno Príncipe

AGRADECIMENTOS

“Cada pessoa que passa em nossa vida, passa sozinha, é porque cada pessoa é única e nenhuma substitui a outra! Cada pessoa que passa em nossa vida passa sozinha e não nos deixa só porque deixa um pouco de si e leva um pouquinho de nós. Essa é a mais bela responsabilidade da vida e a prova de que as pessoas não se encontram por acaso.” Charles Chaplin.

Durante essa etapa, pessoas extremamente especiais passaram pelo meu caminho e foram muito importantes. Apesar da dificuldade de transformar sentimentos em palavras, gostaria de destacar algumas dessas pessoas.

À minha orientadora **Profa. Dra. Lucia Regina Martelli**, que me deu essa oportunidade. Obrigada pela confiança, paciência, orientação, aprendizado e carinho.

Agradeço também ao **Prof. Dr. Jeremy Squire** pelo aprendizado, contribuição e discussões.

À **Dra. Juliana Dourado** e ao **Dr. Carlos Grangeiro**, por terem me disponibilizado os dados de *array*-CGH e permitido a realização desse trabalho.

Ao **Laboratório de Imunogenética Molecular da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, que permitiu utilização de parte dos equipamentos para a realização da técnica de *array*-CGH e auxiliou em todo processo. Aos **Ambulatórios de Genética Médica do HCFMRP-USP, de Urologia e de Ginecologia e Obstetrícia**, por terem auxiliado na triagem dos pacientes utilizados na técnica de *array*-CGH.

Ao técnico do Laboratório de Citogenética Molecular Humana, **Silvio Avelino dos Santos**, que me recebeu no laboratório e foi um grande professor. Obrigada pela amizade, auxílio, cooperação e paciência.

Aos técnicos **Lucimar Laureano** e **Rinaldo Scarparo**, não apenas pela realização dos cariótipos dos pacientes utilizados na técnica de *array*-CGH, como também pela paciência e por terem me ensinado a técnica e a montagem dos cariótipos.

Aos **funcionários do bloco C**, principalmente aos técnicos **Reginaldo Aparecido Vila** e **Marli Galerani**, pessoas que eu tenho um carinho imenso.

Aos **funcionários do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto**, em especial à **Susie**, que sempre me auxiliou e me ajudou nos processos da pós-graduação.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ)** e à **Fundação de Apoio ao Ensino, Pesquisa e Assistência do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FAEPA)**, pelo apoio financeiro.

Aos colegas do Laboratório de Citogenética Molecular Humana: **Carlos Grangeiro, Clarissa Picanço, Flávia Gaona, Livia Ferreira e Tatiana Mozer**, pela troca de experiências, aprendizado e companheirismo. Em especial à **Alexandra Galvão** e ao **Thiago Vidotto**, que além de serem meus companheiros nessa estrada, ajudando demais na construção do meu conhecimento intelectual, são amigos que levarei para vida. Não posso me esquecer da **Juliana Dourado**, que além de me ensinar os testes moleculares e me iniciar nesse mundo sem fim que é a infertilidade masculina, se tornou uma amiga muito querida que sempre poderei contar.

Aos **colegas do bloco C**, pela amizade, companheirismo, auxílio, discussões e muitos momentos felizes. Em especial aos amigos que vão sempre estar no meu coração: **Grace Ruiz, Hugo Rego, Jorge Petrolí, Juliana Oliveira, Murilo Racy Soares e Perla Pizzi**; obrigada por cada momento e cada risada.

Aos meus amigos mais próximos, que mesmo longe sempre estão ao meu lado para tudo: **Alexandra César, Keisuke Kira, Marye Ozawa e Miryan Meireles**; aos meus amigos de graduação que ingressaram comigo nessa vida USPiana, **Pedro Ornela e Thiago Polizei**.

À minha família, que sempre me apoia e me incentiva, principalmente: meus irmãos **Manuela e Samuel**, que tanto me ensinaram e me ensinam, que são o meu exemplo, me ajudam em tudo e sempre passam na frente abrindo o caminho para mim (afinal, eu sou a caçula); e aos que me deram a vida, meus pais **Manoel Agripino e Maria das Graças**, alicerces da minha vida, que me ensinaram a voar, que sempre me estimulam a crescer e me amam incondicionalmente. Se um dia eu for 1% do que vocês são, eu ficarei imensamente feliz, obrigada por tudo! Amo vocês imensamente!

Ao meu namorado **Lucas**, meu companheiro de estrada, só ele sabe de tudo o que aconteceu durante esse caminho. Obrigada pela amizade, pela cumplicidade, pela troca de experiências, pelo apoio, pelo exemplo, pelo incentivo, pela força e por sempre me apoiar, embarcar nas minhas loucuras e incorporar os meus sonhos aos seus. Te amo!

Por último, agradeço a **Deus**, que colocou cada uma dessas pessoas no meu caminho e me deu força, sabedoria e paciência para chegar até aqui.

RESUMO

Lima, Maria Victoria Cortez de Oliveira. **Caracterização genômica de homens inférteis com falência espermatogênica primária**. 2018. 149p. Dissertação (Mestrado), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo Ribeirão Preto, São Paulo – Brasil.

A infertilidade é uma doença do sistema reprodutivo considerada um problema de saúde pública global, afetando aproximadamente 15% dos casais e 7% dos homens. Falência espermatogênica primária é definida como incapacidade dos testículos produzirem espermatozoides, apesar do suporte hormonal adequado. Esse estudo é o primeiro a comparar dois grupos de pacientes com falência espermatogênica primária por meio da técnica *array-CGH+SNP*, utilizando a plataforma 4X180 (Agilent®). Adicionalmente, foram comparados os resultados obtidos por essa técnica com bancos de dados genômicos de expressão. Foram analisados vinte e três pacientes com falência espermatogênica primária, sendo sete com oligozoospermia extrema e dezesseis com azoospermia não obstrutiva, assim como seis homens comprovadamente férteis (grupo controle). A análise genômica foi realizada pelo *software* Nexus 8.0 e as análises de bancos de dados genômicos de expressão por meio do *software* Nexus Expression 3.0 com nível de significância de 5%. Os primeiros resultados evidenciaram diferenças de número e de tamanho das alterações genômicas (CNVs e LOHs) entre os dois grupos da amostra e o grupo controle, sendo a diferença do número de CNVs de perdas do grupo com oligozoospermia significativamente maior do que no grupo controle. O grupo de pacientes com azoospermia apresentou alterações genômicas de maior tamanho, entre 552pb a 11.3MB, quando comparado aos homens oligozoospermicos e ao grupo controle. A análise descritiva permitiu identificação de um gene candidato a fenótipo de falência espermatogênica primária na região 12q21.1-q21.2, o gene *GLIPR1L1*. Por meio da análise individualizada, identificamos dois genes candidatos ao fenótipo de infertilidade, o *SHH*, localizado na região 7q21.3, e o *TMEM184A*, localizado na região 7p22.3. Foram também descritas oito novas regiões de CNVs e LOHs nos dois grupos da amostra, direcionando novos estudos para correlação entre genótipo e fenótipo.

Palavras- chave: Espermatogênese, infertilidade masculina, reprodução humana.

ABSTRACT

Lima, Maria Victoria Cortez de Oliveira. **Genomic characterization of infertile men with primary spermatogenic failure**. 2018. 149p. Master's degree in Science, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, São Paulo - Brazil.

Infertility is a disease of the reproductive system and a global public health problem affecting approximately 15% of couples and 7% of men. Primary spermatogenic failure is defined as the inability of the testes to produce sperm although there is adequate hormonal support. This study is the first to compare two groups of patients with primary spermatogenic failure using array-CGH + SNP technique with the 4X180 (Agilent®) platform. Also, we compared the results obtained by this technique with genomic expression databases. Twenty-three patients with primary spermatogenic failure were analyzed, seven with extreme oligozoospermia and sixteen with nonobstructive azoospermia. We used six proven fertile men as a control group. Genomic analysis was performed by Nexus 8.0 software and analysis of genomic databases of expression was performed using the Nexus Expression 3.0 software with 5% significance level. Initial results showed differences in both the number and size of genomic alterations (CNVs and LOHs) between the two sampled infertility groups and the control group. The main difference was that the number of overall CNVs losses which was significantly higher in the oligozoospermia group than in the control group. The group of patients with azoospermia showed larger genomic alterations, between 552bp and 11.3MB size, compared to oligozoospermic men and the control group. A descriptive analysis was used to identify a candidate gene, *GLIPR1L1*, for the primary spermatogenic failure phenotype in the region 12q21.1-q21.2. Through individualized analysis, we identified two other candidate genes that may have a relationship with the infertility phenotype, *SHH*, located in the 7q21.3 region, and *TMEM184A*, located on the 7p22.3 region. Eight new areas of CNV and LOHs have also been described in the two sample groups, for more extensive genotype and phenotype correlative studies.

Key words: Spermatogenesis, male infertility, human reproduction.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Mapa demonstrando a distribuição global dos casos de infertilidade por fator masculino (AGARWAL et al, 2015 modificado). 23
- Figura 2** - Diferentes tipos de alterações quantitativas da espermatogênese e a frequência de fatores genéticos de cada categoria, demonstrando uma correlação inversa entre contagem de espermatozoides e prevalência de alterações genéticas (KRAUSZ & RIERA-ESCAMILLA, 2018 modificado). 27
- Figura 3** - Alterações cromossômicas relacionadas à infertilidade masculina. Região vermelha indica a região pseudo-autossômica ligada ao cromossomo X que foi translocada do cromossomo Y(SRY); Região azul indica região heterocromática do cromossomo Y (KRAUSZ & RIERA-ESCAMILLA, 2018 modificado). 29
- Figura 4** - Variações étnicas e geográficas da frequência das microdeleções de AZF pelo mundo (KRAUSZ et al., 2014). 30
- Figura 5** - Microdeleções do cromossomo Y. A Figura mostra as regiões onde as microdeleções estão inseridas no cromossomo Y, seu tamanho e frequência e o tipo de fenótipo e histologia dos testículos que costumam estar relacionados a cada microdeleção. SCOS- *Sertoli Cell-Only Syndrome*; SGA- *Spermatogenic Arrest*. (KRAUSZ & RIERA-ESCAMILLA, 2018 modificado). 31
- Figura 6** - Representação esquemática da espermatogênese humana contendo as seis mutações genéticas descritas para azoospermia / oligozoospermia: TEX11, TEX15, MCM8, SYCE1 ZMYND15 e TAF4B. Os genes foram colocados no esquema segundo sua função no processo espermatogênico (BRACKE et al., 2018 modificado). 34
- Figura 7** - Representação dos genes ligados ao fenótipo de teratozoospermia. A) Macrozoospermia – espermatozoides com cabeça aumentada e irregular e múltiplos flagelos. B) Globozoospermia – espermatozoides redondos com ausência do acrossoma (BRACKE et al., 2018 modificado). 35
- Figura 8** - Representação de um espermatozoide humano maduro contendo as classes de proteínas alteradas em homens astenozoospermicos: metabolismo energético, citoesqueleto e degradação/enovelamento de proteínas. As barras horizontais

mostram a região da célula espermática onde as classes funcionais de proteínas são expressas (BRACKE et al., 2018 modificado).	36
Figura 9 - Fluxograma da seleção dos pacientes utilizados no estudo (GRANGEIRO, 2017).	48
Figura 10. - Visão geral das alterações distribuídas por todo o genoma de todos os pacientes do grupo amostral e controle. Cada linha horizontal representa o resultado do paciente indicado à esquerda e as colunas verticais correspondem aos pares cromossômicos. Linhas horizontais azuis representam ganhos e as linhas vermelhas indicam perdas, por último, as linhas verticais e amarelas mostram LOHs	60
Figura 11 - Distribuição do número de alterações genômicas encontradas nos grupos [C- controle; EO- Oligozoospermia extrema; NOA- Azoospermia não obstrutiva; FEP- Falência espermatogênica primária (Oligozoospermia extrema + Azoospermia não obstrutiva)]. Cada gráfico representa um tipo de alteração genômica e cada ponto representa a quantidade de alterações presentes em um paciente.	61
Figura 12 - Distribuição do tamanho das alterações genômicas (CNVs de perda e ganho e LOHs) por indivíduo de cada grupo. C- controle; EO - Oligozoospermia extrema; NOA – Azoospermia não obstrutiva.	65
Figura 13 - A – Distribuição da média das alterações genômicas totais (CNVs e LOHs) por indivíduo de cada grupo entre os cromossomos. B- Distribuição da média de LOHs por indivíduo de cada grupo entre os cromossomos.	68
Figura 14 - Distribuição da média das variantes de número de cópias (CNVs) do tipo ganho e perda por indivíduo de cada grupo entre os cromossomos.	69
Figura 15 - Exemplificação do possível mecanismo formador de LOH de cópia neutra. Painel esquerdo: SNP heterozigoto; números indicam o número de cópias de cada alelo (normal = verde, mutante = vermelho). Painel do meio: deleção hemizigótica levando à perda do alelo normal. Painel direito: duplicação do alelo normal. A situação no painel do meio altera o número de cópias do gene, enquanto a situação no painel da direita representa número de cópias neutras.	99
Figura 16 - CNV de perda localizada na região 8p11.22. *linhas vermelhas indicam perdas.	102

Figura 17- CNV de perda localizada na região 15q11.2. *linhas vermelhas indicam perdas.	104
Figura 18- LOH localizada na região 3q11.2-q12.1. *linhas amarelas indicam LOH's.....	105
Figura 19 - LOH na região 11p11.2-p11.12. *linhas amarelas indicam LOH's.	106
Figura 20 - Receptores olfatórios expressos no espermatozoide (FLEGEL et al., 2016).	107
Figura 21 - LOH localizada na região 12q21.1-q21.2. *linhas amarelas indicam LOHs.	109
Figura 22 - LOH localizada na região 3q11.2-q12.3. *linhas amarelas indicam LOHs.	110
Figura 23 - LOH na região 11p11.12. *linhas amarelas indicam LOHs.	112
Figura 24 - CNV rara na região 2q31.3.....	113
Figura 25 - Perda na região 2q31.1 englobando o gene DLX2 em três pacientes com Oligozoospermia extrema. *linhas vermelhas indicam perdas.....	114
Figura 26 - Perda na região 2q31.1 englobando o gene DLX1 em dois pacientes com Azoospermia não obstrutiva. *linhas vermelhas indicam perdas.	115
Figura 27 - CNV rara na região genômica 7q21.3.	117
Figura 28 - CNV de ganho localizada na região genômica 7q21.3 englobando o gene PEG10 no paciente EO6. *linhas azuis indicam ganhos.....	118
Figura 29 - CNV de perda localizada na região genômica 7q21.3 englobando o gene PEG10 no paciente EO1.. *linhas vermelhas indicam perdas.	119
Figura 30 - CNV rara na região 7q36.3.....	121
Figura 31 - CNV de ganho localizada na região genômica 7q36.3 englobando o gene SHH no indivíduo NOA1. *linhas azuis indicam ganhos.	122
Figura 32 - CNV de perda localizada na região genômica 7q36.3 englobando o gene SHH no paciente EO1. *linhas vermelhas indicam perdas.	123
Figura 33 - CNV de perda localizada na região genômica 7p22.3 englobando o gene <i>TMEM184A</i> no indivíduo EO1. *linhas vermelhas indicam perdas.	124

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Análises de variância utilizadas de acordo com a distribuição normal dos dados. 55
- Tabela 2** - Número de alterações genômicas encontradas nos grupos controle e amostral. C1 a C6 = controles; EO1 a EO7 = pacientes com oligozoospermia extrema; NOA1 a NOA16 = pacientes com azoospermia. 59
- Tabela 3** - Média do número de alterações do tipo ganho, perdas e LOHs detectadas nos grupos controle e amostral, seguido pelos resultados da análise estatística para cada teste. C- Controle; EO- Oligozoospermia extrema; NOA- Azoospermia não obstrutiva; FEP- Falência espermatogênica primária (Oligozoospermia extrema + Azoospermia não obstrutiva). 62
- Tabela 4** - Distribuição dos intervalos de tamanho das alterações genômicas (CNVs de perda e ganho e LOHs) para cada grupo. C- Controle; EO- Oligozoospermia extrema; NOA- Azoospermia não obstrutiva. 63
- Tabela 5** - Alterações do tipo variação de número de cópias (CNVs) de perda e ganho encontradas nos dois grupos com falência espermatogênica primária. EO - Oligozoospermia extrema; NOA – Azoospermia não obstrutiva 71
- Tabela 6** - Alterações de perda de heterozigose (LOHs) encontradas nos dois grupos com falência espermatogênica primária. EO - Oligozoospermia extrema; NOA – Azoospermia não obstrutiva..... 73
- Tabela 7** - Alterações genômicas encontradas por meio da análise descritiva nos pacientes com oligozoospermia extrema. EO - Oligozoospermia extrema..... 79
- Tabela 8** - Alterações genômicas encontradas por meio da análise descritiva nos pacientes com azoospermia não obstrutiva. NOA – Azoospermia não obstrutiva. 80
- Tabela 9** - Alterações de variação de número de cópias (CNVs) do tipo ganho encontradas no grupo amostral após a análise individualizada. EO - Oligozoospermia extrema; NOA – Azoospermia não obstrutiva..... 82
- Tabela 10** - Alterações de variação de número de cópias (CNVs) do tipo perda encontradas no grupo amostral após a análise individualizada. EO - Oligozoospermia extrema; NOA – Azoospermia não obstrutiva..... 84

Tabela 11 - Genes diferencialmente expressos em pacientes com azoospermia encontrados em comum com os resultados obtidos por array-CGH. C- Controle; EO- Oligozoospermia extrema; NOA- Azoospermia não obstrutiva; FEP- Falência espermatogênica primária (Oligozoospermia extrema + Azoospermia não obstrutiva).....	86
Tabela 12 - Genes diferencialmente expressos em indivíduos com teratozoospermia encontrados em comum com análises de array-CGH. C- Controle; EO- Oligozoospermia extrema; NOA- Azoospermia não obstrutiva; FEP- Falência espermatogênica primária (Oligozoospermia extrema + Azoospermia não obstrutiva).....	90
Tabela 13 - Regiões já descritas na literatura relacionadas a infertilidade masculina.	142

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIFE	Ambulatório de Infertilidade Conjugal
<i>array-CGH</i>	do inglês, Array Comparative Genomic Hybridization
ASRM	do inglês, American Society for Reproductive Medicine
AZF	do inglês, Azoospermic Factor
BSA	do inglês, Bovine Serum Albumin
CAP	do inglês, Cataboline Activator Protein
CNP	do inglês, Copy Number Polymorphisms
CNV	do inglês, Copy Number Variation
DNA	do inglês, Deoxyribonucleic Acid
dNTP	do inglês, Deoxyribonucleic Triphosphate
dUTP	do inglês, Deoxyuridine Triphosphate
EAA	do inglês, European Academy of Andrology
EDTA	Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético
EMQN	do inglês, European Molecular Genetics Quality Network
EO	do inglês, Extreme Oligozoospermia
FASST2	do inglês, Fast Adaptative States Segmentation Technique
FMRP-USP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FSH	do inglês, Follicule-Stimulating Hormone
GEN-3	Ambulatório de Genética Médica 3 do HCFMRP-USP
GEO	do inglês, Gene Expression Omnibus
GNRH	do inglês, Gonadotropin-Releasing Hormone
GO	do inglês, Gene Ontology
GRCh37	do inglês, Genome Reference Consortium Human genome build 37
GSE	do inglês, Genomic Spatial Event
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP
Hg19	do inglês, Human Genome Version 19
Ks	do inglês, Kallmann Syndrome
LH	do inglês, Luteinizing Hormone
LOH	do inglês, Loss of Heterozygosity
MPC	do inglês, Protein Precipitation Solution
NCBI	do inglês, National Center for Biotechnology Information
NOA	do inglês, Non-obstructive Azoospermia
OA	do inglês, Obstructive Azoospermia
OAT	do inglês, Oligoastenoteratozoospermia
OMIM	do inglês, Online Mendelian Inheritance in Men
OMS	Organização Mundial da Saúde
pH	Potencial de Hidrogênio
PubMed	do inglês, National Library of Medicine
RNA	do inglês, Ribonucleic Acid
SCOS	do inglês, Sertoli Cell-Only Syndrome
SGA	Do inglês, Spermatogenic Arrest
SIPA	Síndrome de Insensibilidade Androgênica Parcial

SNP	do inglês, Single Nucleotide Polymorphism
SRY	do inglês, Sex-determining Region Y
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tampão Tris-EDTA
UCSC	do inglês, University of California, Santa Cruz
US	United States
USA	United States of America
USP	Universidade de São Paulo
VACTERL	do inglês, Vertebral Defects, Anal Atresia, Cardiac Defects, Tracheo- esophageal Fistula, Renal Anomalies, and Limb Abnormalities.
WHO	do inglês, World Health Organization

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	Graus Celsius
<i>g</i>	Unidade de aceleração não pertencente ao Sistema Internacional
xg	Por giro
h	Hora
pb	Par de base
kb	Quilobase
Mb	Megabase
μL	Microlitro
mL	Mililitro
dL	Decilitro
ng	Nanograma
μg	Micrograma
p	Braço curto do cromossomo
q	Braço longo do cromossomo
rpm	Rotação por minuto
V	Volt
%	Porcentagem

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	22
2. JUSTIFICATIVA	39
3. HIPÓTESE	41
4. OBJETIVOS	43
4.1. Objetivo geral	43
4.2. Objetivos específicos.....	43
5. METODOLOGIA	45
5.1. Material.....	45
5.1.1. Casuística.....	45
5.1.1.1. Critérios de inclusão	45
5.1.1.2. Critérios de exclusão	46
5.1.1.3. Grupo amostral.....	46
5.1.1.3.1. Pacientes com azoospermia não obstrutiva idiopática	46
5.1.1.3.2. Pacientes com oligozoospermia extrema idiopática	47
5.1.1.4 Grupo controle.....	49
5.1.2. Amostra	49
5.2. Método	49
5.2.1. Extração de DNA.....	49
5.2.2. Técnica de hibridação genômica comparativa em microarranjo (<i>array</i> - CGH) .	50
5.2.2.1. Verificação de pureza e integridade dos DNAs	50
5.2.2.2. Digestão enzimática e fragmentação das amostras	51
5.2.2.3. Marcação dos DNAs.....	51
5.2.2.4. Purificação das amostras	52
5.2.2.5. Hibridação	52
5.2.2.6. Lavagem.....	53
5.2.2.7. Escaneamento e extração dos dados	53
5.2.2.8. Análise bioinformática	53
5.2.3. Análise estatística.....	54
5.2.4. Análise de expressão por meio de bancos de dados públicos	55
6. RESULTADOS	58
6.1. Análise inicial.....	58
6.1.1. Quantidade de alterações genômicas	58

6.1.2. Tamanho das alterações genômicas.....	62
6.1.3. Localização das alterações genômicas	66
6.1.4. Análise das regiões encontradas por meio da técnica de <i>array</i> -CGH	70
6.1.4.1. Análise descritiva.....	70
6.1.4.2. Análise individualizada	70
6.1.5. Análise de expressão gênica.....	85
7. DISCUSSÃO.....	98
7.1. Alterações genômicas em comum aos dois grupos de pacientes com falência espermatogênica primária (Oligozoospermia extrema + azoospermia não obstrutiva)	100
7.1.1. Genes da família ADAM	100
7.1.2. Genes da família de receptores olfatórios (<i>ORs</i>).....	101
7.1.3. Genes da família <i>GLI</i> (<i>Gli Pathogenesis-Related Family GLIPR</i>).....	107
7.1.4. Gene <i>ARL6</i> (<i>ADP Ribosylation Factor Like GTPase 6</i>).....	108
7.1.5. CNVs associadas á falência espermatogênica primária já descritas na literatura	111
7.2. Alterações genômicas distintas aos dois grupos de pacientes com falência espermatogênica primária (Oligozoospermia extrema + azoospermia não obstrutiva)	111
7.2.1. Genes da família <i>DLX</i> (<i>Distal-Less Homeobox</i>)	111
7.3. Alterações genômicas individuais.....	116
7.1.3. Gene <i>PEG10</i> (<i>Paternally Expressed 10</i>).....	116
7.1.4. Gene <i>SHH</i> (<i>Sonic Hedgehog Gene</i>).....	120
7.1.5. Gene <i>TMEM184A</i> (<i>Heparin Receptor Transmembrane Protein 184A</i>).....	120
8. CONCLUSÃO	126
9. REFERÊNCIAS	128
10. ANEXOS.....	139
10.1. Anexo 1 – Comitê de ética em pesquisa	139
10.2. Anexo 2 - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	140
11. APÊNDICES.....	142
11.1. Apêndice 1	142

INTRODUÇÃO

1. Introdução

A infertilidade é uma doença do sistema reprodutivo considerada um problema de saúde pública global. Estima-se que cerca de 15% dos casais, mais de 186 milhões de pessoas, em sua maioria de países desenvolvidos, sofram com essa condição (AGARWAL et al., 2015; INHORN & PATRIZIO, 2015; KHERRAF et al., 2017; VANDER BORGHT & WYNS, 2018). Ela é definida como a falha de concepção depois de um ano de tentativas reprodutivas regulares sem uso de métodos contraceptivos (ZEGERS-HOCHSCHILD et al., 2009; WHO, 2010; BISHT et al., 2017). Possui etiologia multifatorial, podendo ocorrer devido à idade, à obesidade, a fatores relacionados ao estilo de vida, a doenças infecciosas, a alterações imunológicas, hormonais, psicológicas, físicas ou a alterações nos gametas (SHAH et al., 2003; RATO et al., 2012; LEAVER, 2016; BIENIEK et al., 2016; VANDER BORGHT & WYNS, 2018).

É importante destacar que, apesar da definição de infertilidade, o tempo de não concepção é um importante fator a ser analisado. Estima-se que 80% das gestações ocorrem nos primeiros seis ciclos de relação sexual desprotegida no período fértil. Metade dos casais restante deve conceber espontaneamente nos próximos seis ciclos. Após doze ciclos sem sucesso, 10% dos casais são definidos como inférteis. Porém, é possível que haja taxas espontâneas de nascidos vivos de quase 55% nos próximos trinta e seis meses. Após quarenta e oito meses de tentativas recorrentes sem uso de métodos contraceptivos, 5% dos casais são definitivamente inférteis e possuem chance próxima a zero de engravidar espontaneamente (GNOTH et al., 2005).

Durante muito tempo, os fatores masculinos não foram investigados. Os primeiros dados de prevalência da infertilidade masculina foram divulgados em 1990, relatando que 10% dos homens em idade reprodutiva procuravam avaliação e 20% deles apresentavam algum fator relacionado à infertilidade (THONNEAU et al., 1991; SMITH et al., 2014).

Estudos posteriores indicam que a infertilidade masculina afeta aproximadamente 7% dos homens (FERLIN et al., 2007; KRAUSZ, CIOPPI & RIERA-ESCAMILLA, 2018). Os fatores masculinos são inteiramente responsáveis por 20 a

30% dos casos de infertilidade e contribuem em 50% dos eventos (ASRM, 2015; VANDER BORGHT & WYNS, 2018). Em 2015, Agarwal e colaboradores observaram que essa frequência apresenta diferenças regionais. Porém, enfrentaram três principais dificuldades para realizar o estudo:

I. A população investigada é extremamente específica devido a serem investigados apenas casais que procuraram serviços de fertilidade em virtude do não sucesso reprodutivo;

II. Fatores culturais e tradicionais, como por exemplo, sociedades extremamente patriarcais que tem o costume de culpar as mulheres pela infertilidade e desconsiderar os fatores masculinos; ou o chamado “chiramu” na África, em que é comum na situação de não sucesso reprodutivo, o homem infértil permitir que o irmão engravide a sua esposa para que, dessa forma, sua masculinidade não seja afetada aos olhos da sociedade;

III. Devido a infertilidade ter sido classificada como doença há muito pouco tempo, não há registros suficientes para estimar sua prevalência real.

Ao final do processo, mesmo enfrentando essas dificuldades, esse grupo conseguiu estabelecer uma distribuição heterogênea para a infertilidade masculina. As maiores frequências foram documentadas no leste europeu e oriente médio, e as menores foram documentadas no continente africano e asiático (Figura 1).

Figura 1 - Mapa demonstrando a distribuição global dos casos de infertilidade por fator masculino (AGARWAL et al, 2015 modificado).

Os fatores responsáveis pela infertilidade masculina abrangem desde anomalias urogenitais congênitas ou adquiridas, neoplasias, infecções do trato urogenital, aumento da temperatura escrotal, disfunções endócrinas, fatores imunológicos até algumas condições genéticas já estabelecidas (JUNGWIRTH et al., 2015). Entretanto, na maioria das vezes, a infertilidade masculina é diagnosticada como uma doença idiopática e estima-se que em 30 a 40% dos casos as causas permaneçam desconhecidas (NIESCHLAG et al., 2013; JUNGWIRTH et al., 2015). Esses homens não têm histórico de doenças que afetam a fertilidade e mostram resultados normais em exames físicos e testes laboratoriais endócrinos, genéticos e bioquímicos, porém muitas vezes apresentam parâmetros seminais alterados (BRACKE et al., 2018).

Sendo assim, a espermatogênese tem uma grande importância na investigação da infertilidade por fator masculino e o espermograma ainda é considerado o principal método de avaliação do potencial de fertilidade. Para a análise do espermograma devem ser realizadas pelo menos duas coletas com intervalo de 3 a 4 semanas entre elas, pois é comum a variação intraindividual da quantidade de espermatozoides (BRACKE et al., 2018).

Em 2010, a Organização Mundial da Saúde (OMS) revisou os parâmetros seminais e os principais aspectos analisados foram a concentração, a motilidade progressiva e a morfologia dos espermatozoides (WHO, 2010). A partir desse estudo, realizado com 1900 homens férteis de oito países, foram estabelecidos valores padrão utilizados para estabelecer os valores de referência limite para os parâmetros seminais, adotando um intervalo de confiança de 95%. São eles:

- I. Volume: 1,5 mL;
- II. Concentração espermática: Igual ou acima de 15 milhões de espermatozoides/mL;
- III. Número total de espermatozoides: 39 milhões de espermatozoides por ejaculado;
- IV. Motilidade total (progressiva + não progressiva): 40%;
- V. Motilidade progressiva: 32%;
- VI. Morfologia: 4% de formas normais de espermatozoides;
- VII. Vitalidade: 58% de espermatozoides vivos.

Esses valores de referência permitiram a definição de quatro tipos de alterações espermáticas: Astenozoospermia, Teratozoospermia, Oligozoospermia e Azoospermia.

A astenozoospermia é caracterizada por uma motilidade progressiva dos espermatozoides abaixo de 32%. Representa uma causa comum de infertilidade masculina, sendo observada em até 81% de todas as alterações de sêmen e frequentemente combinada com a oligozoospermia ou a teratozoospermia.

A teratozoospermia é caracterizada pela redução de formas normais dos espermatozoides a índices menores que 4%, ou seja mais de 96% dos espermatozoides da amostra apresentam morfologia anormal. Existem dois fenótipos relacionados à teratozoospermia: a macrozoospermia, que é caracterizada pela presença de uma alta quantidade de espermatozoides com cabeças em formato irregular, aumentadas, com múltiplos flagelos e alta taxa de poliploidia; e a globozoospermia, caracterizada pela presença de uma alta frequência de espermatozoides redondos com ausência de acrossoma, resultando em sua incapacidade de aderir e/ou penetrar na zona pelúcida.

Já a oligozoospermia é caracterizada por uma concentração espermática inferior a 15 milhões de espermatozoides por mL de ejaculado (WHO, 2010; ZEGERS-HOCHSCHILD et al., 2017). Esse tipo de alteração foi dividida segundo sua gravidade. A divisão mais comumente adotada segundo a literatura (MCLACHLAN & O'BRYAN, 2010; STAHL & SCHLEGEL, 2012; MASSART et al., 2012; MIYAMOTO et al., 2015; MARSHBURN, 2015; SONG et al., 2016) é:

- Oligozoospermia leve: 10 a 15 milhões de espermatozoides por mL;
- Oligozoospermia moderada: 5 a 10 milhões de espermatozoides por mL;
- Oligozoospermia grave: menos de 5 milhões de espermatozoides por mL.

Outros trabalhos, como o de Stegen e colaboradores (2012), utilizaram a classificação onde a oligozoospermia foi dividida em moderada (entre 15 a 5 milhões de espermatozoides por mL de ejaculado), grave (entre 5 e 1 milhão de espermatozoides por mL de ejaculado) e extrema (menor que 1 milhão de espermatozoides por mL de ejaculado).

O estudo publicado por Punab e colaboradores (2016), avaliando 1737 pacientes com contagens de espermatozoides totais reduzidas, mostrou que em 60% dos casos o fator causal primário não pôde ser encontrado, sendo que quase 75% de todos os casos de oligozoospermia permaneceram idiopáticos.

Por último, a azoospermia, caracterizada pela ausência de espermatozoides no ejaculado e considerada o fenótipo clinicamente mais grave de infertilidade masculina. Ela é identificada em 11% dos homens inférteis e em 40% dos casos é causada por um bloqueio físico no sistema ductal masculino. Esse tipo de azoospermia é denominada azoospermia obstrutiva (OA), e sua etiologia é mais conhecida. O restante dos casos são denominados de azoospermia não obstrutiva (NOA) e frequentemente estão associados à falência testicular, caracterizada por menor volume testicular e elevadas concentrações de LH e FSH (WOSNITZER et al., 2014).

A combinação das alterações de concentração, motilidade e morfologia espermática é conhecida como Oligoastenoteratozoospermia (OAT) (MIHARU, 2005; WHO, 2010).

Conhecida como uma doença multifatorial, a infertilidade masculina é frequentemente associada a fatores genéticos, sendo 15% dos casos associados a doenças genéticas que incluem desde alterações cromossômicas até mutações gênicas (FERLIN et al., 2007; SUGANYA et al., 2015).

O primeiro teste genético realizado em pacientes com alterações espermátogênicas quantitativas é o cariótipo. Cerca de 15% dos homens com azoospermia não obstrutiva e 4% dos homens com oligozoospermia moderada apresentam anomalias cromossômicas. As translocações robertsonianas são as alterações cromossômicas estruturais mais comuns, encontradas em 1 a cada 1000 recém-nascidos. Elas são responsáveis por 0.9% dos casos de infertilidade, sendo dez vezes mais frequentes em homens com oligozoospermia quando comparados a homens com normozoospermia, ocorrendo em cerca de 4 a 8% dos casos. A presença dessas anomalias cromossômicas nos espermatozoides aumenta o risco de aneuploidias, de rearranjos cromossômicos não equilibrados e de doenças de *imprinting* no feto. As inversões cromossômicas também são relevantes para o

fenótipo de infertilidade masculina e são encontradas em cerca de 3 a 5% dos casos (NETO et al., 2016; KRAUSZ & RIERA-ESCAMILLA, 2018).

A literatura descreve que homens com produção normal de espermatozoides possuem um número menor de alterações cromossômicas quando comparados com pacientes com produção de espermatozoides abaixo do limiar. A frequência de alterações é inversamente proporcional à produção de espermatozoides, sendo que homens com produção normal possuem uma frequência de 1% de alterações cromossômicas, enquanto que a frequência é de 5% em oligozoospermicos e de 10 a 15 % em azoospermicos (PYLYP et al., 2013; FLANNIGAN & SCHLEGEL, 2017). A gravidade de tais alterações também segue esse padrão, pois homens com azoospermia apresentam uma frequência maior de aneuploidias, enquanto que pacientes com oligozoospermia costumam apresentar aberrações de origem estrutural (SMITH et al., 2014; XIE et al., 2018) (Figura 2).

Figura 2 - Diferentes tipos de alterações quantitativas da espermatogênese e a frequência de fatores genéticos de cada categoria, demonstrando uma correlação inversa entre contagem de espermatozoides e prevalência de alterações genéticas (KRAUSZ & RIERA-ESCAMILLA, 2018 modificado).

Entre as alterações cromossômicas, a síndrome de Klinefelter é a aneuploidia mais frequente entre os homens, além de ser a mais comum em humanos. Sua incidência é de 1 a cada 660 nascidos vivos e 1 a cada 300 abortos espontâneos. Está associada com os cariótipos 47,XXY, podendo apresentar também a forma de mosaico 46,XY/47,XXY (Figura 3). Esses pacientes possuem função reprodutiva prejudicada devido ao quadro clínico que inclui sinais de deficiência androgênica e níveis elevados de LH e FSH, indicando hipogonadismo hipergonadotrófico. O fenótipo mais comum é a ausência de espermatozoides e aproximadamente 90% dos

pacientes que não apresentam mosaico são azoospérmicos. No entanto, existem casos raros, principalmente relacionados a diferentes mosaicismos, em que pode ocorrer uma baixa produção de espermatozoides (AKSGLÆDE & JUUL, 2013; CALOGERO et al., 2017; KRAUSZ, CIOPPI & RIERA-ESCAMILLA, 2018; KRAUSZ & RIERA-ESCAMILLA, 2018). Essa aneuploidia é responsável pela infertilidade em 5% dos oligozoospérmicos e em 11% dos azoospérmicos (FERLIN et al., 2007; STAHL & SCHLEGEL, 2012; GROTH et al., 2013; NETO et al., 2016).

Conhecido como síndrome de La Chapelle, o homem 46, XX é uma doença rara quando comparada à Síndrome de Klinefelter, com prevalência de 1:20.000 homens recém-nascidos e responsável por cerca de 0.9% dos casos de azoospermia (NETO et al., 2016; KRAUSZ, CIOPPI & RIERA-ESCAMILLA, 2018; KRAUSZ & RIERA-ESCAMILLA, 2018). Seu fenótipo inclui ginecomastia e azoospermia devido à ausência dos genes AZF localizados no cromossomo Y (VORONA et al., 2007). Em aproximadamente 90% dos casos, essa condição está associada à presença do gene SRY (fator determinante de testículo), translocado para o cromossomo X (Figura 3). Os casos restantes podem ocorrer devido à ativação de genes *downstream* do SRY envolvidos na cascata de determinação dos testículos, como o SOX9 e o DAX1 (VETRO et al., 2011; HOTALING & CARRELL, 2014; BASHAMBOO & MCELREAVEY, 2016; NETO et al., 2016; KRAUSZ, CIOPPI & RIERA-ESCAMILLA, 2018; KRAUSZ & RIERA-ESCAMILLA, 2018).

A síndrome de Jacobs, caracterizada pelo cariótipo 47, XYY (Figura 3) possui uma prevalência relativamente alta, ocorrendo em 1 a cada 750 homens. Os afetados apresentam uma grande diversidade no grau de espermatogênese, variando de oligozoospermia grave a normozoospermia. Nesses pacientes ocorre produção prejudicada de espermatozoides devido a uma distorção na formação de vesículas sexuais, levando a alteração espermatogênica (NETO et al., 2016; KRAUSZ, CIOPPI & RIERA-ESCAMILLA, 2018; KRAUSZ & RIERA-ESCAMILLA, 2018).

Figura 3 - Alterações cromossômicas relacionadas à infertilidade masculina. Região vermelha indica a região pseudo-autossômica ligada ao cromossomo X que foi translocada do cromossomo Y (SRY); Região azul indica região heterocromática do cromossomo Y (KRAUSZ & RIERA-ESCAMILLA, 2018 modificado).

Entre os fatores gênicos, as microdeleções do cromossomo Y são a causa mais comum de infertilidade masculina. Essas regiões que coordenam a espermatogênese (VINEETH & MALINI, 2011), são conhecidas como *AZF* (fator de azoospermia), divididas em *AZFa*, *AZFb* e *AZFc* (VOG et al., 1996). As microdeleções são responsáveis por 5 a 10% dos oligozoospermicos e 10 a 15% dos azoospermicos. (JUNGWIRTH et al., 2015; Yu et al., 2015; KRAUSZ & CASAMONTI, 2017). Essas alterações possuem variações étnicas e geográficas que podem ser observadas na Figura 4, mostrando as frequências das microdeleções de Y em pacientes inférteis no mundo (KRAUSZ et al., 2014). A microdeleção de *AZFc* é a mais frequente, presente em 66% dos casos, seguida pelas deleções de *AZFb+c* com 13%, *AZFb* com 11% ou *AZFa+b+c* e *AZFa* responsável por 10% dessas microdeleções (NETO et al., 2016).

Figura 4 - Variações étnicas e geográficas da frequência das microdeleções de AZF pelo mundo (KRAUSZ et al., 2014).

A avaliação diagnóstica para estudo das regiões de AZF é capaz de identificar cinco tipos caracterizados por diferentes alterações, responsáveis pela infertilidade:

1. *AZF_a*: Possui dois genes de cópia única relacionados à fertilidade, o *USP9Y* e *DDX3Y* (NETO et al., 2016).
2. *AZF_b*: Possui três genes de cópia única, *EID1AY*, *RPS42* e *KDM5D* e dois genes de múltiplas cópias *RBMV* e *PRY* (KRAUSZ & CASAMONTI, 2017).
3. *AZF_{b+c}*: Relacionado a uma região de 1,5Mb em que há uma sobreposição das duas regiões (FLANNIGAN & SCHLEGEL, 2017).
4. *AZF_c* (b2/b4). Padrão de microdeleção mais comum, encontrado em cerca de 2 a 5% dos oligozoospermicos e 5 a 10% dos azoospermicos. Abrange cinco genes de múltiplas cópias, *BPY2*, *CDY*, *DAZ*, *CSPG4LY* e *GOLGAZLY* (NETO et al., 2016; FLANNIGAN & SCHLEGEL, 2017).
5. *AZF_c* (b1/b3, b2/b3 e gr/gr): Deles a microdeleção gr/gr é a mais relevante. Pacientes com essa alteração tem maior risco de apresentar oligozoospermia, porém os fenótipos variam entre normozoospermia e azoospermia. Um estudo feito com populações espanholas e italianas mostrou que a frequência dessas microdeleções em pacientes com oligozoospermia é de 3,2 a 3,9%, valores

maiores que os encontrados em pacientes normozoospermicos que é de 0,4 a 1,4% (KRAUSZ, CIOPI & RIERA-ESCAMILLA, 2018).

Na Figura 4 é possível visualizar algumas das microdeleções de AZF, assim como sua incidência, localização e tamanho.

Figura 5 - Microdeleções do cromossomo Y. A Figura mostra as regiões onde as microdeleções estão inseridas no cromossomo Y, seu tamanho e frequência e o tipo de fenótipo e histologia dos testículos que costumam estar relacionados a cada microdeleção. SCOS- *Sertoli Cell-Only Syndrome*; SGA- *Spermatogenic Arrest* (KRAUSZ & RIERA-ESCAMILLA, 2018 modificado).

Segundo Asero e colaboradores (2014) muitos genes são necessários para o desenvolvimento gonadal e sexual e para a espermatogênese, porém apenas alguns são relevantes. Mutações nos genes *KAL-1*, *CFTR*, *AR* e *INSL3-RXFP2* são exemplos de alterações importantes quando se trata da infertilidade masculina.

Entre eles, o *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) é o de maior relevância. Ele está associado com a infertilidade masculina, causando azoospermia em 95% dos casos. Isso ocorre devido a uma mutação na sua proteína. Essa proteína influencia a formação do ducto ejaculatório, da vesícula seminal e outras regiões do aparelho reprodutor masculino (JUNGWIRTH et al., 2015).

Outro gene que merece ser destacado é o *KAL-1*, que codifica uma importante proteína de adesão (anosmin-1) que desempenha um papel relevante na liberação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GNRH). Ele foi o primeiro gene relacionado com a síndrome de Kallmann (KS) caracterizada por hipogonadismo hipogonadotrófico, puberdade tardia, olfato defeituoso e infertilidade (NETO et al., 2016; FLANNIGAN & SCHLEGEL, 2017).

A falência espermatogênica primária é uma condição em que os testículos não conseguem produzir espermatozoides, apesar do suporte hormonal adequado. É uma das principais causas de azoospermia não obstrutiva (NOA) e oligospermia. Afeta aproximadamente 1% de todos os homens e 10% dos que procuram avaliações de fertilidade (JAIN et al., 2017).

A espermatogênese abrange uma rede complexa de processos que acontecem nos túbulos seminíferos dos testículos. Os processos subsequentes da espermatogênese são proliferação de espermatogônias, diferenciação espermatogonial em espermatócitos, divisão meiótica de espermatídes arredondadas e a liberação de espermatozoides maduros altamente especializados no lúmen do túbulo testicular (NETO et al., 2016). Acredita-se que mutações em qualquer gene relacionado com essas etapas podem levar direta ou indiretamente a anormalidades em um desses processos espermatogênicos, podendo resultar em infertilidade masculina. Sendo assim, a espermatogênese tem uma importante relação com a infertilidade masculina (KRAUSZ, 2015).

Estima-se que existam cerca 2.300 genes envolvidos com a espermatogênese (HOCHSTENBACH & HACKSTEIN, 2000; ASTON, 2014). Acredita-se que 600 a 900 desses genes sejam expressos exclusivamente nos testículos (CHALMEL et al., 2012).

Polimorfismos em diferentes genes têm sido estudados para determinar uma possível associação entre eles e a infertilidade masculina (FERLIN, 2007). Aproximadamente 314 SNPs (*Single Nucleotide Polymorphism*) já foram identificados em 123 genes, sendo que 10 genes estão disponíveis para meta análise: *AR*, *CYP11A1*, *DAZL*, *ESR1*, *ESR2*, *MTHFR*, *NOS3*, *POLG*, *TP53* e *USP26* (KRAUSZ et al., 2015). Outros genes relacionados à espermatogênese são: *SYCP3* (YUAN et al., 2000), *KLHL10* (YATSENKO et al., 2006), *AURKC* (DIETERICH et al., 2007) e *SPATA16* (DAM et al., 2007), descritos por meio de estudos com camundongos *knockout* (MIYAMOTO et al., 2015).

Outro aspecto que parece ter uma relação significativa com a infertilidade é a origem étnica, que parece influenciar a expressão fenotípica da infertilidade. Algumas evidências foram demonstradas por meio de investigação dos genes *MTHFR*, *ESR1*,

ESR2, *NOS3* e *DAZL*. O uso de novas técnicas e aumento dos estudos na área tornam possível a identificação de novos genes candidatos relacionados com tal fenótipo. Em um estudo de Li e colaboradores (2015), por exemplo, foram identificados genes que podem ser a chave para a regulação epigenética da espermatogênese. Eles são *BRWD1*, *DNMT1*, *DNMT3B*, *RNF17*, *UBR2*, *USP1* e *USP26*.

Apesar de esses genes serem candidatos a estarem relacionados com a infertilidade masculina, poucos estão comprovadamente envolvidos com o fenótipo. Um dos raros sucessos ao identificar mutações causais relacionadas com a infertilidade masculina é o gene *TEX11*, localizado no cromossomo X. Ele codifica uma proteína crítica para células germinativas masculinas sendo que camundongos machos *knockout TEX11* apresentam parada meiótica no estágio paquíteno devido à incapacidade de reparar quebras de DNA de fita dupla. (ALDEMAN & PETRINI, 2008; YANG et al., 2015; YATSENKO et al., 2017).

Em um estudo de Mitchell e colaboradores (2017) foram descritas alterações genéticas relacionadas aos fenótipos de azoospermia e oligozoospermia. Nele, foi descrito apenas um gene relacionado com o fenótipo de infertilidade, o gene *KLHL10*. Estudos com camundongos com haploinsuficiência desse gene resultaram em animais com redução da produção de espermatozoides (YAN et al., 2004). Além disso, no mesmo estudo, foram destacados cinco genes, fortes candidatos a causas genéticas de NOA autossômica recessiva, identificados por meio de estudos de consanguinidade, onde foram avaliadas famílias com múltiplos filhos azoospermicos. Dois deles, *ZMYND15* e *TAF4B* têm relação com a regulação transcricional durante a espermatogênese e três deles *SYCE1*, *MCM8* e *TEX15* estão relacionados à sinapse de cromossomos homólogos e recombinação homóloga meiótica (Figura 6). Por essas mutações serem extremamente raras, estudos em camundongos *knockdown* foram realizados para a validação dessas causas monogênicas. Esses trabalhos, em sua maioria, resultaram em animais inférteis com azoospermia. Apenas os camundongos *knockdown* do gene *TAF4B* apresentaram um fenótipo testicular único, possuindo fertilidade normal em idades precoces seguido de perda acelerada de contagem de espermatozoides e terminando inférteis (FALENDER et al., 2005; YANG et al., 2008; BOLCUN-FILAS et al., 2009; YAN et al., 2010; AYHAN et al., 2014; MAOR-SAGIE et al., 2015; OKUTMAN et al., 2015; TENENBAUM-RAKOVER et al., 2015).

Figura 6 - Representação esquemática da espermatogênese humana contendo as seis mutações genéticas descritas para azoospermia / oligozoospermia: *TEX11*, *TEX15*, *MCM8*, *SYCE1*, *ZMYND15* e *TAF4B*. Os genes foram colocados no esquema segundo sua função no processo espermatogênico (BRACKE et al., 2018 modificado).

Ray e colaboradores (2017) estudaram os genes envolvidos com o fenótipo de teratozoospermia. Nesse estudo, estimou-se que 80% dos pacientes apresentavam fenótipos relacionados a uma mutação no gene *AURKC* para macrozoospermia ou *DPY19L2* para globozoospermia. O *AURKC* é um componente do complexo cromossômico passageiro (CPC) que regula os eventos mitóticos, garantindo o alinhamento e a segregação cromossômica, sendo assim necessário para a estabilização e montagem do fuso mitótico. Mutações nesse gene levam, portanto, à alteração da meiose e à produção de gametas desequilibrados, resultando em alta taxa de poliploidia (Figura 7A) (COUTTON et al., 2015). Por sua vez, o gene *DPY19L2* é necessário para ancorar o acrossoma ao núcleo. Estudos com camundongos *knockout* para *DPY19L2* mostraram que a ausência desse gene gerava um acrossoma que se separava lentamente do núcleo antes de ser totalmente removido do espermatozoide junto ao citoplasma (Figura 7B) (PIERRE et al., 2012).

Em um estudo com pacientes com globozoospermia e consanguinidade, foi identificada uma mutação homozigótica no gene *SPATA16* (DAM et al., 2007). Esse gene desempenha um papel essencial na formação do acrossoma durante a espermatogênese (Figura 7B) (LU et al., 2006).

Figura 7 - Representação dos genes ligados ao fenótipo de teratozoospermia. A) Macrozoospermia – espermatozoides com cabeça aumentada e irregular e múltiplos flagelos. B) Globozoospermia – espermatozoides redondos com ausência do acrossoma (BRACKE et al., 2018 modificado).

Até o momento, foram realizadas seis análises de proteoma em pacientes com astenozoospermia que resultaram em uma lista de 128 proteínas alteradas. Nelas estão representadas principalmente três classes funcionais envolvidas com o citoesqueleto, o metabolismo energético, o enovelamento e a degradação de proteínas (ZHAO et al., 2007; MARTÍNEZ-HEREDIA et al., 2008; SIVA et al., 2010; SHEN et al., 2013; AMARAL et al., 2014; HASHEMITABAR et al., 2015). A localização dessas classes funcionais no espermatozoide está indicada na Figura 8.

Figura 8 - Representação de um espermatozoide humano maduro contendo as classes de proteínas alteradas em homens astenozoospermicos: metabolismo energético, citoesqueleto e degradação/enovelamento de proteínas. As barras horizontais mostram a região da célula espermática onde as classes funcionais de proteínas são expressas (BRACKE et al., 2018 modificado).

Algumas metodologias têm sido aplicadas para esclarecer a infertilidade idiopática. Na década de 1990, os estudos eram focados em metodologias de resequenciamentos de genes envolvidos com regulação hormonal, metabolismo celular ou proliferação da meiose que poderiam ser candidatos ao fenótipo. Porém, esses estudos, em sua maioria, falharam (KRAUSZ, CIOPPI & RIERA-ESCAMILLA, 2018).

Atualmente, com as tecnologias de investigação genômica, os estudos genômicos nessa área têm aumentado e a técnica de *array-CGH* (*Array Comparative Genomic Hybridization*) tem se mostrado uma metodologia de sucesso ao sugerir genes candidatos à infertilidade de causa desconhecida. As CNVs (*copy number variations*) detectadas pela técnica, são uma classe de variação estrutural que envolve ganhos ou perdas complexas de seqüências homólogas em vários lugares do genoma

(RIGGS et al., 2014). Elas são uma classe especial de variação que envolvem segmentos de DNA maiores que 1kb e incluem deleção, duplicação, inserção. Esta definição também se aplica a variantes que envolvem segmentos de DNA maiores que 50 kb. CNPs (*Copy Number Polymorphisms*) que correspondem a CNVs presentes em mais de 1% da população (FEUK, CARSON & SCHERER, 2006). Acredita-se que elas estejam relacionadas à infertilidade devido a recombinações defeituosas que culminam em fracasso meiótico e perda de células germinativas. Além disso, acredita-se que esse tipo de alteração possa afetar genes individuais que são importantes para o processo da espermatogênese (KRAUSZ et al., 2015). Um exemplo de gene candidato à infertilidade masculina identificado por meio de *array-CGH* é o *TEX11*, tendo sido encontrada uma deleção patogênica por meio da técnica (YATSENKO et al., 2015).

Até o momento, encontramos seis principais estudos de pacientes com infertilidade idiopática onde foi utilizada a técnica de *array-CGH* (TÜTTELMANN et al., 2011; STOUFFS et al., 2012; KRAUSZ et al., 2012; CHIANESE et al., 2014; DONG et al., 2015; STOUFFS et al., 2016). Além disso, os estudos de SNPs para essa população também têm se mostrado importantes, já que as técnicas usadas para detecção desse tipo de alterações também permitiram a identificação de genes que hoje são comprovadamente relacionados à infertilidade masculina e à globozoospermia, como o *SPATA16* (HARBUZ et al., 2011) e o *DPY19L2* (DAM et al., 2007).

JUSTIFICATIVA

2. Justificativa

A infertilidade é considerada um problema de saúde pública global, afetando aproximadamente 15% dos casais (AGARWAL et al., 2015; INHORN & PATRIZIO, 2015; KHERRAF et al., 2017; VANDER BORGHT & WYNS, 2018). A infertilidade masculina é diagnosticada como uma doença idiopática em cerca de 30 a 40% dos casos (NIESCHLAG et al., 2010; JUNGWIRTH et al., 2015), sendo os fatores masculinos inteiramente responsáveis por 20 a 30% e contribuindo em 50% dos eventos (ASRM, 2015; VANDER BORGHT & WYNS, 2018).

Os estudos genômicos e especificamente a técnica de *array-CGH* têm se mostrado uma metodologia de sucesso ao sugerir genes candidatos à infertilidade de causa desconhecida (KRAUSZ et al., 2015). Além das CNVs detectadas por meio da técnica de *array-CGH*, os SNPs analisados por diferentes técnicas também mostraram-se importantes para a identificação de genes candidatos ao fenótipo (DAM et al., 2007; HARBUZ et al., 2011).

Nosso grupo de pesquisa, em parceria com o serviço de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP, tem desenvolvido projetos na área de genética reprodutiva buscando maior entendimento sobre a genômica da infertilidade. Fomos pioneiros ao empregar a plataforma 4x180k de *array CGH+SNP* (Agilent) em nossas investigações de infertilidade masculina. Os estudos de Grzesiuk (2016) foram realizados em pacientes com oligozoospermia e a pesquisa de Grangeiro (2017) foi direcionada a pacientes com azoospermia não obstrutiva.

Esse estudo irá comparar dois grupos de pacientes com falência espermatogênica primária, investigados por meio da técnica de *array-CGH+SNP*. Adicionalmente, nossa proposta é comparar os resultados obtidos por essa técnica com bancos de dados genômicos de expressão, para melhor entendimento do processo de falência espermatogênica primária.

HIPÓTESE

3. Hipótese

Alterações genômicas encontradas em comum em dois grupos de pacientes com falência espermatogênica primária podem identificar genes relacionados ao processo de espermatogênese.

OBJETIVOS

4. Objetivos

4.1. Objetivo geral

Comparar a caracterização genômica de homens com falência espermato gênica primária, com diagnóstico de azoospermia não obstrutiva e de oligozoospermia extrema.

4.2. Objetivos específicos

Descrever alterações de número de cópias (CNVs) e perdas de heterozigossidade (LOHs) que sejam comuns aos pacientes com azoospermia e oligozoospermia severa, detectadas por meio da técnica de hibridação genômica comparativa em microarranjos (*array-CGH*).

Descrever alterações de número de cópias (CNVs) e perdas de heterozigossidade (LOHs) que sejam diferentes nos dois grupos de pacientes, com azoospermia e oligozoospermia severa, detectadas por meio da técnica de hibridação genômica comparativa em microarranjos (*array-CGH*).

Comparar, por meio de meta análise, alterações genômicas detectadas por meio da técnica de *array-CGH* com a análise de expressão gênica, utilizando bancos de dados públicos.

METODOLOGIA

5 Metodologia

5.1 Material

5.1.1 Casuística

O projeto foi realizado no Laboratório de Citogenética Molecular do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (FMRP-USP), em colaboração com o Laboratório de Citogenética do Hospital das Clínicas da FMRP-USP, o Setor de Genética Médica do HCFMRP-USP, a Divisão de Urologia do Departamento de Cirurgia e Anatomia, o Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP e o Laboratório de Imunogenética Molecular da FMRP-USP.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do HCFMRP - processo nº 3537/2013 (Anexo 1). Os pacientes foram incluídos na investigação voluntariamente após lerem e assinarem o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (Anexo 2).

Após avaliação do ambulatório de infertilidade conjugal (AIFE), em conjunto com a Divisão de Urologia do HCFMRP-USP, os pacientes em investigação por infertilidade masculina foram encaminhados ao ambulatório de Genética Médica do HCFMRP-USP (GEN-3) para a avaliação clínica complementar e análise dos critérios de inclusão e exclusão deste estudo.

5.1.1.1 Critérios de Inclusão

- a. Pacientes em investigação por infertilidade masculina;
- b. Idade inferior a 45 anos;
- c. Exame físico incluindo avaliação dismorfológica normal;
- d. Cariótipo somático normal, 46, XY em no mínimo 50 células avaliadas por bandamento GTG;
- e. No grupo de azoospermicos, os pacientes foram diagnosticados com azoospermia não obstrutiva segundo os padrões da OMS (2010), apresentando pelo menos duas avaliações de parâmetros seminais, com intervalo de 90 dias entre as coletas, com ausência de espermatozoides.

5.1.1.2 Critérios de Exclusão

- a. Doenças crônicas;
- b. Perfil hormonal alterado;
- c. Realização de qualquer procedimento cirúrgico que possa influenciar a fertilidade;
- d. Cariótipo somático alterado, com diagnóstico de moisaicismo ou alterações cromossômicas;
- e. Presença de microdeleções AZF no cromossomo Y. (EAA, European Academy of Andrology) (EMQN, European Molecular Genetics Quality Network) (KRAUSZ et al., 2014).

5.1.1.3 Grupo Amostral

Cento e um (101) homens com diagnóstico de infertilidade conjugal por fator masculino passaram pela avaliação no ambulatório de infertilidade conjugal (AIFE) em conjunto com a Divisão de Urologia do HCFMRP-USP. Deles, trinta e um (31) eram azoospérmicos e setenta (70) oligozoospérmicos.

5.1.1.3.1 Pacientes com azoospermia não obstrutiva idiopática

Trinta e um (31) pacientes azoospérmicos passaram pela avaliação do ambulatório de infertilidade conjugal (AIFE) do HCFMRP-USP. Inicialmente, foi realizada a anamnese e exame físico, sendo três (3) indivíduos excluídos devido ao diagnóstico de azoospermia obstrutiva e outros três (3) por apresentarem histórico de tratamento cirúrgico (orquidopexia). Os vinte e cinco (25) pacientes restantes realizaram avaliação de perfil hormonal, sendo três (3) deles eliminados devido aos diagnósticos de síndrome de insensibilidade androgênica parcial (SIPA), doença multissistêmica e elevação isolada de gonadotrofina (FSH).

Após a triagem inicial, os pacientes foram encaminhados ao ambulatório de Genética Médica (GEN-3), onde foi realizada investigação laboratorial direcionada. O estudo citogenético em sangue periférico detectou anormalidades cromossômicas em cinco (5) pacientes, sendo que, três (3) deles foram diagnosticados com síndrome de

Klinefelter e os outros dois (2) possuíam heteromorfismo de cromatina, sendo assim excluídos do estudo. Adicionalmente, foi realizado teste para detecção de microdeleções de AZF no cromossomo Y, sendo um (1) paciente eliminado por apresentar microdeleção completa (b2/b4) na região de AZFc.

Ao final da investigação, foram selecionados dezesseis (16) pacientes com diagnóstico de azoospermia não obstrutiva idiopática para integrar o grupo amostral e realizar investigação genômica utilizando a técnica de hibridização genômica comparativa.

5.1.1.3.2 Pacientes com oligozoospermia extrema idiopática

Entre os setenta (70) pacientes diagnosticados com oligozoospermia idiopática, foram selecionados trinta e oito (38) que foram encaminhados para a triagem.

Primeiramente, durante a avaliação do ambulatório de infertilidade conjugal (AIFE) do HCFMRP-USP, foi realizada anamnese, sendo quatro (4) pacientes excluídos: um (1) deles por possuir filho em outro relacionamento, outro com histórico de abortos de repetição, um (1) por ter realizado hernioplastia inguinal na infância e o último por histórico de falha de implantação do embrião. Após o exame físico, dois (2) pacientes foram excluídos com diagnóstico de varicocele.

Os trinta e dois (32) pacientes restantes foram então encaminhados ao ambulatório de Genética Médica (GEN-3) do HCFMRP-USP, para avaliação direcionada. Cinco (5) pacientes foram excluídos após investigação citogenética, um (1) com cariótipo não informativo por baixa resolução e quatro (4) por apresentarem heteromorfismo de cromatina em 9q ou 16q. Um (1) paciente foi excluído da amostra após teste para detecção de microdeleções de AZF no cromossomo Y, por apresentar microdeleção completa (b2/b4) na região de AZFc.

A amostra final desse grupo, após análise e revisão dos resultados obtidos pela técnica de hibridização genômica comparativa por microarranjos, abrangeu sete (7) pacientes com diagnóstico de oligozoospermia extrema idiopática.

Figura 9 - Fluxograma da seleção dos pacientes utilizados no estudo (GRANGEIRO, 2017).

5.1.1.4 Grupo Controle

O grupo controle foi composto por seis (6) homens normospérmicos, com faixa etária entre 34 e 40 anos e média de 37,3 anos. Os critérios de inclusão incluíram espermograma dentro da normalidade, fertilidade comprovada, ou seja, possuíam dois filhos, sendo que o mais novo com até dois anos de idade, não fumantes, cariótipo somático normal 46, XY em 50 células analisadas por bandamento GTG, sem histórico de doenças crônicas ou procedimentos cirúrgicos.

5.1.2 Amostra

Foi realizada a coleta de uma amostra de sangue periférico em Vacutainer® de 5mL contendo EDTA para cada paciente do grupo com oligozoospermia extrema, do grupo com azoospermia não obstrutiva e do grupo controle. Após a coleta, as amostras foram encaminhadas ao laboratório de Citogenética Molecular Humana da FMRP-USP, onde foi realizada a extração do DNA.

5.2 Método

5.2.1 Extração de DNA

O DNA foi extraído em triplicata a partir de 200µL de amostra de sangue total coletado, de acordo com o método MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit – Epicentre (US).

Neste processo inicialmente foram aliquotados 200µL de amostra de sangue total em um tubo de 1,5mL e adicionados 600µL da solução de lise de células vermelhas do sangue. Após esse processo, o tubo foi invertido três vezes para homogeneizar e então o fundo foi agitado para resuspender qualquer material remanescente. Esse processo foi repetido duas vezes a cada cinco minutos de incubação em temperatura ambiente. Em seguida, o material foi centrifugado por 25 segundos em uma velocidade de 13.000rpm para a sedimentação dos glóbulos brancos. O sobrenadante foi removido, deixando apenas aproximadamente 25µL. O sedimento restante foi homogeneizado em vortex e foram adicionados 300µL da solução de lise celular ou tecidual, pipetando várias vezes para resuspensão das

células. Em seguida, foi adicionado 1µL de RNase A, homogeneizando cuidadosamente. Essa solução foi encubada a 37°C por 30 minutos e depois sofreu um choque térmico em gelo com duração de 3 a 5 minutos para que a ação da RNase A fosse interrompida.

A seguir, iniciou-se a etapa de precipitação, onde foram adicionados 150µL do reagente de precipitação proteica MPC a 300µL da amostra lisada e essa solução foi homogeneizada vigorosamente em vortex por 10 segundos. A amostra foi então centrifugada por 10 minutos a 4°C em uma velocidade de 13.000rpm, o sobrenadante transferido para um novo tubo e o sedimento descartado. Foram adicionados ao sobrenadante 500µL de isopropanol e o tubo foi invertido por 30 a 40 vezes. O DNA foi então sedimentado por centrifugação a 4°C por 10 minutos e o isopropanol descartado. O DNA foi então lavado para a remoção de resíduos contaminantes, a partir do enxague do sedimento com etanol 70%, por duas vezes. Por último, o pellet de DNA resultante da extração foi reidratado com a adição de 35µL de água ultra pura.

As amostras foram quantificadas em NanoDrop, a partir de 2µL da solução. Após a quantificação, foram armazenadas a -20°C.

5.2.2 Técnica de hibridação genômica comparativa em microarranjo (*array*-CGH +SNP)

Neste projeto, utilizamos uma das variações conhecidas da técnica de hibridação genômica comparativa por microarranjos que é o *array*-CGH+SNP. A técnica de hibridação genômica comparativa em microarranjo foi realizada utilizando a plataforma SurePrint G3 Human Genome CGH+SNP Microarray, 4x180K (Agilent Technologies®, Santa Clara, CA, USA). Esta plataforma permite a análise de variações de número de cópias (CNVs) e de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), abrangendo 110.712 sondas para identificação de CNVs e 59.647 para identificação de SNPs. Elas estão dispostas ao longo de todo o genoma com um espaçamento médio entre as sondas de 25,3kb.

5.2.2.1 Verificação de pureza e integridade dos DNAs

Primeiramente, as amostras de DNA extraído foram submetidas à verificação da pureza e integridade por meio de corrida em gel de agarose 1%. Para isso, 10µL de

amostra contendo 250ng de DNA foram aplicados em gel de agarose 1%, que foi então submetido à corrida em tensão 120V por 40 minutos. As amostras que evidenciaram fragmentação do DNA ou contaminação por RNA foram descartadas.

5.2.2.2 Digestão enzimática e fragmentação das amostras

A primeira etapa da técnica de hibridação genômica foi a fragmentação das amostras, que foi realizada com o kit *Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit* (Agilent Technologies®, Santa Clara, CA, USA). Essa solução de digestão foi preparada para um protocolo de oito reações para cada lâmina, consistindo em quatro para o DNA amostral e quatro para os DNAs controles masculino, obtidos da mesma empresa. A solução foi preparada com 17µL de água *nuclease-free*, 22,1µL de tampão 10x, 1,7µL de BSA acetilado (10mg/µL) e 4,25µL de cada uma das enzimas de restrição Alu I (10 U/µL) e Rsa I (10U/µL). A cada tubo de reação com 1µg de DNA genômico diluídos em 20,2µL de água ultrapura, foram adicionados 5,8µL deste mix, completando um volume de 26µL. Os tubos foram então encaminhados ao termociclador programado onde as amostras foram mantidas a 37°C por duas horas, em seguida a 65°C por 20 minutos, para inativação das enzimas, e então mantidas a 4°C até a finalização manual do programa. Após esse procedimento as amostras foram submetidas a outra corrida em gel de agarose 1%, em que houve a verificação do tamanho dos fragmentos gerados a partir de 2µL da solução. Os fragmentos nessa etapa deveriam variar entre 200 a 800 pb.

5.2.2.3 Marcação dos DNAs

Após a fragmentação, foi realizada a marcação do DNA teste e DNA controle com diferentes fluoróforos. Primeiramente, foram adicionados às amostras 5µL de *random primer* e elas foram novamente levadas ao termociclador, programado com dois passos: o primeiro de três minutos a 98°C e o segundo a 4°C até a finalização manual. Posteriormente, foram preparadas duas soluções de marcação diferentes: uma contendo cianina-3 e a outra contendo cianina-5. Essas soluções foram preparadas a partir de 8,5µL de água *nuclease-free*, 42,5µL de tampão de reação 5x, 21,2µL de dNTPs 10x, 4,2µL de ExoKlenow e 6,4µL do fluoróforo Cyanine 3-dUTP em um dos tubos e, no outro, 6,4µL do fluoróforo Cyanine 5-dUTP. Foram então adicionados 21µL do Mix de marcação em cada tubo de reação contendo o DNA

genômico, totalizando um volume de 50µL cada. O mix contendo Cyanine-3 foi adicionado às reações com DNA controle e o mix contendo Cyanine-5 foi acrescentado às reações com DNA amostral. Por último, as reações foram então submetidas ao termociclador, onde as amostras foram mantidas a 37°C por duas horas, em seguida a 65°C por 10 minutos e conservadas a 4°C até a finalização manual do programa.

5.2.2.4 Purificação das amostras

Iniciou-se então a etapa de purificação, que foi realizada com filtros Amicon 30kDa. Inicialmente, adicionou-se 430µL de TE 1x (pH 8.0) a cada amostra. Os filtros foram distribuídos em tubos de microcentrifuga e carregados com cada DNA marcado. As amostras foram submetidas a centrifuga por 10 minutos a 14.000xg, em temperatura ambiente. O filtrado foi descartado e foram adicionados mais 480µL de TE 1x, repetindo a centrifugação e o descarte do filtrado. Para coletar a amostra purificada, o retido, juntamente com o filtro, foi vertido em novo tubo de microcentrifuga de 1,5mL e centrifugado por um minuto a 1.000x g, em temperatura ambiente. As marcações de todas as amostras foram então equiparadas, sendo então concentradas ou diluídas em TE 1x, conforme as a necessidade de cada uma, finalizando um volume de 21µL cada, com níveis de marcações semelhantes. Depois, foram coletados 1,5µL de cada amostra para a determinação do rendimento e da atividade específica. Finalmente, as amostras teste e controle, devidamente marcadas com Cyanine-5 e Cyanine-3, foram combinadas em um único Mix, completando um volume total final de 39µL.

5.2.2.5 Hibridação

Primeiramente, houve a preparação do DNA marcado para a hibridação, em que, foi preparada uma solução de hibridação contendo 21,3µL de Cot-1 DNA (1,0mg/mL), 46,8µL de 10x aCGH *Blocking Agent* e 233,8µL de tampão de hibridação 2x HI-RPM. Um volume de 71µL foi adicionado em cada tubo contendo o DNA marcado, totalizando um volume de 110µL. Após mistura por pipetagem, as amostras foram encaminhadas ao termociclador com um programa de três minutos a 98°C e 30 minutos a 37°C.

Finalmente, para a hibridação, 100µL do mix de hibridação foram combinados ao DNA e depositados nos poços da lamínula, que foi combinada a uma lâmina de hibridação e envolvida por uma câmara. A câmara foi colocada em prateleira rotatória em forno de hibridação programado a 67°C e 20rpm, por 24 horas.

5.2.2.6 Lavagem

Após saírem do forno de hibridação as amostras foram submetidas a, pós-lavagens em que, primeiro, a lâmina e lamínula foram separadas manualmente enquanto mergulhadas em tampão de lavagem oligoCGH 1 em temperatura ambiente. Depois, a lâmina teste foi lavada, primeiramente com tampão oligoCGH 1 limpo, em temperatura ambiente por cinco minutos, com agitação magnética e, posteriormente, com o tampão oligoCGH 2, a 37°C com agitação magnética por um minuto. A seguir, as lâminas foram lavadas em acetonitrila, também em agitação magnética, por 10 segundos. As lâminas foram então mergulhadas em solução de estabilização e secagem, com a mesma agitação por 30 segundos.

5.2.2.7 Escaneamento e extração dos dados

Finalmente, após as lavagens, as lâminas foram posicionadas no suporte *SureScan* para serem escaneadas. Para o escaneamento das lâminas de microarranjo, foi utilizado o *Agilent SureScan B Scanner* e para a análise das imagens foi empregado o *The Feature Extraction software* v12.0. Os dados extraídos foram interpretados pelo *software* Nexus 8.0, utilizando o *Fast Adaptive States Segmentation Technique* (FASST2) com um limiar de significância de 5.0 e um espaço máximo entre sondas adjacentes de 10.000kb.

5.2.2.8 Análise bioinformática

A técnica de hibridação genômica comparativa por microarranjos (*array-CGH*) é baseada na hibridação do DNA do paciente e de um DNA controle, marcados com fluorescências distintas, a clones genômicos de interesse, dispostos em uma lâmina padrão. A hibridação diferencial entre o DNA controle e o DNA do paciente indica perdas (razão < 0,8 de sondas do paciente/sondas controle) ou ganhos (razão > 1,2) de material cromossômico em todo o genoma (Lichter et al., 2000). Suas plataformas podem ser utilizadas tanto para investigação de CNVs (*copy number variations*) em

segmentos cromossômicos ou regiões relacionadas a doenças específicas, quanto no genoma inteiro (Speicher & Carter, 2005).

Durante a análise bioinformática, foram desconsideradas alterações no número de cópias menores que 1Kb e/ou incluindo menos de 3 sondas adjacentes, assim como as perdas de heterozigosidade (LOH) menores que 1Mb. Foi considerado ganho um limiar de 0,5; alto ganho, limiares de 1,14; perdas, -0,5; e perdas em homozigose, 1,1. As regiões alteradas foram descritas utilizando o GRCh37/Hg19 como sequência referência.

Para a análise descritiva dos dados de LOHs e CNVs de perda e ganho foram consideradas duas etapas: a primeira, onde as variações genômicas entre pelo menos dois pacientes do grupo amostral total e nenhum controle foram selecionadas; e posteriormente a interpretação dos dados obtidos realizada por meio de pesquisa nos bancos de dados como o *Genome Browser* (UCSC versão hg19), PubMed, OMIM, e o *GeneOntology* (GO).

5.2.3 Análise estatística

Os dados foram submetidos às análises estatísticas de variância. Primeiramente, eles passaram pelo teste de Shapiro-Wilk por meio do software BioStat 5.3, onde foram avaliados quanto à normalidade. Valores de $P > 0,05$ caracterizaram distribuição normal dos dados e $P \leq 0,05$ distribuição não normal dos dados. Posteriormente, os testes estatísticos de análise de variância e os gráficos foram feitos por meio do software Graphpad Prism versão 6.01. Os testes foram escolhidos de acordo com os tipos de dados e valor de significância do teste de Shapiro-Wilk. Para os diferentes testes apresentados na Tabela 1, considera-se haver diferença significativa entre os dados se os valores de P forem $\leq 0,05$. Quando encontradas diferenças significativas para os testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, para construção do ranqueamento foram feitos os testes pós-túmos de Tukey e Dunn respectivamente. Para os casos em que o número de amostras foi menor que 5, não sendo possível a realização de verificação de normalidade, foram usados testes não paramétricos.

Tabela 1 - Análises de variância utilizadas de acordo com a distribuição normal dos dados.

Tipos de dados	Normalidade*	
	P > 0,05	P ≤ 0,05
1 variável, 2 grupos independentes de dados	Teste-t	Teste de Mann-Whitney
1 variável, 3 ou mais grupos independentes de dados	Anova	Kruskal-Wallis

*Os dados encontram-se em distribuição normal, se $P > 0,05$

5.2.4 Análise de expressão por meio de bancos de dados públicos

Para a análise do transcriptoma de pacientes inférteis utilizando bancos de dados públicos, foram baixados dois arquivos do GEO Datasets da NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>).

Um dos estudos (número de acesso GSE45885) baseou-se na investigação da expressão gênica de 27 biópsias de testículos de pacientes com vários tipos de azoospermia não obstrutiva e de quatro controles com espermatogênese normal. O transcriptoma dos 31 indivíduos foi investigado através da plataforma Affymetrix Human Gene 1.0 ST Array.

O outro, por sua vez, era oriundo de um estudo feito por meio de RNAs de sêmen de indivíduos com teratozoospermia (número de acesso GSE6872). O transcriptoma do sêmen dos pacientes foi determinado por meio da plataforma Affymetrix Human Genome U133 Plus 2.0 Array. Esse arquivo continha dados de RNAs de sêmen de vinte e um indivíduos no total, sendo que treze desses eram férteis e os oito restantes possuíam teratozoospermia.

Após a extração, ambos os dados foram interpretados pelo *software* Nexus Expression 3.0 (Biodiscovery, Santa Clara), com nível de significância de 5%. Análises de expressão gênica de todas as *probes* em ambos estudos foram realizadas através do teste-T no *software* Nexus Expression 3.0. O valor de $P < 0.05$ foi utilizado para

definir quais genes encontravam-se diferencialmente expressos entre indivíduos inférteis vs. férteis.

RESULTADOS

6. Resultados

6.1 Análise inicial

A análise inicial dos dados obtidos pelo *array-CGH* mostrou que todos os pacientes, tanto do grupo amostral, quanto do grupo controle, possuíam algum tipo de alteração genômica que incluíam CNVs de perda e ganho e LOHs (Figura 10).

6.1.1 Quantidade de alterações genômicas

No total foram encontradas 413 alterações genômicas, sendo 80 no grupo controle e 333 no grupo amostral. Em relação ao grupo amostral, 122 alterações ocorreram nos pacientes com oligozoospermia extrema, sendo que foram 58 ganhos, 37 perdas e 27 LOH's; e 211 nos pacientes com azoospermia não obstrutiva, sendo 111 ganhos, 32 perdas e 68 LOH's.

Das 80 alterações encontradas no grupo controle, foram identificados 47 ganhos, 6 perdas e 27 LOH's. Além disso, vale ressaltar que 4 dos 6 pacientes controle não apresentaram nenhuma perda. A distribuição das alterações genômicas dos pacientes de cada grupo encontram-se na Tabela 2.

Na primeira avaliação feita os dados foram as análises de variância estatística (ANOVA). A partir dessas análises, diversos aspectos sobre as alterações genômicas foram testadas, tais como:

1. Valor de alterações genômicas totais entre os grupos;
2. Valor das CNVs totais entre os grupos;
3. Valor total de CNVs do tipo perda entre os grupos;
4. Valor total de CNVs do tipo ganho entre os grupos;
5. Valor total de LOHs entre os grupos;
6. Valor total de CNVs do tipo perda de uma cópia entre os grupos;
7. Valor total de CNVs do tipo perda de duas cópias entre os grupos;
8. Valor total de CNVs do tipo ganho de uma cópia entre os grupos;
9. Valor total de CNVs do tipo ganho de duas ou mais cópias entre os grupos;

Os gráficos referentes à essas primeiras análises encontram-se na Tabela 3 e os gráficos de Distribuição do número de alterações genômicas encontradas nos grupos podem ser visualizados na Figura 11.

Tabela 2 - Número de alterações genômicas encontradas nos grupos controle e amostral. C1 a C6 = controles; EO1 a EO7 = pacientes com oligozoospermia extrema; NOA1 a NOA16 = pacientes com azoospermia.

Amostras	Ganhos	Perdas	LOH	Total
C1	3	1	7	11
C2	13	5	2	20
C3	19	0	10	29
C4	7	0	1	8
C5	3	0	4	7
C6	2	0	3	5
Total Controle	47	6	27	80
EO1	1	16	3	20
EO2	2	4	1	7
EO3	5	1	3	9
EO4	6	3	4	13
EO5	3	7	5	15
EO6	16	4	2	22
EO7	25	2	9	36
Total Oligo	58	37	27	122
NOA1	10	4	2	16
NOA2	2	0	1	3
NOA3	6	3	0	9
NOA4	2	0	0	2
NOA5	17	2	9	28
NOA6	2	1	2	5
NOA7	21	1	7	29
NOA8	13	1	4	18
NOA9	2	1	0	3
NOA10	8	6	6	20
NOA11	5	0	8	13
NOA12	6	1	3	10
NOA13	3	5	6	14
NOA14	3	2	1	6
NOA15	9	4	4	17
NOA16	2	1	15	18
Total Azoo	111	32	68	211
Total Amostral	169	69	95	333
Total	216	75	122	413

Figura 10. - Visão geral das alterações distribuídas por todo o genoma de todos os pacientes do grupo amostral e controle. Cada linha horizontal representa o resultado do paciente indicado à esquerda e as colunas verticais correspondem aos pares cromossômicos. Linhas horizontais azuis representam ganhos e as linhas vermelhas indicam perdas, por último, as linhas verticais e amarelas mostram LOHs

Figura 11 - Distribuição do número de alterações genômicas encontradas nos grupos [C- controle; EO- Oligozoospermia extrema; NOA- Azoospermia não obstrutiva; FEP- Falência espermato gênica primária (Oligozoospermia extrema + Azoospermia não obstrutiva)]. Cada gráfico representa um tipo de alteração genômica e cada ponto representa a quantidade de alterações presentes em um paciente.

O número de alterações genômicas foi testado inicialmente por meio do teste de Shapiro-Wilk, para a obtenção dos valores de normalidade. Os testes 1 (Alterações genômicas totais), 2 (CNV's totais), 4 (CNV's do tipo ganho) e 6 (CNV's do tipo perda de uma cópia) apresentaram distribuição normal e foram posteriormente analisados por ANOVA por meio do teste Tukey. Os demais grupos: 3 (CNV's do tipo perda), 5 (LOH's totais), 7 (CNV's do tipo perda de duas cópias), 8 (CNV's do tipo ganho de

uma cópia) e 9 (CNV's do tipo ganho de duas cópias), por não possuírem distribuição normal, foram analisados por meio do teste de Kruskal-Wallis.

Das análises realizadas, somente a (3), referente ao valor total de CNVs do tipo perda entre os grupos, apresentou diferença significativa (Tabela 3). A partir dela, foi possível observar diferença entre o grupo de oligozoospermia extrema e o controle.

Tabela 3 - Média do número de alterações do tipo ganho, perdas e LOHs detectadas nos grupos controle e amostral, seguido pelos resultados da análise estatística para cada teste. C- Controle; EO- Oligozoospermia extrema; NOA- Azoospermia não obstrutiva; FEP- Falência espermatogênica primária (Oligozoospermia extrema + Azoospermia não obstrutiva).

	Média de Perdas	Média de Perdas de uma cópia	Média de Perdas de duas cópias
C	1 ^a	0,66 ^a	0,33 ^a
EO	5,28 ^{b*}	1,85 ^a	3,42 ^a
NOA	2 ^{ab}	0,93 ^a	1,06 ^a
FEP	3,64 ^{ab}	1,39 ^a	2,24 ^a

	Média de Ganhos	Média de Ganhos de uma cópia	Média de Ganhos de duas ou mais cópias
C	7,8 ^a	1,16 ^a	6,66 ^a
EO	8,2 ^a	2,28 ^a	6 ^a
NOA	6,9 ^a	2,37 ^a	4,56 ^a
FEP	7,55 ^a	2,32 ^a	5,28 ^a

	Média de LOH	Média de CNVs	Média das alterações genômicas
C	4,5 ^a	4,41 ^a	13,33 ^a
EO	3,85 ^a	6,78 ^a	17,42 ^a
NOA	4,25 ^a	4,46 ^a	13,18 ^a
FEP	4,05 ^a	5,62 ^a	15,3 ^a

*Letras iguais indicam não haver diferença significativa entre as médias.

6.1.2 Tamanho das alterações genômicas

Posteriormente, foi observado o tamanho das alterações genômicas em cada grupo, que variaram de 332pb até 11.3Mb. No grupo controle, o intervalo foi de 332pb a 4.9Mb, enquanto que, no grupo amostral, o intervalo referente aos pacientes com

oligozoospermia extrema foi de 332pb a 6.8Mb e o dos indivíduos com azoospermia não obstrutiva foi de 552pb a 11.3Mb.

O tamanho das alterações foi então dividido em intervalos e foram contadas quantas variantes de cada tipo estavam presentes em cada intervalo e em cada grupo como apresentado na Tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição dos intervalos de tamanho das alterações genômicas (CNVs de perda e ganho e LOHs) para cada grupo. C- Controle; EO- Oligozoospermia extrema; NOA- Azoospermia não obstrutiva.

Todas						
Intervalos	Total			Por indivíduo		
	C	EO	NOA	C	EO	NOA
0 - 10Kb	19	40	38	3.16	5.71	2.36
10Kb - 100Kb	11	19	29	1.83	2.71	1.81
100Kb - 1Mb	23	35	75	3.83	5	4.75
1Mb - 5Mb	27	25	53	4.5	3.57	3.31
>5Mb	0	5	17	0	0.71	1.06

Ganhos						
Intervalos	Total			Por indivíduo		
	C	EO	NOA	C	EO	NOA
0 - 10Kb	19	21	34	3.16	3	2.12
10Kb - 100Kb	11	14	25	1.83	2	1.56
100Kb - 1Mb	17	23	51	2.83	3.28	3.18
Mb - 5Mb	0	0	1	0	0	0.06
>5Mb	0	0	0	0	0	0

LOH						
Intervalos	Total			Por indivíduo		
	C	EO	NOA	C	EO	NOA
0 - 10Kb	0	0	0	0	0	0
10Kb - 100Kb	0	0	0	0	0	0
100Kb - 1Mb	0	0	0	0	0	0
1Mb - 5Mb	27	22	52	4.5	3.14	3.25
>5Mb	0	5	16	0	0.71	1

Perdas						
Intervalos	Total			Por indivíduo		
	C	EO	NOA	C	EO	NOA
0 - 10Kb	0	19	4	0	2.71	0.24
10Kb - 100Kb	0	5	4	0	0.71	0.25
100Kb - 1Mb	17	23	51	1	1.7	1.5
1Mb - 5Mb	0	1	0	0	0.14	0
>5Mb	0	0	0	0	0	0

Ainda, para a análise do tamanho dessas alterações, foram feitos gráficos de barra para melhor visualização da variação de tamanho das alterações entre os grupos (Figura 12).

O primeiro evento destacado pela análise dos gráficos é a distribuição dos tamanhos das alterações genômicas. É possível observar que as LOHs têm maior tamanho quando comparadas às CNVs, possuindo um intervalo de 1Mb a 11.3Mb. Ao analisarmos apenas as CNVs, observamos que elas possuem no máximo 5Mb, que apenas os pacientes com azoospermia não obstrutiva possuem CNVs de

tamanho superior a 1Mb e que os homens do grupo controle possuem CNVs de perda apenas no intervalo de 100Kb a 1Mb.

Quando analisamos o gráfico das alterações totais, que representa o tamanho das alterações sem a separação de CNVs (de perda ou ganho) e LOHs vemos que a quantidade de alterações genômicas no primeiro intervalo dos pacientes oligozoospermicos extremos é 3 vezes maior do que a dos pacientes com azoospermia não obstrutiva e o dobro em relação aos controles. No segundo intervalo é possível observar que os valores dos pacientes com azoospermia não obstrutiva e o dos controles são quase idênticos e que a quantidade de alterações nos pacientes com oligozoospermia extrema permanece maior que ambos. Porém, a razão é de aproximadamente 30%, bem menor que a do intervalo anterior. No terceiro intervalo, essa razão muda um pouco, dessa vez os valores das alterações nos pacientes com azoospermia não obstrutiva e oligozoospermia extrema são os que se coincidem e a quantidade do grupo controle é cerca de 20% menor. No próximo intervalo, o valor do grupo controle ultrapassa cerca de 20% o valor de alterações em ambos os grupos da amostra. Finalmente, no último intervalo, vemos que há apenas alterações nos dois grupos da amostra e que o valor das alterações em ambos é muito parecido.

Observando o gráfico que representa os intervalos de tamanho das LOHs, vemos que essas alterações possuem tamanho superior a 1Mb e que o tamanho dessas alterações no grupo controle está restrito ao intervalo de 1Mb a 5 Mb, sendo seu menor valor de 1.4Mb e seu maior valor de 4.9Mb. Também é mostrado que para esse intervalo, a quantidade de alterações nos controles é maior que nos grupos da amostra em aproximadamente 30%. Por último, notamos que as variações de LOH's acima de 5Mb estão presentes apenas no grupo amostral (OE- oligozoospermia extrema e NOA – azoospermia não obstrutiva).

Figura 12 - Distribuição do tamanho das alterações genômicas (CNVs de perda e ganho e LOHs) por indivíduo de cada grupo. C- controle; EO - Oligozoospermia extrema; NOA – Azoospermia não obstrutiva.

Ao analisarmos os gráficos que representam as CNVs (de perdas e ganhos), vemos que apenas os pacientes com azoospermia não obstrutiva possuem alterações superiores a 1Mb e que a quantidade de alterações nos intervalos para esses pacientes apresenta uma curva de crescimento que, nos mostra que ao aumentarmos o tamanho das alterações, a quantidade de alterações também aumenta. No caso dos pacientes com oligozoospermia extrema, não vemos uma relação de aumento/decréscimo do tamanho das alterações em contrapartida à quantidade para cada intervalo. No entanto, esse grupo sempre aparece com uma quantidade de alterações mais elevada que os demais no primeiro intervalo de tamanho em todas as análises, principalmente na análise de CNVs de perda em que o número de alterações para o primeiro intervalo de tamanho é 5 vezes maior que o número de alterações dos pacientes com azoospermia não obstrutiva. Por último, quando observamos os controles, vemos que no gráfico referente às CNVs de ganho, esse grupo não apresenta alterações maiores que 1Mb e que no gráfico referente às CNVs de perda eles apresentam apenas alterações com tamanhos no intervalo de 100Kb a 1Mb.

6.1.3 Localização das alterações genômicas

Após a análise de tamanho das variações genômicas, avaliamos a localização das alterações, que estão distribuídas nas Figuras 13 e 14.

O primeiro gráfico que visualizamos na Figura 13 é o de variações totais (LOHs + CNVs). Nele podemos observar que há alterações em todos os cromossomos dos pacientes com azoospermia não obstrutiva, os indivíduos controles não possuem alterações apenas nos cromossomos 15 e 17 e os pacientes com oligozoospermia extrema não possuem alterações no cromossomo 18.

O próximo gráfico nos mostra onde estão localizadas as alterações de LOH nos pacientes. Observamos que nos indivíduos do grupo amostral não foram detectadas alterações nos cromossomos sexuais e que o grupo controle apresenta variações no cromossomo X. Ao analisar os autossomos, notamos que todos os grupos de pacientes possuem alterações nos cromossomos 1, 2, 4, 5, 8, 10, 11, 12 e 20. Os indivíduos controle não possuem esse tipo de alteração nos cromossomos 3, 6, 13, 14, 15, 21 e 22, enquanto que os indivíduos com oligozoospermia extrema não possuem alterações nos cromossomos 6, 7, 9, 15, 16, 18 e 21. Finalmente, os

pacientes com azoospermia não obstrutiva não apresentam esse tipo de variação genômica apenas nos cromossomos 11, 19 e 22.

Na Figura 14, podemos observar a distribuição das alterações de CNVs de forma separada, tanto de ganho como de perda. Inicialmente, ao comparar ambos os gráficos, notamos que o gráfico de perda apresenta menos alterações em relação ao gráfico de ganhos. Podemos observar também que existem ganhos em todos os grupos em ambos cromossomos sexuais, porém as perdas foram detectadas apenas no cromossomo X, sendo restritas ao grupo amostral.

Em relação aos autossomos, a análise dos ganhos mostrou que há alterações em todos os grupos nos cromossomos 2, 3, 7, 10, 11, 13, 14, 16, 19, 21 e 22. Não houve nenhuma variação genômica do tipo ganho nos cromossomos 1, 12 e 18. No grupo com oligozoospermia extrema, foram ainda encontradas duplicações nos cromossomos 4, 5, 6, 8, 9, 15 e 17. No grupo com azoospermia não obstrutiva foram detectadas alterações do tipo ganho também nos cromossomos 15, 17 e 20. Por último, no grupo controle, foram encontradas além das já citadas, alterações do tipo ganho nos cromossomos 6 e 20.

A análise dos autossomos quanto às perdas mostrou que todos os grupos possuíam variação no cromossomo 8 e nenhuma nos cromossomos 9, 17, 18 e 21. No grupo controle, foram encontradas alterações nos cromossomos 4, 10, 12 e 14. O grupo com azoospermia não obstrutiva apresentou deleções nos cromossomos 2, 3, 6, 7, 15 e 22. Finalmente, os pacientes do grupo com oligozoospermia extrema apresentaram alterações do tipo perda nos cromossomos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 11, 14, 15, 16, 19 e 20.

Figura 13 - A – Distribuição da média das alterações genômicas totais (CNVs e LOHs) por indivíduo de cada grupo entre os cromossomos. **B**- Distribuição da média de LOHs por indivíduo de cada grupo entre os cromossomos.

Figura 14 - Distribuição da média das variantes de número de cópias (CNVs) do tipo ganho e perda por indivíduo de cada grupo entre os cromossomos.

6.1.4 Análise das regiões encontradas por meio da técnica de *array*-CGH

Após as análises iniciais, realizamos as análises das regiões específicas identificadas por meio da técnica de *array*-CGH. Nessa etapa foram analisados os diferentes tipos de alterações, quanto ao evento (CNVs de ganho ou perda ou LOHs), cromossomo inserido, banda, região genômica, tamanho específico, genes presentes e os pacientes que apresentavam tal variação genômica. Essas análises foram divididas em: descritiva e individualizada.

6.1.4.1 Análise descritiva

Na análise denominada descritiva, foram consideradas alterações presentes em pelo menos dois indivíduos do grupo amostral e nenhum controle. Primeiramente foi analisado o grupo amostral que integrava os pacientes oligozoospermicos extremos e com azoospermia não obstrutiva, ou seja, o grupo com falência espermatogênica primária. Nesse grupo foram encontradas cinco CNVs (Tabela 5) sendo três perdas, um ganho e cinco LOHs (Tabela 6).

Posteriormente, foram analisados os pacientes com oligozoospermia extrema, onde foram encontradas duas CNVs, ambas do tipo perda e uma região de LOH (Tabela 7). Na análise do grupo com azoospermia não obstrutiva, foram encontradas três CNVs, sendo dois ganhos e uma perda e duas regiões de LOHs (Tabela 8).

6.1.4.2 Análise individualizada

A análise individualizada destacou CNVs de perda ou ganho nos pacientes do grupo amostral. No total, foram encontradas vinte e oito alterações, sendo dezessete no grupo com oligozoospermia extrema e onze pertencentes ao grupo com azoospermia não obstrutiva. Dessas, dezesseis eram ganhos (Tabela 8) e doze eram perdas (Tabela 9).

Tabela 5 - Alterações do tipo variação de número de cópias (CNVs) de perda e ganho encontradas nos dois grupos com falência espermatogênica primária. EO - Oligozoospermia extrema; NOA – Azoospermia não obstrutiva.

Indivíduos portadores	Cromossomo	Banda	Região	Tamanho (Pb)	Evento	Genes
EO2	2	q37.3	242,854,606-242,963,459	108854	Perda	<i>LINC01238, LINC01237</i>
NOA14	2	q37.3	242,854,606-243,199,373	344768	Perda	<i>LINC01238, LINC01237, LINC01881</i>
EO6	8	p11.22	39,240,660-39,393,247	152588	Perda em homozigose	<i>ADAM5, ADAM3A</i>
NOA15;EO4	8	p11.22	39,240,660-39,393,247	152588	Perda	<i>ADAM5, ADAM3A</i>
NOA14;EO1	15	q11.2	22,297,051-22,451,005	153955	Perda	<i>LINC02203, LOC101927079, OR4M2, OR4N4, OR4N3P, LOC102724760, IGHV1OR15-1</i>
NOA15	15	q11.2	22,297,051-22,478,161	181111	Perda	<i>LINC02203, LOC101927079, OR4M2, OR4N4, OR4N3P, LOC102724760, IGHV1OR15-1, LOC642131, IGHV1OR15-3</i>
NOA10	15	q11.2	22,297,051-22,525,286	228236	Perda em homozigose	<i>LINC02203, LOC101927079, OR4M2, OR4N4, OR4N3P, LOC102724760, IGHV1OR15-1, LOC642131, IGHV1OR15-3, MIR1268A</i>
NOA7;NOA9;NOA12;NOA13	15	q11.2	22,297,051-22,628,639	331589	Perda em homozigose	<i>LINC02203, LOC101927079, OR4M2, OR4N4, OR4N3P, LOC102724760, IGHV1OR15-1, LOC642131, IGHV1OR15-3, MIR1268A, RERP3</i>
EO5;EO6;EO7	15	q11.2	22,297,051-22,628,639	331589	Perda	<i>LINC02203, LOC101927079, OR4M2, OR4N4, OR4N3P, LOC102724760,</i>

						<i>IGHV1OR15-1, LOC642131,</i>
						<i>IGHV1OR15-3, MIR1268A, REREP3</i>
NOA8;NOA11;NOA13; NOA15;EO6	16	p11.2 - p11.1	34,467,343- 34,760,414	293072	Ganho	<i>LINC01566, FRG2DP, TP53TG3HP</i>

Tabela 6 - Alterações de perda de heterozigose (LOHs) encontradas nos dois grupos com falência espermatogênica primária. EO - Oligozoospermia extrema; NOA – Azoospermia não obstrutiva.

Indivíduos portadores	Cromossomo	Banda	Região	Tamanho (Pb)	Evento	Genes
EO6	1	p31.1	71,661,118-74,991,055	3329938	LOH	ZRANB2-AS2, NEGR1-IT1, NEGR1, LINC01360, LRRIQ3, FPGT, FPGT-TNNI3K, TNNI3K
NOA6	1	p31.1	70,080,248-74,013,952	3933705	LOH	LRRC7, PIN1P1, LRRC40, SRSF11, ANKRD13C, HHLA3, CTH, LINC01788, PTGER3, ZRANB2-AS1, MIR186, ZRANB2, ZRANB2-AS2, NEGR1-IT1, NEGR1, LINC01360
NOA7	1	p31.1	70,310,623-74,309,879	3999257	LOH	LRRC7, PIN1P1, LRRC40, SRSF11, ANKRD13C, HHLA3, CTH, LINC01788, PTGER3, ZRANB2-AS1, MIR186, ZRANB2, ZRANB2-AS2, NEGR1-IT1, NEGR1, LINC01360
NOA15	1	p31.1	69,459,004-74,013,952	4554949	LOH	LRRC7, PIN1P1, LRRC40, SRSF11, ANKRD13C, HHLA3, CTH, LINC01788, PTGER3, ZRANB2-AS1, MIR186, ZRANB2, ZRANB2-AS2, NEGR1-IT1, NEGR1, LINC01360
NOA13	1	p31.1	70,080,248-75,304,409	5224162	LOH	LRRC7, PIN1P1, LRRC40, SRSF11, ANKRD13C, HHLA3, CTH, LINC01788, PTGER3, ZRANB2-AS1, MIR186, ZRANB2, ZRANB2-AS2, NEGR1-IT1, NEGR1, LINC01360, LRRIQ3, FPGT, FPGT-TNNI3K, TNNI3K, ERICH3-AS1, ERICH3, CRYZ, TYW3
NOA7	3	q11.2 - q12.1	96,026,992-99,974,457	3947466	LOH	MIR8060, EPHA6, ARL6, CRYBG3, RIOX2, GABRR3, OR5AC2, OR5H1, OR5H14, OR5H15, OR5H6, OR5H2, OR5K4, OR5K3,

Indivíduos portadores	Cromossomo	Banda	Região	Tamanho (Pb)	Evento	Genes
NOA2	3	q11.2 - q12.2	96,026,992-100,022,457	3995466	LOH	OR5K1, OR5K2, CLDND1, GPR15, CPOX, ST3GAL6-AS1, ST3GAL6, DCBLD2, COL8A1, MIR548G, HP09053, MIR3921, FILIP1L, CMSS1, TMEM30CP MIR8060, EPHA6, ARL6, CRYBG3, RIOX2, GABRR3, OR5AC2, OR5H1, OR5H14, OR5H15, OR5H6, OR5H2, OR5K4, OR5K3, OR5K1, OR5K2, CLDND1, GPR15, CPOX, ST3GAL6-AS1, ST3GAL6, DCBLD2, COL8A1, MIR548G, HP09053, MIR3921, FILIP1L, CMSS1, TMEM30CP, TBC1D23
EO4	3	q11.2 - q12.3	96,349,310-101,552,010	5202701	LOH	EPHA6, ARL6, CRYBG3, RIOX2, GABRR3, OR5AC2, OR5H1, OR5H14, OR5H15, OR5H6, OR5H2, OR5K4, OR5K3, OR5K1, OR5K2, CLDND1, GPR15, CPOX, ST3GAL6-AS1, ST3GAL6, DCBLD2, COL8A1, MIR548G, HP09053, MIR3921, FILIP1L, CMSS1, TMEM30CP, TBC1D23, NIT2, TOMM70, LNP1, TMEM45A, ADGRG7, TFG, ABI3BP, IMPG2, SENP7, FAM172BP, TRMT10C, PCNP, ZBTB11, ZBTB11-AS1, RPL24, PDCL3P4, CEP97, NXPE3, NFKBIZ
EO1	4	p16.3 - p16.2	3,524,548-5,855,313	2330766	LOH	LRPAP1, LINC00955, LINC02171, ADRA2C, FAM86EP, OTOP1, TMEM128, LYAR, ZBTB49, NSG1, STX18-IT1, STX18, STX18-AS1, SNORD162, LOC101928279, LINC01396, MSX1, LOC101928306, CYTL1, STK32B, LINC01587, EVC2, EVC, CRMP1

Indivíduos portadores	Cromossomo	Banda	Região	Tamanho (Pb)	Evento	Genes
NOA5	4	p16.3 - p16.2	2,422,026-5,183,586	2761561	LOH	<i>CFAP99, RNF4, FAM193A, TNIP2, SH3BP2, ADD1, MFSD10, NOP14-AS1, NOP14, GRK4, HTT-AS, HTT, MSANTD1, RGS12, HGFAC, DOK7, LRPAP1, LINC00955, LINC02171, ADRA2C, FAM86EP, OTOP1, TMEM128, LYAR, ZBTB49, NSG1, STX18-IT1, STX18, STX18-AS1, SNORD162, LOC101928279, LINC01396, MSX1, LOC101928306, CYTL1, STK32B</i>
EO7	4	p16.3 - p16.1	0-6,882,617	6882618	LOH	<i>ZNF595, ZNF718, ZNF876P, ZNF732, MIR571, ZNF141, ABCA11P, ZNF721, PIGG, PDE6B, ATP5I, MYL5, MFSD7, PCGF3, LOC100129917, CPLX1, GAK, TMEM175, DGKQ, SLC26A1, IDUA, FGFR1, RNF212, TMED11P, LOC105374344, SPON2, LOC100130872, CTBP1-AS, CTBP1, CTBP1-AS2, MAEA, UVSSA, CRIPAK, NKX1-1, FAM53A, SLBP, TMEM129, TACC3, FGFR3, LETM1, NSD2, SCARNA22, MIR943, NELFA, C4orf48, NAT8L, POLN, HAUS3, MIR4800, MXD4, ZFYVE28, CFAP99, RNF4, FAM193A, TNIP2, SH3BP2, ADD1, MFSD10, NOP14-AS1, NOP14, GRK4, HTT-AS, HTT, MSANTD1, RGS12, HGFAC, DOK7, LRPAP1, LINC00955, LINC02171, ADRA2C, FAM86EP, OTOP1, TMEM128, LYAR, ZBTB49, NSG1, STX18-IT1, STX18, STX18-AS1, SNORD162, LOC101928279, LINC01396, MSX1, LOC101928306, CYTL1, STK32B, LINC01587, EVC2, EVC, CRMP1, MIR378D1, JAKMIP1,</i>

Indivíduos portadores	Cromossomo	Banda	Região	Tamanho (Pb)	Evento	Genes
						LOC285484, WFS1, PPP2R2C, MAN2B2, MRFAP1, LOC105374366, LOC93622, S100P, MRFAP1L1, BLOC1S4, KIAA0232
NOA13	11	p11.2 - p11.12	45,134,776-50,768,675	5633900	LOH	PRDM11, SYT13, LOC101928812, LOC399886, CHST1, MIR7154, LOC100507384, DKFZp779M0652, SLC35C1, CRY2, MAPK8IP1, C11orf94, PEX16, LARGE2, PHF21A, LOC101928894, CREB3L1, DGKZ, MIR4688, MDK, CHRM4, MIR3160-1, MIR3160-2, AMBRA1, HARBI1, ATG13, ARHGAP1, ZNF408, F2, MIR5582, SNORD67, CKAP5, LRP4-AS1, LRP4, C11orf49, ARFGAP2, MIR6745, PACSIN3, DDB2, ACP2, NR1H3, LOC101928943, MADD, MYBPC3, SPI1, MIR4487, SLC39A13, PSMC3, RAPSN, CELF1, PTPMT1, KBTBD4, NDUFS3, FAM180B, C1QTNF4, MTCH2, AGBL2, FNBP4, NUP160, PTPRJ, MIR3161, OR4B1, OR4X2, OR4X1, OR4S1, OR4C3, OR4C45, OR4C5, OR4A47, TRIM49B, TRIM64C, FOLH1, LOC440040, OR4C13, OR4C12, LOC441601, LOC646813
EO7	11	p11.2 - p11.12	44,703,138-50,768,675	6065538	LOH	TSPAN18, TP53I11, LOC221122, PRDM11, SYT13, LOC101928812, LOC399886, CHST1, MIR7154, LOC100507384, DKFZp779M0652, SLC35C1, CRY2, MAPK8IP1, C11orf94, PEX16, LARGE2, PHF21A, LOC101928894, CREB3L1, DGKZ, MIR4688, MDK, CHRM4, MIR3160-1, MIR3160-2, AMBRA1, HARBI1, ATG13, ARHGAP1, ZNF408, F2, MIR5582,

Indivíduos portadores	Cromossomo	Banda	Região	Tamanho (Pb)	Evento	Genes
NOA12	11	p11.2 - p11.12	44,055,682-50,768,675	6712994	LOH	<p>SNORD67, CKAP5, LRP4-AS1, LRP4, C11orf49, ARFGAP2, MIR6745, PACSIN3, DDB2, ACP2, NR1H3, LOC101928943, MADD, MYBPC3, SPI1, MIR4487, SLC39A13, PSMC3, RAPSN, CELF1, PTPMT1, KBTBD4, NDUFS3, FAM180B, C1QTNF4, MTCH2, AGBL2, FNBP4, NUP160, PTPRJ, MIR3161, OR4B1, OR4X2, OR4X1, OR4S1, OR4C3, OR4C45, OR4C5, OR4A47, TRIM49B, TRIM64C, FOLH1, LOC440040, OR4C13, OR4C12, LOC441601, LOC646813</p> <p>ACCSL, ACCS, EXT2, ALX4, CD82, TSPAN18, TP53I11, LOC221122, PRDM11, SYT13, LOC101928812, LOC399886, CHST1, MIR7154, LOC100507384, DKFZp779M0652, SLC35C1, CRY2, MAPK8IP1, C11orf94, PEX16, LARGE2, PHF21A, LOC101928894, CREB3L1, DGKZ, MIR4688, MDK, CHRM4, MIR3160-1, MIR3160-2, AMBRA1, HARBI1, ATG13, ARHGAP1, ZNF408, F2, MIR5582, SNORD67, CKAP5, LRP4-AS1, LRP4, C11orf49, ARFGAP2, MIR6745, PACSIN3, DDB2, ACP2, NR1H3, LOC101928943, MADD, MYBPC3, SPI1, MIR4487, SLC39A13, PSMC3, RAPSN, CELF1, PTPMT1, KBTBD4, NDUFS3, FAM180B, C1QTNF4, MTCH2, AGBL2, FNBP4, NUP160, PTPRJ, MIR3161, OR4B1, OR4X2, OR4X1, OR4S1, OR4C3, OR4C45, OR4C5, OR4A47, TRIM49B, TRIM64C,</p>

Indivíduos portadores	Cromossomo	Banda	Região	Tamanho (Pb)	Evento	Genes
						<i>FOLH1, LOC440040, OR4C13, OR4C12, LOC441601, LOC646813</i>
NOA6	12	q21.1 - q21.2	72,406,008-75,860,394	3454387	LOH	<i>TPH2, TRHDE-AS1, TRHDE, LOC101928137, LOC100507377, ATXN7L3B, KCNC2, CAPS2, GLIPR1L1, GLIPR1L2</i>
EO7	12	q21.1 - q21.2	71,652,364-76,254,943	4602580	LOH	<i>LGR5, ZFC3H1, THAP2, TMEM19, RAB21, MRS2P2, TBC1D15, TPH2, TRHDE-AS1, TRHDE, LOC101928137, LOC100507377, ATXN7L3B, KCNC2, CAPS2, GLIPR1L1, GLIPR1L2, GLIPR1, KRR1</i>
NOA16	12	q21.1 - q21.31	71,907,062-80,700,192	8793131	LOH	<i>LGR5, ZFC3H1, THAP2, TMEM19, RAB21, MRS2P2, TBC1D15, TPH2, TRHDE-AS1, TRHDE, LOC101928137, LOC100507377, ATXN7L3B, KCNC2, CAPS2, GLIPR1L1, GLIPR1L2, GLIPR1, KRR1, PHLDA1, NAP1L1, BBS10, OSBPL8, ZDHHC17, CSRP2, E2F7, NAV3, LOC105369860, SYT1, MIR1252, PAWR, PPP1R12A, OTOGL</i>

Tabela 7 - Alterações genômicas encontradas por meio da análise descritiva nos pacientes com oligozoospermia extrema. EO - Oligozoospermia extrema.

Indivíduos portadores	Cromossomo	Banda	Região	Tamanho (Pb)	Evento	Genes
EO3;EO5	2	q31.1	172,948,765-172,952,539	1067	Perda em homozigose	<i>DLX2</i>
EO1	2	q31.1	172,964,936-172,966,424	1489	Perda em homozigose	<i>DLX2</i>
EO2	6	p25.3	1,613,255-1,620,329	7075	Perda em homozigose	<i>FOXC1</i>
EO5	6	p25.3	1,613,405-1,627,140	13736	Perda em homozigose	<i>FOXC1, GMDS</i>
EO1	6	p25.3	1,613,191-1,627,140	13950	Perda em homozigose	<i>FOXC1, GMDS</i>
EO4	8	q11.1 - q11.21	46,942,956-51,205,433	4262478	LOH	<i>ASNSP1, LINC00293, LOC100287846, SPIDR, CEBPD, PRKDC, MCM4, UBE2V2, LOC101929217, LOC101929268, EFCAB1, SNAI2, C8orf22, LOC100507464, SNTG1</i>
EO5	8	q11.1 - q11.21	46,942,956-51,444,892	4501937	LOH	<i>ASNSP1, LINC00293, LOC100287846, SPIDR, CEBPD, PRKDC, MCM4, UBE2V2, LOC101929217, LOC101929268, EFCAB1, SNAI2, C8orf22, LOC100507464, SNTG1</i>

Tabela 8 - Alterações genômicas encontradas por meio da análise descritiva nos pacientes com azoospermia não obstrutiva. NOA – Azoospermia não obstrutiva.

Indivíduos portadores	Cromossomo	Banda	Região	Tamanho (Pb)	Evento	Genes
NOA1;NOA10	2	q31.1	172,948,765-172,952,539	3775	Perda em homozigose	<i>DLX1</i>
NOA5;NOA7;NOA8	19	p13.3	4,502,351-4,641,905	139555	Ganho em homozigose	<i>PLIN4, PLIN5, LRG1, SEMA6B, TNFAIP8L1</i>
NOA3	16	p13.3	2,128,512-2,144,285	15774	Ganho	<i>TSC2, MIR1225, LOC105371049, PKD1</i>
NOA1	16	p13.3	2,127,944-2,144,285	16342	Ganho	<i>TSC2, MIR1225, LOC105371049, PKD1</i>
NOA6	1	p31.1	70,080,248-74,013,952	3933705	LOH	<i>LRRC7, PIN1P1, LRRC40, SRSF11, ANKRD13C, HHLA3, CTH, LINC01788, PTGER3, ZRANB2-AS1, MIR186, ZRANB2, ZRANB2-AS2, NEGR1-IT1, NEGR1, LINC01360</i>
NOA7	1	p31.1	70,310,623-74,309,879	3999257	LOH	<i>LRRC7, PIN1P1, LRRC40, SRSF11, ANKRD13C, HHLA3, CTH, LINC01788, PTGER3, ZRANB2-AS1, MIR186, ZRANB2, ZRANB2-AS2, NEGR1-IT1, NEGR1, LINC01360</i>
NOA15	1	p31.1	69,459,004-74,013,952	4554949	LOH	<i>LRRC7, PIN1P1, LRRC40, SRSF11, ANKRD13C, HHLA3, CTH, LINC01788, PTGER3, ZRANB2-AS1, MIR186, ZRANB2, ZRANB2-AS2, NEGR1-IT1, NEGR1, LINC01360</i>
NOA13	1	p31.1	70,080,248-75,304,409	5224162	LOH	<i>LRRC7, PIN1P1, LRRC40, SRSF11, ANKRD13C, HHLA3, CTH, LINC01788, PTGER3, ZRANB2-AS1, MIR186,</i>

Indivíduos portadores	Cromossomo	Banda	Região	Tamanho (Pb)	Evento	Genes
						<i>ZRANB2, ZRANB2-AS2, NEGR1-IT1, NEGR1, LINC01360, LRRIQ3, FPGT, FPGT-TNNI3K, TNNI3K, ERICH3-AS1, ERICH3, CRYZ, TYW3</i>
NOA15	1	p31.1	80,712,649-83,146,588	2433940	LOH	<i>LINC01781, LOC101927434, ADGRL2</i>
NOA11	1	p31.1	79,218,310-82,288,270	3069961	LOH	<i>ADGRL4, LINC01781, LOC101927434, ADGRL2</i>
NOA11	7	q21.11	78,698,453-81,536,226	2837774	LOH	<i>MAGI2, MAGI2-AS3, GNAI1, LOC101927269, GNAT3, CD36, SEMA3C, LOC105369146, LOC100128317, HGF</i>
NOA16	7	q21.11 - q21.12	78,881,218-86,756,707	7875490	LOH	<i>MAGI2, MAGI2-AS3, GNAI1, LOC101927269, GNAT3, CD36, SEMA3C, LOC105369146, LOC100128317, HGF, LOC101927356, CACNA2D1, PCLO, SEMA3E, SEMA3A, LOC101927378, SEMA3D, LINC00972, GRM3, KIAA1324L</i>

Tabela 9 - Alterações de variação de número de cópias (CNVs) do tipo ganho encontradas no grupo amostral após a análise individualizada. EO - Oligozoospermia extrema; NOA – Azoospermia não obstrutiva.

Indivíduos portadores	Cromossomo	Banda	Região	Tamanho (Pb)	Evento	Genes
EO7	4	p16.1	6,882,617-7,388,292	505676	Ganho em homozigose	KIAA0232, TBC1D14, LOC100129931, CCDC96, TADA2B, GRPEL1, FLJ36777, MIR4798, SORCS2
EO6	6	p21.33	31,975,455-32,001,752	26298	Ganho em homozigose	CYP21A2, CYP21A1P, TNXA, TNXB, STK19, C4B, C4B_2
EO6	7	q21.3	94,285,871-94,287,020	1150	Ganho	PEG10
NOA1	7	q36.3	155,596,329-155,600,169	3841	Ganho em homozigose	SHH
EO6	9	q33.3	129,457,493-129,460,982	3490	Ganho em homozigose	LMX1B
EO6	15	q26.2	96,876,153-96,878,165	2013	Ganho em homozigose	NR2F2, MIR1469
EO7	17	q25.1	74,366,955-74,640,086	273132	Ganho em homozigose	SPHK1, UBE2O, AANAT, RHBDF2, CYGB, PRCD, SNORD1C, SNORD1B, SNHG16, SNORD1A, ST6GALNAC2, ST6GALNAC1
EO7	21	q22.3	48,068,564-48,129,895	61332	Ganho em homozigose	PRMT2
NOA3	22	q11.21	19,745,033-19,750,903	5871	Ganho	TBX1
NOA3	X	q13.1	67,950,466-68,845,123	894658	Ganho	EFNB1, PJA1, LINC00269, FAM155B, EDA
NOA10	X	q12	65,760,836-65,939,751	178916	Ganho em homozigose	EDA2R
NOA10	X	q13.3	74,454,059-74,660,438	206380	Ganho em homozigose	UPRT, ZDHHC15

Indivíduos portadores	Cromossomo	Banda	Região	Tamanho (Pb)	Evento	Genes
NOA5	X	q21.1	77,158,835-77,160,060	1226	Ganho em homozigose	<i>COX7B</i>
NOA5	X	q24	118,986,572-119,007,025	20454	Ganho em homozigose	<i>UPF3B, RNF113A, NDUFA1</i>
NOA1	Y	p11.2	8,406,069-8,512,073	106005	Ganho	<i>LINC00279</i>

Tabela 10 - Alterações de variação de número de cópias (CNVs) do tipo perda encontradas no grupo amostral após a análise individualizada. EO - Oligozoospermia extrema; NOA – Azoospermia não obstrutiva.

Indivíduos portadores	Cromossomo	Banda	Região	Tamanho (Pb)	Evento	Genes
EO1	1	p36.33	845,241-872,469	27229	Perda em homozigose	<i>LOC100130417, SAMD11</i>
EO4	3	p24.3	20,252,447-20,765,577	513131	Perda	<i>LOC101927829</i>
EO1	7	p22.3	1,371,562-1,823,144	451583	Perda em homozigose	<i>MICALL2, INTS1, MAFK, TMEM184A, PSMG3, PSMG3-AS1, TFAMP1, ELFN1, ELFN1-AS1</i>
EO1	7	q21.3	94,285,871-94,287,020	1150	Perda em homozigose	<i>PEG10</i>
EO1	7	q36.3	155,598,664-155,600,484	1821	Perda em homozigose	<i>SHH</i>
NOA13	7	q33	133,170,401-133,647,334	476934	Perda	<i>EXOC4, LOC101928861</i>
NOA10	13	q34	115,053,229-115,169,878	116650	Perda em homozigose	<i>UPF3A, CHAMP1, LINC01054</i>
EO1	16	p11.2	32,893,672-32,895,727	2056	Perda em homozigose	<i>SLC6A10P</i>
EO1	19	q13.43	57,349,448-57,351,137	1690	Perda	<i>ZIM2, PEG3</i>
EO7	20	q13.32	57,463,263-57,466,984	3722	Perda em homozigose	<i>GNAS, LOC101927932</i>
EO6	X	p11.23	48,369,683-48,371,126	1444	Perda	<i>PORCN</i>
EO1	X	q28	152,955,592-152,957,322	1731	Perda em homozigose	<i>SLC6A8</i>

6.1.5 Análise de expressão gênica

A última análise foi feita utilizando bancos de dados públicos de expressão gênica. Foram feitas duas análises: uma utilizando dados de biópsia de indivíduos com azoospermia; e outra com dados de espermatozoides de indivíduos com oligozoospermia.

Na análise feita com dados obtidos por biópsia de indivíduos com azoospermia, foram encontrados quarenta genes diferencialmente expressos que estavam presentes em alguma das alterações genômicas identificadas por meio da técnica de *array-CGH* (Tabela 11). Já na análise feita com dados de espermatozoides de indivíduos com oligozoospermia, foram encontrados noventa e seis genes diferencialmente expressos que estavam presentes em alguma das alterações genômicas identificadas pela técnica (Tabela 12).

Tabela 11 - Genes diferencialmente expressos em pacientes com azoospermia encontrados em comum com os resultados obtidos por *array*-CGH. C- Controle; EO- Oligozoospermia extrema; NOA- Azoospermia não obstrutiva; FEP- Falência espermatogênica primária (Oligozoospermia extrema + Azoospermia não obstrutiva) IDV- Indivíduo.

Gene	Log ratio	P-value	Evento	Região	Grupo
<i>DLX1</i>	+ 0,1522	0,0338	Perda	2q31.1	NOA
<i>TNFAIP8L1</i>	- 1,4753	0,0000	Ganho	19p13.3	NOA
<i>TSC2</i>	- 0,5757	0,0011	Ganho	16p13.3	NOA
<i>CD36</i>	+ 1.1229	0,0290	LOH	7q21.11- q21.12	NOA
<i>HGF</i>	+ 0,7107	0,0085	LOH	7q21.11- q21.12	NOA
<i>UBE2V2</i>	+ 0,2261	0,0260	LOH	8q11.1- q11.21	OE
<i>EFCAB1</i>	- 0,4184	0,0073	LOH	8q11.1- q11.21	OE
<i>SNAI2</i>	+ 0,7830	0,0293	LOH	8q11.1- q11.21	OE
<i>ADAM3A</i>	- 1,7541	0,0140	Perda	8p11.22	FEP
<i>NEGR1</i>	+ 0,7849	0,0084	LOH	1p31.1	FEP
<i>FPGT</i>	+ 0,4671	0,0103	LOH	1p31.1	FEP
<i>ST3GAL6</i>	+ 0,7172	0,0348	LOH	3q11.2- p12.1	FEP

Gene	Log ratio	P-value	Evento	Região	Grupo
<i>STK32B</i>	- 0,7381	0,0126	LOH	4p16.3- p16.2	FEP
<i>SYT13</i>	- 0,1301	0,0221	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>CHST1</i>	- 0,2748	0,0328	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>CRY2</i>	- 0,2320	0,0277	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>MAPK8IP1</i>	- 0,6926	0,0175	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>PEX16</i>	- 0,1830	0,0409	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>DGKZ</i>	- 0,3190	0,0127	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>CHRM4</i>	- 1,2847	0,0001	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>HARBI1</i>	- 0,3239	0,0314	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>C11orf49</i>	- 0,5438	0,0291	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>ARFGAP2</i>	- 0,3453	0,0058	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>NR1H3</i>	- 0,5657	0,0006	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>MADD</i>	- 0,6194	0,0023	LOH	11p11.2- p11.12	FEP

Gene	Log ratio	P-value	Evento	Região	Grupo
<i>SLC39A13</i>	- 0,5533	0,0023	LOH	11p11.2-p11.12	FEP
<i>PSMC3</i>	- 0,4721	0,0044	LOH	11p11.2-p11.12	FEP
<i>KBTBD4</i>	- 0,2589	0,0220	LOH	11p11.2-p11.12	FEP
<i>AGBL2</i>	- 1,2776	0,0277	LOH	11p11.2-p11.12	FEP
<i>OR4X1</i>	+ 0,1611	0,0073	LOH	11p11.2-p11.12	FEP
<i>KCNC2</i>	+ 0,1529	0,0046	LOH	12q21.1-q21.2	FEP
<i>KIAA0232</i>	+ 0,3086	0,0020	Ganho	4p16.1	IDV (EO7)
<i>CCDC96</i>	- 1,0549	0,0002	Ganho	4p16.1	IDV (EO7)
<i>STK19</i>	- 0,7891	0,0002	Ganho	6p21.33	IDV (EO6)
<i>MICALL2</i>	- 0,2968	0,0015	Perda	7q22.3	IDV (EO1)
<i>INTS1</i>	- 0,8553	0,0001	Perda	7q22.3	IDV (EO1)
<i>PSMG3</i>	+ 0,3527	0,0033	Perda	7p22.3	IDV (EO1)
<i>EXOC4</i>	+ 0,2709	0,0111	Perda	7q33	IDV (NOA14)

Gene	Log ratio	P-value	Evento	Região	Grupo
SNORD1A	+ 0,1858	0,0412	Ganho	17q25.1	IDV (EO7)
ST6GALNAC2	- 1,5867	0,0002	Ganho	17q25.1	IDV (EO7)

Tabela 12 - Genes diferencialmente expressos em indivíduos com teratozoospermia encontrados em comum com análises de *array*-CGH. C- Controle; EO- Oligozoospermia extrema; NOA- Azoospermia não obstrutiva; FEP- Falência espermatogênica primária (Oligozoospermia extrema + Azoospermia não obstrutiva); IDV- Indivíduo.

Gene	Log ratio	P-value	Evento	Região	Grupo
<i>SEMA6B</i>	+ 0,3465	0,0027	Ganho	19q13.3	NOA
<i>TSC2</i>	+ 0,3182	0,0028	Ganho	16q13.3	NOA
<i>PKD1</i>	+ 0,1479	0,0360	Ganho	16q13.3	NOA
<i>MAGI2</i>	+ 0,9266	0,0000	LOH	7q21.11	NOA
<i>GNAI1</i>	- 0,1420	0,0378	LOH	7q21.11	NOA
<i>CD36</i>	+ 0,2000	0,0037	LOH	7q21.11	NOA
<i>SEMA3C</i>	+ 0,3073	0,0060	LOH	7q21.11	NOA
<i>HGF</i>	+ 0,1118	0,0273	LOH	7q21.11	NOA
<i>PRKDC</i>	- 0,5990	0,0037	LOH	8q11.1-q.11.21	OE
<i>MCM4</i>	- 0,5680	0,0100	LOH	8q11.1-q.11.21	OE
<i>UBE2V2</i>	- 0,8710	0,0007	LOH	8q11.1-q.11.21	OE
<i>EFCAB1</i>	- 0,7660	0,0015	LOH	8q11.1-q.11.21	OE
<i>SNAI2</i>	+ 0,2386	0,0001	LOH	8q11.1-q.11.21	OE

Gene	Log ratio	P-value	Evento	Região	Grupo
<i>SNTG1</i>	+ 1,8097	0,0000	LOH	8q11.1-q.11.21	OE
<i>ADAM3A</i>	- 2,2190	0,0016	Perda	8p11.22	FEP
<i>NEGR1</i>	+ 1,0193	0,0000	LOH	1p31.1	FEP
<i>TNNI3K</i>	- 0,8000	0,0156	LOH	1p31.1	FEP
<i>EPHA6</i>	- 1,1960	0,0038	LOH	3q11.2-p12.1	FEP
<i>ARL6</i>	- 1,4140	0,0000	LOH	3q11.2-p12.1	FEP
<i>OR5H1</i>	+ 0,2166	0,0009	LOH	3q11.2-p12.1	FEP
<i>OR5K1</i>	+ 0,4874	0,0001	LOH	3q11.2-p12.1	FEP
<i>CLDND1</i>	- 1,4200	0,0005	LOH	3q11.2-p12.1	FEP
<i>GPR15</i>	+ 0,4444	0,0002	LOH	3q11.2-p12.1	FEP
<i>ST3GAL6</i>	- 0,4520	0,0169	LOH	3q11.2-p12.1	FEP
<i>DCBLD2</i>	+ 0,4967	0,0000	LOH	3q11.2-p12.1	FEP
<i>COL8A1</i>	+ 0,3402	0,0003	LOH	3q11.2-p12.1	FEP
<i>FILIP1L</i>	- 0,8880	0,0175	LOH	3q11.2-p12.1	FEP

Gene	Log ratio	P-value	Evento	Região	Grupo
<i>LRPAP1</i>	- 0,9790	0,0000	LOH	4p16.3- p16.2	FEP
<i>TMEM128</i>	- 0,6250	0,0014	LOH	4p16.3- p16.2	FEP
<i>LYAR</i>	- 2,2060	0,0000	LOH	4p16.3- p16.2	FEP
<i>STX18</i>	- 1,3740	0,0000	LOH	4p16.3- p16.2	FEP
<i>MSX1</i>	+ 0,3632	0,0001	LOH	4p16.3- p16.2	FEP
<i>CYTL1</i>	+ 0,1586	0,0321	LOH	4p16.3- p16.2	FEP
<i>STK32B</i>	+ 0,3795	0,0198	LOH	4p16.3- p16.2	FEP
<i>EVC</i>	+ 0,4524	0,0001	LOH	4p16.3- p16.2	FEP
<i>PRDM11</i>	+ 0,4712	0,0000	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>SYT13</i>	+ 0,6063	0,0000	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>SLC35C1</i>	+ 0,4596	0,0001	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>MAPK8IP1</i>	+ 0,2126	0,0050	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>PHF21A</i>	+ 0,3572	0,0000	LOH	11p11.2- p11.12	FEP

Gene	Log ratio	P-value	Evento	Região	Grupo
<i>DGKZ</i>	- 0,2640	0,0281	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>CHRM4</i>	+ 0,2149	0,0125	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>ARHGAP1</i>	- 0,5320	0,0431	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>F2</i>	+ 0,3214	0,0031	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>CAPS</i>	- 0,2150	0,0460	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>C11orf49</i>	- 0,7300	0,0002	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>PACSIN3</i>	+ 0,4564	0,0001	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>ACP2</i>	- 0,1970	0,0083	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>NR1H3</i>	- 0,4410	0,0003	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>MADD</i>	+ 0,3584	0,0086	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>MYBPC3</i>	+ 0,5878	0,0002	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>SPI1</i>	+ 0,1601	0,0198	LOH	11p11.2- p11.12	FEP
<i>SLC39A13</i>	- 1,2820	0,0000	LOH	11p11.2- p11.12	FEP

Gene	Log ratio	P-value	Evento	Região	Grupo
<i>PTPMT1</i>	-1,4730	0,0005	LOH	11p11.2-p11.12	FEP
<i>NDUFS3</i>	- 2,3830	0,0000	LOH	11p11.2-p11.12	FEP
<i>MTCH2</i>	- 2,2990	0,0000	LOH	11p11.2-p11.12	FEP
<i>AGBL2</i>	- 1,6570	0,0017	LOH	11p11.2-p11.12	FEP
<i>FNBP4</i>	- 0,5970	0,0092	LOH	11p11.2-p11.12	FEP
<i>NUP160</i>	- 1,8380	0,0004	LOH	11p11.2-p11.12	FEP
<i>PTPRJ</i>	+ 0,9121	0,0000	LOH	11p11.2-p11.12	FEP
<i>FOLH1</i>	+ 1,1841	0,0000	LOH	11p11.2-p11.12	FEP
<i>TPH2</i>	+ 0,5510	0,0000	LOH	12q21.1-q21.2	FEP
<i>TRHDE</i>	+ 0,3734	0,0000	LOH	12q21.1-q21.2	FEP
<i>KCNC2</i>	+ 0,6525	0,0000	LOH	12q21.1-q21.2	FEP
<i>CAPS2</i>	- 0,8490	0,0340	LOH	12q21.1-q21.2	FEP
<i>GLIPR1L1</i>	- 2,3510	0,0000	LOH	12q21.1-q21.2	FEP

Gene	Log ratio	P-value	Evento	Região	Grupo
<i>KIAA0232</i>	+ 0,8594	0,0002	Ganho	4p16.1	IDV (E7)
<i>CCDC96</i>	- 2,1270	0,0000	Ganho	4p16.1	IDV (E7)
<i>GRPEL1</i>	- 0,7190	0,0001	Ganho	4p16.1	IDV (E7)
<i>SORCS2</i>	+ 0,7456	0,0092	Ganho	4p16.1	IDV (E7)
<i>EFNB1</i>	+ 0,5083	0,0000	Ganho	5q13.1	IDV (A3)
<i>EDA</i>	+ 0,3144	0,0001	Ganho	5q13.1	IDV (A3)
<i>CYP21A2</i>	+ 0,2194	0,0093	Ganho	6p21.33	IDV (E6)
<i>TNXA</i>	+ 0,1935	0,0005	Ganho	6p21.33	IDV (E6)
<i>TNXB</i>	+ 0,2378	0,0015	Ganho	6p21.33	IDV (E6)
<i>STK19</i>	+ 0,8382	0,0000	Ganho	6p21.33	IDV (E6)
<i>INTS1</i>	- 0,5050	0,0000	Perda	7p22.3	IDV (E1)
<i>MAFK</i>	+ 0,6947	0,0451	Perda	7p22.3	IDV (E1)
<i>TMEM184A</i>	+ 0,3116	0,0139	Perda	7p22.3	IDV (E1)
<i>PEG10</i>	+ 0,4137	0,0002	Ganho Perda	7q21.3	IDV (E6) IDV (E1)
<i>EXOC4</i>	- 1,1500	0,0000	Perda	7q33	IDV (A13)
<i>LMX1B</i>	+ 0,3710	0,0000	Ganho	9q33.3	IDV (E6)
<i>UPF3A</i>	- 1,3610	0,0003	Perda	13q34	IDV (A10)

Gene	Log ratio	P-value	Evento	Região	Grupo
<i>NR2F2</i>	+ 0,1324	0,0033	Ganho	15q26.2	IDV (E6)
<i>SPHK1</i>	+ 0,2066	0,0344	Ganho	17q22.3	IDV (E7)
<i>AANAT</i>	+ 0,1854	0,0012	Ganho	17q22.3	IDV (E7)
<i>CYGB</i>	+ 0,5901	0,0001	Ganho	17q22.3	IDV (E7)
<i>PEG3</i>	+ 0,9031	0,0000	Perda	19q13.43	IDV (E1)
<i>GNAS</i>	- 2,5320	0,0000	Perda	20q13.32	IDV (E7)
<i>PRMT2</i>	- 0,3000	0,0207	Ganho	21q22.3	IDV (E7)
<i>TBX1</i>	- 1,0840	0,0000	Ganho	22q11.21	IDV (A3)
<i>PORCN</i>	+ 0,4411	0,0000	Perda	Xp11.23	IDV (E6)
<i>UPRT</i>	+ 0,4205	0,0261	Ganho	Xq13.3	IDV (A10)
<i>ZDHHC15</i>	+ 0,1459	0,0056	Ganho	Xq13.3	IDV (A10)
<i>COX7B</i>	+ 0,3952	0,0003	Ganho	Xq21.1	IDV (A5)
<i>NDUFA1</i>	- 1,4040	0,0000	Ganho	Xq24	IDV (A5)

DISCUSSÃO

7. Discussão

Esse estudo foi o primeiro a comparar dois grupos de pacientes com falência espermatogênica primária através da técnica *array-CGH+SNP*, além disso foi também o primeiro a comparar os resultados obtidos com bancos de dados genômicos de expressão.

A técnica de *array-CGH* tem se mostrado uma metodologia de sucesso ao sugerir genes candidatos à infertilidade masculina idiopática (TÜTTELMANN et al., 2011; STOUFFS et al., 2012; KRAUSZ et al., 2012; DONG et al., 2015; CHIANESE et al., 2014; STOUFFS et al., 2015), possibilitando a avaliação indireta de rearranjos cromossômicos submicroscópicos que podem estar associados ao fenótipo (Halder et al., 2016). Acredita-se que CNVs e LOHs sejam fatores importantes que resultam em doenças comuns e complexas, como é o caso da infertilidade masculina (WANG., et al 2015).

Até o momento, há poucas informações sobre a patogenicidade das regiões de perda de heterozigiosidade (LOHs). Esse tipo de alteração genômica está fortemente associada à perda do alelo selvagem, levando a predisposição ao câncer e a mutações germinativas, principalmente nos genes *RB1* e *BRCA1*. LOHs têm sido estudadas predominantemente em diferentes tipos de neoplasias, onde um alelo é perdido, gerando homozigose (RYLAND et al., 2015). Estudos relacionando esse tipo de variação com fenótipos complexos como a infertilidade masculina são inexistentes.

Sabe-se que essas regiões podem ser formadas através de erros mitóticos, *chromotripsis*, conversão gênica e reparo incorreto de quebra de DNA. Na maioria dos casos, não ocorre alteração do número de cópias. As LOHs de cópia neutra são compostas de regiões que sofreram perdas seguidas de duplicação do alelo remanescente (Figura 15), gerando dissomia uniparental, (WONG et al., 2004; WANG., et al 2015) ou de regiões idênticas por descendência (SOUTH et al., 2013). Esses tipos de LOHs não influenciam a variação do número de cópias e agem no fenótipo do indivíduo expondo alelos recessivos ou genes imprintados (D'AMOURS et al., 2014). Em câncer, é comum que as LOHs sejam formadas a partir de um gene composto por um alelo perdido e um alelo inativado. (RAMOS & AMORIM, 2015; RYLAND et al., 2015).

Figura 15 - Exemplificação do possível mecanismo formador de LOH de cópia neutra. Painel esquerdo: SNP heterozigoto; números indicam o número de cópias de cada alelo (normal = verde, mutante = vermelho). Painel do meio: deleção hemizigótica levando à perda do alelo normal. Painel direito: duplicação do alelo normal. A situação no painel do meio altera o número de cópias do gene, enquanto a situação no painel da direita representa número de cópias neutras.

Em nosso estudo, utilizando uma triagem criteriosa, foram selecionados pacientes com falência espermatozônica primária, incluindo um grupo com azoospermia não obstrutiva e um outro grupo com oligozoospermia extrema, com uma concentração menor que 1 milhão de espermatozoides por mL de ejaculado.

As análises iniciais sugeriram que as perdas genômicas dos pacientes oligozoospermicos extremos foram mais significativas, tendo assim, maior possibilidade de estarem envolvidas com o fenótipo de infertilidade.

Acredita-se que quanto maior a quantidade de espermatozoides, menor a quantidade de anomalias cromossômicas (PYLYP et al., 2013; FLANNIGAN & SCHLEGEL, 2017). Sendo assim, esperava-se que os indivíduos do grupo controle apresentassem menor quantidade de alterações quando comparados aos grupos amostrais. O grupo controle obteve quantidade de alterações por indivíduo próxima a 13, praticamente a mesma média encontrada nos pacientes com azoospermia não obstrutiva, o que não era esperado. Porém a média de alteração por indivíduo do grupo com oligozoospermia extrema foi de 17,42, maior que os demais grupos, o que corrobora com os dados da literatura que afirma que indivíduos com oligozoospermia extrema apresentam maior número de alterações cromossômicas a nível estrutural (SMITH et al., 2014; XIE et al., 2018).

A análise comparativa entre os tamanhos das alterações nos grupos amostrais e controle mostrou-se, a princípio, de acordo com estudos anteriores que acreditam que a gravidade das alterações é inversamente proporcional à produção de espermatozoides. Sendo assim, espera-se que os pacientes com azoospermia não obstrutiva possuam alterações genômicas maiores que os demais grupos (SMITH et al., 2014; XIE et al., 2018). O tamanho das alterações nos controles variou de 332pb

a 4.9Mb, o do grupo com oligozoospermia extrema obteve um intervalo de 332pb a 6.8Mb e, por último, os indivíduos com azoospermia não obstrutiva apresentaram uma variação de 552pb a 11.3MB, confirmando os achados da literatura. Além disso, esse último grupo foi o único a apresentar CNVs entre 1-5 Mb e apresentou uma curva ascendente quanto ao tamanho de alterações por indivíduo no gráfico de CNVs do tipo perda.

Em relação às LOHs, como era esperado, foram encontradas apenas variações acima de 1Mb, o que ocorre devido às sondas utilizadas na técnica de *array*-CGH+SNP não considerarem alterações menores do que esse valor.

7.1 Alterações genômicas em comum aos dois grupos de pacientes com falência espermato gênica primária (Oligozoospermia extrema + azoospermia não obstrutiva).

7.1.1 Genes da família ADAM

ADAM é uma proteína transmembrana que contém um domínio de desintegrina e metaloprotease. Dois genes dessa família estão mapeados na região de perda, 8p11.22 (Figura 16). As proteínas dessa família regulam a adesão, migração, desenvolvimento e sinalização celular e têm sido relacionadas a diversos processos biológicos, entre eles, cicatrização de feridas, desenvolvimento do coração, imunidade, angiogênese e fertilização. Porém, a regulação dessas proteases são complexas e na maioria dos casos ainda é desconhecida (PRIMAKOFF & MYLES, 2000 ; REISS & SAFTIG, 2009).

Ademais, essa família possui cerca de trinta e quatro membros em mamíferos, sendo que aproximadamente metade deles são expressos predominantemente em testículos e epidídimos. Os sistemas formados pela interação dos genes dessa família são modelos úteis para entender a interação de proteínas na superfície do espermatozoide, formando complexos críticos para a fertilização (CHO., 2012).

Entre esses genes, o *ADAM3a*, também conhecido como *CYRN1*, *ADAM3* ou *TMDC1* (Genatlas) e localizado na região de perda 8p11.22, está relacionado com a fertilização e com a infertilidade masculina. Estudos em camundongos *ADAM3*-null

mostraram que a falta desse gene causa infertilidade masculina, atuando na interação entre o espermatozoide e a zona pelúcida. Os camundongos utilizados na pesquisa apresentavam espermatozoides incapazes de penetrar na zona pelúcida e com dificuldades durante a migração no trato reprodutivo feminino até o óvulo. (NISHIMURA et al., 2007; YAMAGUCHI et al., 2009; TOKUHIRO et al., 2012).

Sabe-se que o processo de migração no trato reprodutivo feminino e penetração na zona pelúcida ocorre através de complexos, onde a proteína produzida pelo gene *ADAM3* interage com outros genes da mesma família, principalmente com o *ADAM2*, mas também há interação com *ADAM4*, *ADAM 5* e *ADAM6* (CHO., 2012).

Segundo o *genecards*, esse gene se encontra super expresso em testículos. Em nosso estudo, além de esse gene estar deletado em três pacientes, dois com oligozoospermia extrema e um com azoospermia não obstrutiva, este apresentou níveis de expressão extremamente baixos em ambos os estudos de expressão, com $p = -1,7541$ no estudo feito com material de biópsia de testículo de indivíduos com azoospermia não obstrutiva e $p = -1,8769$ no estudo feito com espermatozoides de indivíduos com teratozoospermia. Sugerimos que os indivíduos com oligozoospermia extrema, além de possuírem um nível extremamente baixo de espermatozoides, apresentam um fator adicional responsável pela infertilidade, sendo provável que seus espermatozoides estejam tendo dificuldades para penetrar na zona pelúcida e fertilizar o óvulo.

É importante também considerar que esse gene pode estar interagindo com outro sistema formado pela interação de outros genes, culminando em um envolvimento indireto com a espermatogênese e consequentemente com o fenótipo de falência espermatogênica primária.

7.1.2 Genes da família de receptores olfatórios (ORs)

Foram encontrados cerca de vinte e três receptores olfatórios em regiões de perda genômica em 15q11.2 (Figura 17) e perda de heterozigosidade (LOHs) em 3q11.2-q12.1; 11p11.2-p11.12 (Figuras 18 e 19), detectadas em onze (11) pacientes de nossa amostra.

Esses receptores fazem parte da maior família de quimiorreceptores, com cerca de 390 genes e 465 pseudogenes descritos em humanos (OLENDER et al., 2008). Acredita-se que famílias gênicas podem levar à instabilidade genômica através de mecanismos de recombinação não alélica que culminam em variantes de número de cópias (HAREL & LUPSKI, 2018).

A associação do olfato com a infertilidade é estudada há muitos anos. Em 1956, Whitten estudou o efeito da remoção dos bulbos olfatórios de camundongos e como resultado, os ovários e o útero dos animais reduziram drasticamente no período de seis semanas após a cirurgia. Em outro estudo, realizado em 1992, Parmentier e colaboradores identificaram a expressão de genes olfatórios no epitélio reprodutivo masculino e sugeriram que esses genes participavam da quimiotaxia durante a fecundação.

Outros genes olfatórios foram relacionados com a infertilidade, como é o caso do *OR2W3*, que possui SNPs relacionados com a infertilidade masculina idiopática nas populações chinesa e persa (PLASESKI et al., 2012; ZHANG et al., 2015; SIASI et al., 2016). Além disso, um estudo realizado por Flegel e colaboradores em 2016 mostrou que vários receptores olfatórios estão expressos nos espermatozoides, sugerindo que eles têm papel importante na reprodução (Figura 20).

Entre todas as regiões onde foram encontrados esses receptores, a região de perda, 15q11.2, parece estar relacionada com o fenótipo. Primeiro por se tratar de uma região de perda presente em 57% dos pacientes com oligozoospermia extrema, que foi o único tipo de alteração genômica significativamente diferente do controle. Ademais, essa região esteve ausente em cerca de 47% dos grupos com falência espermatogênica primária (oligozoospermia extrema + azoospermia não obstrutiva), englobando cerca de 43% dos pacientes com azoospermia não obstrutiva. Nessa região, foram encontrados três receptores olfatórios.

Figura 17- CNV de perda localizada na região 15q11.2. *linhas vermelhas indicam perdas.

Figura 18- LOH localizada na região 3q11.2-q12.1. *linhas amarelas indicam LOH's.

Figura 19 - LOH na região 11p11.2-p11.12. *linhas amarelas indicam LOH's.

Figura 20 - Receptores olfatórios expressos no espermatozoide (FLEGEL et al., 2016).

Segundo o *Genecards*, os três receptores olfatórios encontrados nessa região de deleção costumam estar super expressos em testículos. Deles, o *OR4N4* mostrou-se ser o mais provável responsável pelo fenótipo de alguns pacientes. Em 2013, foi investigada a expressão dos receptores olfatórios em diferentes tecidos e esse gene foi o receptor olfativo mais expresso no tecido testicular, além de não apresentar uma expressão significativa em outros tecidos (FLEGEL et al., 2013).

Apesar dos indícios a favor da relação desse gene com a infertilidade idiopática dos pacientes, nossas análises de expressão por bancos de dados públicos não corroboraram para a hipótese, pois o gene *OR4N4* não apresentou diminuição significativa da expressão nos pacientes inférteis analisados.

7.1.3 Genes da família GLI (*GLI Pathogenesis-Related Family - GLIPR*).

Essa família pertence à superfamília CAP. A maioria das proteínas pertencentes a essa superfamília tem função endócrina ou parácrina e estão envolvidas em vários

processos biológicos, entre eles a adesão célula-célula durante a fertilização. Essas proteínas são expressas abundantemente no sistema reprodutor masculino e são consideradas potenciais candidatas a reguladoras da infertilidade masculina (GIBBS, ROELANTS & O'BRYAN, 2008).

Os genes *GLIPR1L1* e *GLIPR1L2* pertencentes a essa família estão localizados em uma das regiões de perda de heterozigiosidade (LOHs) (12q21.1-q21.2) encontrada em três pacientes com falência espermatogênica primária, dois com azoospermia não obstrutiva e um com oligozoospermia extrema (Figura 21). Ambos os genes são superexpressos em testículos, mas o gene *GLIPR1L1* esteve pouco expresso nas análises feitas com bancos de dados públicos de indivíduos com teratozoospermia $p = -2,3510$. Este gene desempenha um papel na ligação entre espermatozoides e ovócitos, nos componentes CD9-positivos que são encontrados na cauda dos espermatozoides e também age nos espermatozoides durante sua maturação nos epidídimos (Genecards, GO). Além disso esse gene modifica o trânsito no epidídimo e está relacionado à ligação espermática à zona pelúcida em bovinos (CABALLERO et al., 2012). A ação desse gene nos epidídimos pode estar sendo prejudicada, atrapalhando a espermatogênese e levando ao fenótipo de falência espermatogênica primária.

7.1.4 Gene *ARL6* (ADP Ribosylation factor Like GTPase 6)

Localizado na região região de perda de heterozigiosidade (LOH), 3q11.2-12.1 (Figura 22). O gene *ARL6*, costuma estar superexpresso em testículos (Genecards, NCBI), mas no estudo de expressão realizado com pacientes teratozoospermicos, mostrou baixa expressão com $p = -1,4140$.

Mutações nesse gene estão relacionadas à síndrome de Bardet-Biedl. Essa doença é caracterizada por perda de visão, obesidade, polidactilia e alterações de genitália, com infertilidade masculina (US National Library of Medicine). Sabe-se que esse gene atua na regulação do tráfego intracelular (GO), mas não existem dados na literatura de como esse gene estaria influenciando a espermatogênese.

Figura 21 - LOH localizada na região 12q21.1-q21.2. *linhas amarelas indicam LOHs

7.1.5 CNVs associadas à falência espermato gênica primária já descritas na literatura.

Das regiões encontradas nos pacientes com falência espermato gênica primária, uma já foi descrita na literatura. Dong e colaboradores (2015) descreveram a região 11p11.12, apresentando tanto perda como ganho de CNV. Essa região foi detectada pela técnica de *array-CGH* em nossa amostra, porém tratava-se de uma LOH e com um tamanho muito superior às regiões já descritas, com cerca de setenta e oito genes (Figura 23).

Esta região foi a que continha mais genes diferencialmente expressos na análise de expressão de bancos de dados públicos, tanto em pacientes com teratozoospermia, quanto em pacientes com azoospermia não obstrutiva. Segundo o *Genecards*, oito deles são encontrados superexpressos em testículos: *CRY2*, *C11orf94*, *AMBRA1*, *HARBI1*, *ATG13*, *DDB2*, *AGBL2* e *FNBP4*. Entre esses, quatro estão entre os genes diferencialmente expressos na análise feita com dados de bancos de dados públicos, dois exclusivamente no estudo com pacientes com azoospermia não obstrutiva (*CRY2* $p = -0,2320$ e *HARBI1* $p = -0,3239$), um exclusivo em pacientes teratozoospermicos (*FNBP4* $p = -0,5970$) e um comum às duas análises (*AGBL2* $p = -1,2789$ (NOA) e $p = -1,6570$ (T)).

Entre esses genes, o gene *AGBL2* parece ter alguma influência no fenótipo de infertilidade masculina, por apresentar diferença de expressão nas duas análises realizadas e por se localizar em uma CNV já descrita na literatura. Portanto, é necessário análise direcionada a esse gene em maior número de pacientes inférteis, para esclarecer sua relação com o fenótipo.

7.2 Alterações genômicas distintas aos dois grupos de pacientes com falência espermato gênica primária (Oligozoospermia extrema + azoospermia não obstrutiva).

7.2.1 Genes da família DLX (Distal-Less Homeobox)

Nas regiões encontradas exclusivamente nos pacientes com oligozoospermia extrema, não encontramos nenhum gene relacionado à espermato gênese ou à infertilidade masculina. Porém, foi encontrada uma região que é uma CNV rara, a região 2q31.1 (Figura 24, *Genome Browser*). Ela é comum a ambos os grupos com

Figura 23 - LOH na região 11p11.12. *linhas amarelas indicam LOHs.

Figura 24 - CNV rara na região 2q31.3.

Figura 25 - Perda na região 2q31.1 englobando o gene *DLX2* em três pacientes com Oligozoospermia extrema. *linhas vermelhas indicam perdas.

Figura 26 - Perda na região 2q31.1 englobando o gene *DLX1* em dois pacientes com Azoospermia não obstrutiva. *linhas vermelhas indicam perdas.

oligozoospermia extrema e azoospermia não obstrutiva e abrange CNVs de perda, mas os genes presentes em cada grupo divergem. O *DLX2* encontrava-se ausente em pacientes com oligozoospermia extrema (Figura 25), enquanto o *DLX1* encontrava-se ausente em pacientes com azoospermia não obstrutiva (Figura 26).

A família de genes DLX em vertebrados consiste em fatores de transcrição de homeobox. Eles estão envolvidos na morfogênese craniofacial e na diferenciação e sobrevivência de neurônios inibitórios do prosencéfalo durante o desenvolvimento do cérebro (VIEUX-ROCHAS et al., 2007; VIEUX-ROCHAS et al., 2010).

Em um estudo de Givens e colaboradores, em 2005 foi sugerido que um membro dessa família estaria envolvido com a migração e desenvolvimento de neurônios que secretam gonadotrofinas (GnRH). Além disso, estudos com camundongos *knockout* para o gene *DLX2* resultaram em falha no desenvolvimento do prosencéfalo (HALL, 2015). Uma desregulação nessa via poderia estar causando hipogonadismo hipogonadotrófico e comprometendo a fertilidade.

7.3 Alterações genômicas individuais

7.3.1 Gene *PEG10* (*Paternally Expressed 10*)

O gene *PEG10* foi encontrado em dois pacientes de alterações individuais: uma CNV de ganho rara (Figura 27) na região 7q21.3 no paciente E6 (Figura 28); e uma CNV de perda na mesma região no paciente E1 (Figura 29). Trata-se de um gene imprintado paternalmente expresso derivado da família *ty3/Gypsy* de transposons. É expresso em tecidos adultos e embrionários (principalmente em placenta), e, além disso, tem papel na proliferação, diferenciação e apoptose celular. Ele já foi associado com carcinoma hepatocelular e leucemia (*Genecards*).

Apesar de ele não ter relação com a fertilidade ou espermatogênese, estudos com camundongos *knockout* para esse gene evidenciaram letalidade embrionária precoce, sugerindo que esse gene é importante para o desenvolvimento embrionário (ONO et al., 2006).

Figura 27 - CNV rara na região genômica 7q21.3.

Figura 28 - CNV de ganho localizada na região genômica 7q21.3 englobando o gene *PEG10* no paciente EO6. *linhas azuis indicam ganhos.

Figura 29 - CNV de perda localizada na região genômica 7q21.3 englobando o gene *PEG10* no paciente EO1.. *linhas vermelhas indicam perdas.

7.3.2 Gene *SHH* (*Sonic Hedgehog*)

Outras CNVs raras (Figura 30) encontradas nas alterações genômicas individuais foram as de ganho e perda nos indivíduos A1 (Figura 31) e E1 (Figura 32) respectivamente. Nessa região localiza-se o gene *SHH*.

O gene *SHH* é fundamental para o desenvolvimento inicial do embrião. Defeitos na sua proteína ou na via de sinalização causam holoprosencefalia (HPE), uma dismorfia oriunda de alteração no prosencéfalo em desenvolvimento, que não divide corretamente os hemisférios direito e esquerdo. Além disso, também está relacionado ao diagnóstico de associação VACTERL, que é caracterizada por defeitos vertebrais, fistula traqueo-esofágica, alterações cardíacas, renais e de membros (*Genecards*).

Em 2012 foi publicado um estudo em que foi constatado que a sinalização *hedgehog* é essencial para as células fetais de Leydig. Nele foi observado que a desregulação da via de sinalização *hedgehog* em camundongos comprometeu a espermatogênese, alterando a regulação das células de Leydig sobre as células germinativas (FRANCO & YAO, 2012).

7.4 Gene *TMEM184A* (*Heparin Receptor Transmembrane Protein 184A*)

O gene *TMEM184A* codifica uma proteína não caracterizada e existem poucos dados sobre sua função. Contudo alguns estudos mostram que ele provavelmente atua na diferenciação sexual de células germinativas, na expressão de células secretoras e no tráfico de membrana em Células de Sertoli (SLEE & LOWE-KRENTZ, 2013). As células de Sertoli são muito importantes para a espermatogênese, pois além de estruturar o túbulo seminífero, servem como fonte de nutrição e proteção para as células germinativas. Ademais, em um estudo com camundongos foi visto que esse gene é altamente expresso durante o desenvolvimento dos testículos e além disso sua expressão ocorre exclusivamente dentro das Células de Sertoli (SVINGEN et al, 2007).

O indivíduo E1 possui uma CNV de perda na região genômica 7p22.3 (Figura 33) onde se localiza o gene *TMEM184A*. Esse indivíduo pode estar apresentando o fenótipo de oligozoospermia extrema devido ao mau funcionamento das suas células de Sertoli, responsável pela falha da espermatogênese.

Figura 30 - CNV rara na região7q36.3.

Figura 31 - CNV de ganho localizada na região genômica 7q36.3 englobando o gene SHH no indivíduo NOA1. *linhas azuis indicam ganhos.

Figura 32 - CNV de perda localizada na região genômica 7q36.3 englobando o gene SHH no paciente EO1. *linhas vermelhas indicam perdas.

Figura 33 - CNV de perda localizada na região genômica 7p22.3 englobando o gene *TMEM184A* no indivíduo EO1. *linhas vermelhas indicam perdas.

CONCLUSÃO

8. Conclusões

Foram detectadas diferenças de número e de tamanho das alterações genômicas (CNVs e LOHs) entre os dois grupos da amostra e o grupo controle. A diferença do número de CNVs de perdas do grupo com oligozoospermia extrema foi significativamente maior do que no grupo controle.

O grupo de pacientes com oligozoospermia extrema foi o grupo que apresentou a maior quantidade de alterações genômicas estruturais.

A gravidade das alterações genômicas (CNVs e LOHs) foi inversamente proporcional à produção de espermatozoides. O grupo controle apresentou um intervalo de tamanho de alteração menor que de ambos grupos amostrais, variando de 332pb a 4.9Mb. O grupo de pacientes com oligozoospermia extrema apresentou um intervalo de tamanho de alteração intermediária, em que o tamanho variou de 332pb a 6.8Mb, e o intervalo de alterações de tamanho maior foi encontrado no grupo de pacientes com azoospermia não obstrutiva, com intervalo de 552pb a 11.3MB.

A análise descritiva detectou um gene candidato a fenótipo de falência espermatogênica primária na região 12q21.1-q21.2, o gene *GLIPR1L1*.

A análise individualizada permitiu a identificação de dois genes candidatos ao fenótipo de falência espermatogênica primária, o *SHH*, localizado na região 7q21.3, e o *TMEM184A*, localizado na região 7p22.3.

Perda genômica na região 15q11.2 foi detectada em 57% de pacientes com oligozoospermia extrema e em 43% de pacientes com azoospermia não obstrutiva. Novos estudos podem esclarecer a associação dessa região com o fenótipo de infertilidade.

Foram descritas oito novas regiões encontradas nos dois grupos de pacientes com falência espermatogênica primária: três CNVs de perda em 2q37.3, 8p11.22 e 15q11.2, uma CNV de ganho em 16p11.1-p11.2 e quatro LOHs em 1p31.1, 3q11.2-q12.1, 4p16.2-p16.3 e 12q21.1-q21.2.

REFERÊNCIAS

9. Referências

- ALDEMAN, C. A.; PETRINI, J. HJ. ZIP4H (TEX11) deficiency in the mouse impairs meiotic double strand break repair and the regulation of crossing over. **PLoS Genetics**, v. 4, n. 3, p. e1000042, 2008.
- AGARWAL, A. et al. A unique view on male infertility around the globe. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 13, n. 1, p. 37, 2015.
- AKSGLÆDE, L.; JUUL, A. Therapy of endocrine disease: Testicular function and fertility in men with Klinefelter syndrome: a review. **European Journal of Endocrinology**, v. 168, n. 4, p. R67-R76, 2013.
- AMARAL, A. et al. Identification of proteins involved in human sperm motility using high-throughput differential proteomics. **Journal of Proteome Research**, v. 13, n. 12, p. 5670-5684, 2014.
- ASERO, P. et al. Relevance of genetic investigation in male infertility. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 37, n. 5, p. 415-427, 2014.
- ASTON, K. I. Genetic susceptibility to male infertility: news from genome-wide association studies. **Andrology**, v. 2, n. 3, p. 315-321, 2014.
- AYHAN, Ö. et al. Truncating mutations in TAF4B and ZMYND15 causing recessive azoospermia. **Journal of Medical Genetics**, v. 51, n. 4, p. 239-244, 2014.
- BOLCUN-FILAS, E. et al. Mutation of the mouse Syce1 gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. **PLoS Genetics**, v. 5, n. 2, p. e1000393, 2009.
- BASHAMBOO, A.; MCELREAVEY, K. Mechanism of sex determination in humans: insights from disorders of sex development. **Sexual Development**, v. 10, n. 5-6, p. 313-325, 2016.
- BIENIEK, J. M.; LO, Kirk C. Recent advances in understanding & managing male infertility. **F1000Research**, v. 5, 2016.
- BISHT, S. et al. Oxidative stress and male infertility. **Nature Reviews Urology**, v. 14, n. 8, p. 470, 2017.
- BRACKE, A. et al. A search for molecular mechanisms underlying male idiopathic infertility. **Reproductive Biomedicine online**, 2017.
- HALL. B.K. "Epithelial–Mesenchymal Interactions Initiate Skeletogenesis". *Bones and Cartilage (Second Edition)* (2015): 299-316.

CABALLERO, J. et al. Bovine sperm raft membrane associated Glioma Pathogenesis-Related 1-like protein 1 (GliPr1L1) is modified during the epididymal transit and is potentially involved in sperm binding to the zona pellucida. **Journal of Cellular Physiology**, v. 227, n. 12, p. 3876-3886, 2012.

CALOGERO, A. E. et al. Klinefelter syndrome: cardiovascular abnormalities and metabolic disorders. **Journal of Endocrinological Investigation**, v. 40, n. 7, p. 705-712, 2017.

CARRELL, D. T. (Ed.). **The genetics of male infertility**. Springer Science & Business Media, 2007.

CHALMEL, F. et al. Global human tissue profiling and protein network analysis reveals distinct levels of transcriptional germline-specificity and identifies target genes for male infertility. **Human Reproduction**, v. 27, n. 11, p. 3233-3248, 2012.

CHO, C.. Testicular and epididymal ADAMs: expression and function during fertilization. **Nature Reviews Urology**, v. 9, n. 10, p. 550, 2012.

CHIANESE, C. et al. X chromosome-linked CNVs in male infertility: discovery of overall duplication load and recurrent, patient-specific gains with potential clinical relevance. **PLoS One**, v. 9, n. 6, p. e97746, 2014.

COOPER, T. G. et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. **Human Reproduction update**, v. 16, n. 3, p. 231-245, 2010.

COUTTON, C. et al. Teratozoospermia: spotlight on the main genetic actors in the human. **Human Reproduction update**, v. 21, n. 4, p. 455-485, 2015.

D'AMOURS, G. et al. SNP arrays: comparing diagnostic yields for four platforms in children with developmental delay. **BMC Medical Genomics**, v. 7, n. 1, p. 70, 2014.

DAM, A. HDM. et al. Homozygous mutation in SPATA16 is associated with male infertility in human globozoospermia. **The American Journal of Human Genetics**, v. 81, n. 4, p. 813-820, 2007.

DIETERICH, K. et al. Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploid spermatozoa and causes male infertility. **Nature Genetics**, v. 39, n. 5, p. 661, 2007.

DONG, Y. et al. Copy number variations in spermatogenic failure patients with chromosomal abnormalities and unexplained azoospermia. **Genetics and Molecular Research**, v. 14, n. 4, p. 16041-9, 2015.

ESTEVES, S. C. Novel concepts in male factor infertility: clinical and laboratory perspectives. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 33, n. 10, p. 1319-1335, 2016.

- FALENDER, A. E. et al. Maintenance of spermatogenesis requires TAF4b, a gonad-specific subunit of TFIID. **Genes & Development**, v. 19, n. 7, p. 794-803, 2005.
- FERLIN, A. et al. Male infertility: role of genetic background. **Reproductive Biomedicine Online**, v. 14, n. 6, p. 734-745, 2007.
- FEUK, L.; CARSON, A. R.; SCHERER, S. W. Structural variation in the human genome. **Nature Reviews Genetics**, v. 7, n. 2, p. 85, 2006.
- FLANNIGAN, R.; SCHLEGEL, P. N. Genetic diagnostics of male infertility in clinical practice. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, 2017.
- FLEGEL, C. et al. Expression profile of ectopic olfactory receptors determined by deep sequencing. **PloS One**, v. 8, n. 2, p. e55368, 2013.
- FLEGEL, C. et al. Characterization of the olfactory receptors expressed in human spermatozoa. **Frontiers in Molecular Biosciences**, v. 2, p. 73, 2016.
- FRANCO, H. L.; YAO, H. H.-C. Sex and hedgehog: roles of genes in the hedgehog signaling pathway in mammalian sexual differentiation. **Chromosome Research**, v. 20, n. 1, p. 247-258, 2012.
- GIBBS, G. M.; ROELANTS, Kim; O'BRYAN, M. K. The CAP superfamily: cysteine-rich secretory proteins, antigen 5, and pathogenesis-related 1 proteins—roles in reproduction, cancer, and immune defense. **Endocrine Reviews**, v. 29, n. 7, p. 865-897, 2008.
- GIVENS, M. L. et al. Developmental regulation of gonadotropin-releasing hormone gene expression by the MSX and DLX homeodomain protein families. **Journal of Biological Chemistry**, 2005.
- GNOTH, C. et al. Definition and prevalence of subfertility and infertility. **Human Reproduction**, v. 20, n. 5, p. 1144-1147, 2005.
- GOTO, M.; O'BRIEN, D. A.; EDDY, E. M. Speriolin is a novel human and mouse sperm centrosome protein. **Human Reproduction**, v. 25, n. 8, p. 1884-1894, 2010.
- GRANGEIRO, Carlos Henrique Paiva. **Avaliação genômica da infertilidade masculina idiopática por azoospermia não obstrutiva**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2018.
- GROTH, K. A. et al. Klinefelter syndrome—a clinical update. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 98, n. 1, p. 20-30, 2013.
- GRZESIUK, Juliana Dourado. **Investigação genômica de pacientes inférteis com oligozoospermia**. Tese de Doutorado. Universidade de São Paulo. 2016.

- HASHEMITABAR, M. et al. A proteomic analysis on human sperm tail: comparison between normozoospermia and asthenozoospermia. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, n. 6, p. 853-863, 2015.
- HARBUZ, R. et al. A recurrent deletion of DPY19L2 causes infertility in man by blocking sperm head elongation and acrosome formation. **The American Journal of Human Genetics**, v. 88, n. 3, p. 351-361, 2011.
- HAREL, T.; LUPSKI, J. R. Genomic disorders 20 years on—mechanisms for clinical manifestations. **Clinical Genetics**, v. 93, n. 3, p. 439-449, 2018.
- HOCHSTENBACH, R.; HACKSTEIN, J. HP. The comparative genetics of human spermatogenesis: clues from flies and other model organisms. In: **The Genetic Basis of Male Infertility**. Springer, Berlin, Heidelberg, 2000. p. 271-298.
- HOTALING, J.; CARRELL, D. T. Clinical genetic testing for male factor infertility: current applications and future directions. **Andrology**, v. 2, n. 3, p. 339-350, 2014.
- INHORN, M. C.; PATRIZIO, P. Infertility around the globe: new thinking on gender, reproductive technologies and global movements in the 21st century. **Human Reproduction update**, v. 21, n. 4, p. 411-426, 2015.
- JAIN, M. et al. Primary Testicular Failure. In: **Basics of Human Andrology**. Springer, Singapore, 2017. p. 417-436.
- JUNGWIRTH, A., et al. "Guidelines on Male Infertility. European Association of Urology: the 2014 update." (2015).
- KHERRAF, ZE. et al. SPINK2 deficiency causes infertility by inducing sperm defects in heterozygotes and azoospermia in homozygotes. **EMBO Molecular Medicine**, v. 9, n. 8, p. 1132-1149, 2017.
- KRAUSZ, C. et al. High resolution X chromosome-specific array-CGH detects new CNVs in infertile males. **PloS One**, v. 7, n. 10, p. e44887, 2012.
- KRAUSZ, C. et al. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. **Andrology**, v. 2, n. 1, p. 5-19, 2014.
- KRAUSZ, C.; CASAMONTI, E. Spermatogenic failure and the Y chromosome. **Human Genetics**, v. 136, n. 5, p. 637-655, 2017.
- KRAUSZ, C.; CIOPPI, F.; RIERA-ESCAMILLA, A. Testing for genetic contributions to infertility: potential clinical impact. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 18, n. 4, p. 331-346, 2018a.

- KRAUSZ, C.; RIERA-ESCAMILLA, A. Genetics of male infertility. **Nature Reviews Urology**, p. 1, 2018b.
- LEAVER, R. B. Male infertility: an overview of causes and treatment options. **British Journal of Nursing**, v. 25, n. 18, p. S35-S40, 2016.
- LI, Z. et al. Excess of rare variants in genes that are key epigenetic regulators of spermatogenesis in the patients with non-obstructive azoospermia. **Scientific Reports**, v. 5, p. 8785, 2015.
- LU, Y. et al. Human testicular protein NYD-SP16 is involved in sperm capacitation and the acrosome reaction. **Fertility and Sterility**, v. 86, n. 4, p. 1228-1234, 2006.
- MAOR-SAGIE, E. et al. Deleterious mutation in SYCE1 is associated with non-obstructive azoospermia. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, n. 6, p. 887-891, 2015.
- MARSHBURN, P. B. Counseling and diagnostic evaluation for the infertile couple. **Obstetrics Gynecology Clinics North America**, v. 42, n. 1, p. 1-14, 2015.
- MARTÍNEZ-HEREDIA, J. et al. Identification of proteomic differences in asthenozoospermic sperm samples. **Human Reproduction**, v. 23, n. 4, p. 783-791, 2008.
- MASSART, A. et al. Genetic causes of spermatogenic failure. **Asian Journal of Andrology**, v. 14, n. 1, p. 40, 2012.
- MCLACHLAN, R. I.; O'BRYAN, M. K. State of the art for genetic testing of infertile men. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 95, n. 3, p. 1013-1024, 2010.
- MIHARU, N. Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: oligozoospermia. **Cytogenetic and Genome Research**, v. 111, n. 3-4, p. 347-351, 2005.
- MITCHELL, M. J. et al. Single gene defects leading to sperm quantitative anomalies. **Clinical Genetics**, v. 91, n. 2, p. 208-216, 2017.
- MIYAMOTO, T. et al. Male infertility and its genetic causes. **Journal of Obstetrics and Gynaecology Research**, v. 41, n. 10, p. 1501-1505, 2015.
- NETO, F. T. L. et al. Genetics of male infertility. **Current Urology Reports**, v. 17, n. 10, p. 70, 2016.
- NIESCHLAG, S. M. A. **Andrology: Male Reproductive Health and Dysfunction**. Springer Science & Business Media, 2013.

- NISHIMURA, H.; MYLES, D. G.; PRIMAKOFF, P. Identification of an ADAM2-ADAM3 complex on the surface of mouse testicular germ cells and cauda epididymal sperm. **Journal of Biological Chemistry**, v. 282, n. 24, p. 17900-17907, 2007.
- OKUTMAN, O. et al. Exome sequencing reveals a nonsense mutation in TEX15 causing spermatogenic failure in a Turkish family. **Human Molecular Genetics**, v. 24, n. 19, p. 5581-5588, 2015.
- OLENDER, T.; LANCET, D.; NEBERT, D. W. Update on the olfactory receptor (OR) gene superfamily. **Human Genomics**, v. 3, n. 1, p. 87, 2008.
- ONO, R. et al. Deletion of Peg10, an imprinted gene acquired from a retrotransposon, causes early embryonic lethality. **Nature genetics**, v. 38, n. 1, p. 101, 2006.
- PARMENTIER, M. et al. Expression of members of the putative olfactory receptor gene family in mammalian germ cells. **Nature**, v. 355, n. 6359, p. 453, 1992.
- PLASESKI, T. et al. Association Study of Single-Nucleotide Polymorphisms in FASLG, JMJDIA, LOC203413, TEX15, BRDT, OR2W3, INSR, and TAS2R38 Genes With Male Infertility. **Journal of Andrology**, v. 33, n. 4, p. 675-683, 2012.
- PIERRE, V. et al. Absence of Dpy19l2, a new inner nuclear membrane protein, causes globozoospermia in mice by preventing the anchoring of the acrosome to the nucleus. **Development**, p. dev. 077982, 2012.
- PRACTICE COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE et al. Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. **Fertility and Sterility**, v. 103, n. 3, p. e18-e25, 2015.
- PRIMAKOFF, P.; MYLES, D. G. The ADAM gene family: surface proteins with adhesion and protease activity. **Trends in Genetics**, v. 16, n. 2, p. 83-87, 2000.
- PYLYP, L. Y. et al. Chromosomal abnormalities in patients with oligozoospermia and non-obstructive azoospermia. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 30, n. 5, p. 729-732, 2013.
- PUNAB, M. et al. Causes of male infertility: a 9-year prospective monocentre study on 1737 patients with reduced total sperm counts. **Human Reproduction**, v. 32, n. 1, p. 18-31, 2016.
- RAMOS, T. DP; AMORIM, L. MF. Molecular biology techniques for loss of heterozygosity detection: the glioma example. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 51, n. 3, p. 189-196, 2015.
- RATO, L. et al. Metabolic regulation is important for spermatogenesis. **Nature Reviews Urology**, v. 9, n. 6, p. 330, 2012.

RAY, P. F. et al. Genetic abnormalities leading to qualitative defects of sperm morphology or function. **Clinical Genetics**, v. 91, n. 2, p. 217-232, 2017.

REISS, K.; SAFTIG, P. The “a disintegrin and metalloprotease”(ADAM) family of sheddases: physiological and cellular functions. In: **Seminars in Cell & Developmental Biology**. Academic Press, 2009. p. 126-137.

RIGGS, E. R; LEDBETTER, David H.; MARTIN, Christa Lese. Genomic variation: lessons learned from whole-genome CNV analysis. **Current Genetic Medicine Reports**, v. 2, n. 3, p. 146-150, 2014.

RYLAND, G. L. et al. Loss of heterozygosity: what is it good for?. **BMC Medical Genomics**, v. 8, n. 1, p. 45, 2015.

SHAH, K. et al. The genetic basis of infertility. **Reproduction**, v. 126, n. 1, p. 13-25, 2003.

SHEN, S. et al. Comparative proteomic study between human normal motility sperm and idiopathic asthenozoospermia. **World Journal of Urology**, v. 31, n. 6, p. 1395-1401, 2013.

SLEE, J. B.; LOWE-KRENTZ, L. J. **Identification of TMEM184A in vascular endothelial and smooth muscle cells**. 2013.

SIASI, E.; ALEYASIN, A. Four Single Nucleotide Polymorphisms in INSR, SLC6A14, TAS2R38, and OR2W3 Genes in Association with Idiopathic Infertility in Persian Men. **The Journal of Reproductive Medicine**, v. 61, n. 3-4, p. 145-152, 2016.

SIVA, A. B. et al. Proteomics-based study on asthenozoospermia: differential expression of proteasome alpha complex. **Molecular Human Reproduction**, v. 16, n. 7, p. 452-462, 2010.

SMITH, R. P.; COWARD, R. M.; LIPSHULTZ, Larry I. The office visit. **Urologic Clinics**, v. 41, n. 1, p. 19-37, 2014.

SONG, SH. et al. Recent advances in the genetics of testicular failure. **Asian Journal of Andrology**, v. 18, n. 3, p. 350, 2016.

SOUTH, S. T. et al. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. **Genetics in Medicine**, v. 15, n. 11, p. 901, 2013.

STAHL, P. J.; SCHLEGEL, P. N. Genetic evaluation of the azoospermic or severely oligozoospermic male. **Current Opinion in Obstetrics and Gynecology**, v. 24, n. 4, p. 221-228, 2012.

- STOUFFS, K. et al. Array comparative genomic hybridization in male infertility. **Human Reproduction**, v. 27, n. 3, p. 921-929, 2012.
- STOUFFS, K. et al. Sertoli cell-only syndrome: Behind the genetic scenes. **BioMed Research International**, v. 2016, 2016.
- SUGANYA, J. et al. Chromosomal abnormalities in infertile men from southern India. **Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR**, v. 9, n. 7, p. GC05, 2015.
- SVINGEN, T. et al. Sex-specific expression of a novel gene Tmem184a during mouse testis differentiation. **Reproduction**, v. 133, n. 5, p. 983-989, 2007.
- TENENBAUM-RAKOVER, Y. et al. Minichromosome maintenance complex component 8 (MCM8) gene mutations result in primary gonadal failure. **Journal of Medical Genetics**, v. 52, n. 6, p. 391-399, 2015.
- THONNEAU, P. et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1 850 000) of three French regions (1988–1989). **Human Reproduction**, v. 6, n. 6, p. 811-816, 1991.
- TOKUHIRO, K. et al. Protein disulfide isomerase homolog PDILT is required for quality control of sperm membrane protein ADAM3 and male fertility. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 109, n. 10, p. 3850-3855, 2012.
- TURCHI, P. Prevalence, definition, and classification of infertility. In: **Clinical Management of Male Infertility**. Springer, Cham, 2015. p. 5-11.
- TÜTTELMANN, F.; RÖPKE, A. Genetics of male infertility. **Endocrinology of the Testis and Male Reproduction**, p. 1-21, 2017.
- VANDER BORGHT, M.; WYNS, C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. **Clinical Biochemistry**, p. [1, 2018.
- VETRO, A. et al. XX males SRY negative: a confirmed cause of infertility. **Journal of Medical Genetics**, p. jmedgenet-2011-100036, 2011.
- VIEUX-ROCHAS, M. et al. Molecular dynamics of retinoic acid-induced craniofacial malformations: implications for the origin of gnathostome jaws. **PLoS One**, v. 2, n. 6, p. e510, 2007.
- VIEUX-ROCHAS, M. et al. Irreversible effects of retinoic acid pulse on *Xenopus* jaw morphogenesis: new insight into cranial neural crest specification b. **Birth Defects Research Part B: Developmental and Reproductive Toxicology**, v. 89, n. 6, p. 493-503, 2010.

- VINEETH, V. S.; MALINI, Suttur S. A journey on Y chromosomal genes and male infertility. **International Journal of Human Genetics**, v. 11, n. 4, p. 203-215, 2011.
- VOG, P. H. et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. **Human Molecular Genetics**, v. 5, n. 7, p. 933-943, 1996.
- VORONA, E. et al. Clinical, endocrinological, and epigenetic features of the 46, XX male syndrome, compared with 47, XXY Klinefelter patients. **The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism**, v. 92, n. 9, p. 3458-3465, 2007.
- WANG, Y. et al. Identifying human genome-wide CNV, LOH and UPD by targeted sequencing of selected regions. **PloS One**, v. 10, n. 4, p. e0123081, 2015.
- WHITTEN, W. K. The effect of removal of the olfactory bulbs on the gonads of mice. **Journal of Endocrinology**, v. 14, n. 2, p. 160-163, 1956.
- WONG, KK. et al. Allelic imbalance analysis by high-density single-nucleotide polymorphic allele (SNP) array with whole genome amplified DNA. **Nucleic Acids Research**, v. 32, n. 9, p. e69-e69, 2004.
- WOSNITZER, M.; GOLDSTEIN, M.; HARDY, Matthew P. Review of azoospermia. **Spermatogenesis**, v. 4, n. 1, p. e28218, 2014.
- XIE, C. et al. Multicenter study of genetic abnormalities associated with severe oligospermia and non-obstructive azoospermia. **Journal of International Medical Research**, v. 46, n. 1, p. 107-114, 2018.
- YAN, W. et al. Haploinsufficiency of kelch-like protein homolog 10 causes infertility in male mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 20, p. 7793-7798, 2004.
- YAN, W. et al. Zmynd15 encodes a histone deacetylase-dependent transcriptional repressor essential for spermiogenesis and male fertility. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 41, p. 31418-31426, 2010.
- YANG, F. et al. Mouse TEX15 is essential for DNA double-strand break repair and chromosomal synapsis during male meiosis. **Journal of Cell Biology**, v. 180, n. 4, p. 673-679, 2008.
- YANG, F. et al. TEX11 is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse. **EMBO Molecular Medicine**, v. 7, n. 9, p. 1198-1210, 2015.
- YANG, X. et al. Association Study Between MTRR, TAF4B, PIWIL1 Variants and Non-Obstructive Azoospermia in Northeast Chinese Han Population. **Clinical Laboratory**, v. 64, n. 10, p. 1731-1738, 2018.

YAMAGUCHI, R. et al. Disruption of ADAM3 impairs the migration of sperm into oviduct in mouse. **Biology of Reproduction**, v. 81, n. 1, p. 142-146, 2009.

YATSENKO, A. N. et al. Non-invasive genetic diagnosis of male infertility using spermatozoal RNA: KLHL10 mutations in oligozoospermic patients impair homodimerization. **Human Molecular Genetics**, v. 15, n. 23, p. 3411-3419, 2006.

YUAN, L. et al. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. **Molecular Cell**, v. 5, n. 1, p. 73-83, 2000.

ZHANG, Y. et al. Association of single nucleotide polymorphisms in the USF1, GTF2A1L and OR2W3 genes with non-obstructive azoospermia in the Chinese population. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 32, n. 1, p. 95-101, 2015.

ZHAO, L. et al. Complexin I is required for mammalian sperm acrosomal exocytosis. **Developmental Biology**, v. 309, n. 2, p. 236-244, 2007.

ZEGERS-HOCHSCHILD, F. et al. The international committee for monitoring assisted reproductive technology (ICMART) and the world health organization (WHO) revised glossary on ART terminology, 2009. **Human Reproduction**, v. 24, n. 11, p. 2683-2687, 2009.

ZEGERS-HOCHSCHILD, F. et al. The international glossary on infertility and fertility care, 2017. 2017.

Referências de portais da internet

DGV: www.dgv.tcag.ca/dgv/app/home (último acesso em: 11/2018)

GeneCards: www.genecards.org/ (último acesso em 11/2018)

GeneOntology: <http://www.geneontology.org/> (último acesso em 11/2018)

GenomeBrowser: www.genome.ucsc.edu/ (último acesso em 11/2018)

GEODatasets: www.ncbi.nlm.nih.gov/gds (último acesso em 11/2018)

NCBI: www.ncbi.nlm.nih.gov/ (último acesso em 11/2018)

OMIM: www.omim.org (último acesso em 11/2018)

Pubmed: www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/ (último acesso em 11/2018)

ANEXOS

10. Anexos

10.1 Anexo 1: Comitê de ética em pesquisa.

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

Ribeirão Preto, 25 de setembro de 2013

Ofício nº 3537/2013
CEP/FC

Prezadas Senhoras,

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

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

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

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

Atenciosamente.

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

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

10.2 Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos convidando você a participar de um projeto de pesquisa do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – USP, intitulado “**Caracterização genômica de homem inférteis**”. O objetivo deste estudo é avaliar a constituição genética do paciente para buscar possíveis causas da infertilidade. Este projeto tem como pesquisadora responsável Juliana Dourado Grzesiuk.

Informamos que:

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

Se você concordar em participar da pesquisa, informamos que:

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

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

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

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

Ribeirão Preto, _____ de _____ de 20____.

Assinatura do paciente

Pesquisadores responsáveis:

Juliana Dourado Grzesiuk
(16) 36023081

Prof^a. Dr^a. Lúcia Regina Martelli
(16)36022598 CREMESP 40.569

Carlos Henrique Paiva Grangeiro
(16)36022598 CREMESP 147.428

APÊNDICE

11. Apêndice

11.1 Apêndice 1

Tabela 13 - Regiões já descritas na literatura relacionadas a infertilidade masculina.

Cromossomo	Região	Evento	Começo	Final	Genes
1	p13.2p1 3.2	Ganho	114 657 656	114 814 238	<i>SYT6</i>
1	p13.3p1 3.3	Perda	108 713 464	108 900 204	<i>SLC25A24/NBPF4</i>
1	p21	Perda	1040671 84	10432125 0	<i>RNPC3/AMY2B/AMY 2A/AMY1A/AMY1C/A MY1B</i>
1	p23.1	Ganho	1567645 62	15679673 6	<i>PRCC/SH2D2A/NTRK 1</i>
1	p34.3p3 4.3	Ganho	36 716 865	36 777 255	<i>THRAP3/C1orf113</i>
1	p33	Perda	4758000 1	47680000	<i>CYP4Z1/LINC00853/ PDZK1</i>
1	p36.21	Ganho	1530000 1	15480000	<i>KAZN/TMEM51</i>
2	p11.2	Perda	89,635,1 98	89,902,56 5	<i>Sem gene</i>
2	p15	Perda	6225829 0	62277149	<i>COMMD1</i>
2	p25.2p2 5.2	Ganho	3 062 188	3 325 509	<i>TSSC1</i>
2	p22.2p2 2.2	Perda	38 085 399	38 180 014	<i>FAM82A1</i>
2	q13	Perda	1108336 40	11098370 3	<i>MALL/NPHP1</i>
2	q36.1	Ganho	2222000 01	22302000 0	<i>EPHA4</i>
3	p11.1	Perda	8947671 9	89499633	<i>EPHA3</i>

Cromossomo	Região	Evento	Começo	Final	Genes
3	p14.1	Ganho	6578000 1	66340000	<i>MAGI1/SLAC25A26</i>
3	q24q24	Ganho	146 114 122	146 191 793	<i>PLSCR2</i>
4	p16.1	Ganho	8235974	8261720	<i>SH3TC1</i>
4	q13.2	Ganho	7018000 1	70440000	<i>UGT2B4</i>
4	q13.3	Perda	7501940 0	75117648 10	<i>MTHFD2L</i>
4	q21.1	Ganho	7650437 0	76521476	<i>CDKL2</i>
5	5p13.1	Perda	4077923 2	40785703	<i>PRKAA1</i>
5	5p14.3	Perda	2194346 6	22002677	<i>CDH12</i>
5	q11.1	Perda	4944000 1	49480000	<i>Sem gene</i>
5	q13.2q1 3.2	Ganho	69 705 562	70 657 747	<i>SERF1A/SERF1B/SM N1/SMN2/NAIP/GTF2 H2</i>
5	q13.2q1 3.2	Ganho	69 732 192	70 386 541	<i>SERF1A/SERF1B/SM N1/SMN2/NAIP/GTF2 H2</i>
5	q13.2q1 3.2	Perda	70 308 101	70 309 855	<i>NAIP</i>
5	q13.2q1 3.2	Perda	70 308 101	70 309 855	<i>NAIP</i>
5	q13.2q1 3.2	Ganho	70 308 101	70 309 855	<i>NAIP</i>
5	q23.1	Perda	1173800 01	11766000 0	<i>LINC02147</i>
5	q35.3	Perda	1804000 01	18044000 0	<i>BTNL3</i>
6	p12.1	Perda	5262402 7	52682610	<i>GSTA2/GSTA1</i>

Cromossomo	Região	Evento	Começo	Final	Genes
6	p21.31	Ganho	35143115	35184210	<i>ANKS1A</i>
6	p21.32	Ganho	32440001	32700000	<i>HLA-DRB1/HLA-DQA1/HLA-DQB1</i>
6	q26	Perda	162618199	162825032	<i>PARK2</i>
7	p21.3	Perda	12860001	13100000	<i>Sem gene</i>
7	p22.2	Ganho	3144476	3458017	<i>SDK1</i>
7	q11.22	Perda	66671745	66672634	<i>TYW1</i>
7	q31.1	Perda	112180001	112360000	<i>Sem gene</i>
7	q35	Perda	143884029	143953472	<i>FLJ43692/OR2A42/OR2A1</i>
8	p12	Ganho	31500001	32040000	<i>NRG1</i>
8	p22	Ganho	13720001	14040000	<i>SGCZ</i>
8	p22	Perda	15403439	15409232	<i>TUSC3</i>
8	q23.1	Ganho	6828426	6837339	<i>DEFA1</i>
8	q24.3	Dul/Del	145061948	145093349	<i>PLEC, MIR661</i>
10	q11.22	Ganho	46980001	47700000	<i>GPRIN2/NPY4R/ANXA8/FAM35DP/ANTXR1</i>
10	q21.1	Perda	59560001	59760000	<i>Sem gene</i>
10	q23.1	Perda	84138134	84171245	<i>NRG3</i>
10	q23.33	Perda	96497202	96536412	<i>CYP2C19</i>
11	p11.12	Perda	49240001	49980000	<i>LOC0440040/OR4C13</i>

Cromossomo	Região	Evento	Começo	Final	Genes
11	p11.12	Ganho	4880000 1	49380000	<i>TRIM49B/FOLH1</i>
11	q24.2	Ganho	1247435 38	12479802 9	<i>ROBO3/ROBO4/HEP N1/HEPACAM</i>
12	p11.21	Perda	3113251 6	31223665	<i>DDX11, OVOS2</i>
12	p12.2	Ganho	2101107 7	21404166	<i>SLCO1B3/LST- 3TM12/SLCO1B1</i>
12	q12	Perda	3858000 1	38740000	<i>ALG10B</i>
12	q13.3	Ganho	5586667 4	55896055	<i>LRP1, MIR1228</i>
12	q14.1	Perda	6068000 1	60940000	<i>Sem gene</i>
12	q14.2	Ganho	6394773 2	64116568	<i>DPY19L2</i>
12	q21.32	Perda	8669567 9	86703030	<i>MGAT4C</i>
12	q23.1	Perda	9849166 1	98519308	<i>ANKS1B</i>
12	q24.31q 24.31	Perda	1207346 05	120 755 841	<i>SIRT4</i>
13	q11	Perda	1944000 1	19500000	<i>ANKRD20A0P/LIC004 08</i>
13	q12.11	Ganho	2041933 3	20445320	<i>ZMYM5</i>
14	q11.2	Ganho	1946000 1	20420000	<i>POTEG/BMS1P18/PO TEM/OR11H2/OR4N2</i>
14	q11.2	Ganho	1946000 1	20280000	<i>POTEG/BMS1P18/PO TEM/OR11H2/OR4N2</i>
14	q11.2	Ganho	1946000 1	20440000	<i>POTEG/BMS1P18/PO TEM/OR11H2/OR4N2</i>
15	q11.1	Ganho	2018000 1	22380000	<i>CHEK2P2/HERC2P3/ GOLGA6L6/POTEB</i>

Cromossomo	Região	Evento	Começo	Final	Genes
15	q14	Perda	3467157 4	34841446	<i>GOLGA8A/GOLGA8B /DQ593032/DQ58293 9/K</i>
15	q15.3q1 5.3	Ganho	43 888 927	43 950 720	<i>CKMT1B/STRC/CATS PER2</i>
16	p12.2	Perda	2240000 1	22720000	<i>RRN3P3/SMG1P1/NP IPB5</i>
16	p12.2	Ganho	5583251 1	55865159	<i>CES1</i>
16	p13.11	Perda	1496885 5	15115579	<i>NOMO1/NPIP/PDXD C1</i>
16	q22.1	Ganho	6694264 8	66967713	<i>PRMT7, SMPD3</i>
16	q22.3q2 2.3	Perda	74 375 794	74 455 311	<i>CLEC18B</i>
17	p11.2p1 1.2	Ganho	21 370 330	21 453 044	<i>C17orf51</i>
17	p11.2p1 1.2	Perda	21 370 330	21 453 044	<i>C17orf51</i>
17	q12	Perda	3062458 0	30787596	<i>SLFN11, SLFN12, SLFN13</i>
18	q21.1	Perda	5221205 7	52306572	<i>C18orf26</i>
18	q21.31	Perda	5593122 9	55936547	<i>NEDD4L</i>
18	q23	Dup/Del	7574609 3	75779459	<i>KCNG2, PQLC1</i>
21	q22.3	Ganho	4470000 1	45240000	<i>LIC00322/SIK1/LINC0 0319/RRP1B</i>
22	q11.21	Ganho	1889483 5	19010508	<i>DGCR6/PRODH</i>
22	q13.33	Perda	5029685 5	50301369 2	<i>ALG12</i>

Cromossomo	Região	Evento	Começo	Final	Genes
X	p11.22	Ganho	5265768 9	52978139	SSX7, SSX2, SPANXN5, XAGE5, XAGE3, FAM156A, FAM156B
X	p11.22	Perda	52,065,7 98	52,069,94 3	Sem gene
X	p11.22	Ganho	5284208 0	52909890	SPANXN5, XAGE5, XAGE3
X	p11.23	Perda	47,766,3 91	47,847,51 6	ZNF630
X	p11.3	Ganho	44,067,5 90	44084085	EFHC2
X	p11.3	Ganho	47,766,3 91	47,847,51 6	ZNF630
X	p11.4	Ganho	3837628 3	38513841	TSPAN7
X	p21.1	Ganho	37,168,3 87	37,256,96 0	PRRG1
X	p21.1	Ganho	37,242,3 64	37,251,96 9	Sem gene
X	p21.3	Perda	25,274,0 24	25,280,71 2	Sem gene
X	p21.3	Perda	25,568,2 63	25583583	Sem gene
X	p21.3	Perda	26,891,7 69	26,959,10 1	Sem gene
X	p21.3	Ganho	2816219 0	28214748	Sem gene
X	p21.3	Ganho	27,277,5 29	27,337,93 3	Sem gene
X	p22.11	Perda	22,969,6 48	22,993,99 7	Sem gene
X	p22.2	Ganho	11,104,5 18	11,706,61 4	ARHGAP6 AMELX MSL3

Cromossomo	Região	Evento	Começo	Final	Genes
X	p22.2	Ganho	1668823 3	16707403	SYAP1
X	p22.31	Perda	6,594,83 4	6,626,533	Sem gene
X	p22.31	Perda	6,756,31 0	6,838,310	Sem gene
X	p22.31	Ganho	7,002,64 9	7,247,676	STS HDHD1A
X	p22.33	Ganho	1,544	226,372	PLCXD1 GTPBP6 PPP2R3B
X	p22.33	Ganho	302,644	462,740	Sem gene
X	p22.33	Ganho	1,347,59 9	1,387,328	CSF2RA
X	p22.33	Perda	2,711,07 3	2814530	XG, GYG2
X	q11.1	Ganho	6480600 0	64854709	MSN
X	q11.2	Ganho	6538550 1	65413711	HEPH
X	q21	Ganho	80,225,5 90	80,230,87 0	Sem gene
X	q22.1	Perda	101,803, 578	101,848,9 35	ARMCX5-GPRASP2
X	q22.1	Ganho	1021347 96	10249632 1	BEX1, NXF3, BEX4, TCEAL8, TCEAL5, BEX2, TCEAL7
X	q22.2	Ganho	1030661 01	10319018 7	TMSB15B, H2BFXP, H2BFWT, H2BFM
X	q22.3	Ganho	1102384 48	11026022 6	PAK3
X	q22.3- q23	Ganho	1102268 92	11096512 7	PAK3, CAPN6, DCX, ALG13, TRPC5
X	q23	Perda	1115984 47	11162153 1	Sem gene

Cromossomo	Região	Evento	Começo	Final	Genes
X	q24	Perda	118,281,024	118,325,874	<i>Sem gene</i>
X	q24	Ganho	118,780,844	118,798,128	<i>Sem gene</i>
X	q25	Ganho	122920543	123009115	<i>STAG2</i>
X	q25	Perda	123911267	124039708	<i>ODZ1</i>
X	q25	Perda	124,632,886	124,718,959	<i>Sem gene</i>
X	q25	Perda	124,929,673	125,117,699	<i>Sem gene</i>
X	q26.3	Ganho	134120502	134157976	<i>CXorf48</i>
X	q26.3	Ganho	134600709	134628136	<i>Sem gene</i>
X	q26.3	Ganho	134778328	134910134	<i>CT45-1/CT45-2/CT45-4/CT45-3</i>
X	q27.1	Ganho	139706586	139904507	<i>MIR320D2</i>
X	q27.2	Perda	140,773,893	140,778,561	<i>MAGEC3</i>
X	q27.3	Perda	145,030,566	145,037,917	<i>Sem gene</i>
X	q28	Perda	148,456,474	148,461,889	<i>Sem gene</i>
X	q28	Perda	154,044,877	154079019	<i>Sem gene</i>
X	q28	Perda	154,586,913	154,877,901	<i>SPRY3 VAMP7</i>
Y	p11.2	Ganho	7348864	7491480	<i>Sem gene</i>
Y	q11.223	Ganho	21964794	22058959	<i>RBMV2EP (AZFb/bc)</i>
Y	q11.23	Ganho	26870161	27073218	<i>Sem gene</i>