

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

Juliana Dourado Grzesiuk

**INVESTIGAÇÃO GENÔMICA DE PACIENTES INFÉRTEIS COM
OLIGOZOOSPERMIA**

RIBEIRÃO PRETO - SP

2016

JULIANA DOURADO GRZESIUK

**INVESTIGAÇÃO GENÔMICA DE PACIENTES INFÉRTEIS COM
OLIGOZOOSPERMIA**

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

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Regina Martelli

RIBEIRÃO PRETO - SP

2016

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

Grzesiuk, Juliana Dourado

Investigação genômica de pacientes inférteis com oligozoospermia.

Ribeirão Preto, São Paulo, 2016.

110p.: il.; 30cm

Tese de doutorado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto / USP – Área da concentração: Genética.

Orientadora: Martelli, Lúcia.

1. Infertilidade masculina;
2. *array*-CGH;
3. CNV;
4. LOH;
5. Cromossomo Y;
6. microRNA.

FOLHA DE APROVAÇÃO

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

Data da defesa: ____/____/____

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico este trabalho aos meus pais **Francisco** e **Alice**
e irmãos **Mariana** e **João Victor**.

“Sou uma mulher de sorte por contar com as duas mãos das pessoas que eu amo”
(Just breathe – Pearl Jam)

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dra. Lucia Regina Martelli pela orientação, pelo aprendizado, pelo carinho e por ter encarado comigo mais esse desafio. Ao Prof. Dr. Jeremy Squire pela sua grande contribuição nas discussões científicas do nosso grupo de pesquisa.

Ao médico e parceiro neste trabalho Dr. Carlos Grangeiro, por realizar os atendimentos clínicos e coleta de dados dos pacientes no Ambulatório de Genética Médica do HCFMRP-USP. À enfermeira Fátima Carvalho, pela realização das coletas de sangue. Ao Dr. Carlos Molina, Aline Bomfim e a toda a equipe do ambulatório de Urologia assim como do ambulatório de Ginecologia e Obstetrícia pelo auxílio no recrutamento dos pacientes e indivíduos controle.

Ao técnico Silvio Avelino dos Santos pela amizade e auxílio no dia-a-dia do laboratório, pela disposição e cooperação. Aos colegas Alexandra Galvão, Tatiana Mozer, Clarissa Picanço, Victoria Cortez, Lívia Ferreira e Heloise Luchiari pela troca de experiências e pela amizade. Em especial às colegas Flávia Gaona e Amanda Riccardi pelo auxílio com a técnica de Array-CGH, ao professor Dr. Geraldo Passos pela disponibilidade do laboratório e equipamentos e ao colega Thiago Vidotto pelo auxílio com a análise dos resultados.

Aos técnicos Lucimar Laureano e Rinaldo Scarparo, pelo auxílio na realização dos cariótipos dos pacientes no laboratório de Citogenética do HCFMRP-USP. À Dra. Juliana Meola, Dr. Jair Huber e novamente Dr. Carlos Molina pela discussão e sugestões durante a banca de qualificação.

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

À agência de fomento à pesquisa CAPES pela bolsa concedida, à FAEPA e SUS pelo auxílio.

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

Aos meus amigos próximos e distantes. Especialmente à Priscila Palma, Ana Carolina Arruda, Hudson Trajano, Mayara Scur, Vinícius Martins, Paulo Meirelles e Larissa Zinezi. Obrigada por todo o apoio e amizade.

Aos meus amigos de quatro patas, os cavalos, que me ensinaram muito e me trouxeram muitas felicidades. Ao meu instrutor de hipismo José Augusto de Paula e todos os amigos do centro hípico Guega.

Aos meus irmãos queridos Mariana e João Victor. Muito obrigada Mariana, minha jornalista preferida, que me auxilia na revisão de todos os meus textos. Aos meus pais, meus guias, Alice e Francisco, por todo carinho, amor e paciência. Por todos os ensinamentos, investimentos e incentivos para que eu realize todos os meus sonhos.

Por fim à Deus e guias espirituais, por tantas oportunidades de aprendizado, por me inspirar e me amparar em todos os momentos.

RESUMO

GRZESIUK, J.D.. **Investigação genômica de pacientes inférteis com oligozoospermia**. 2016, Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

A infertilidade afeta aproximadamente 15% dos casais, sendo atualmente reconhecido o envolvimento de fatores masculinos em metade dos casos. Alterações nas análises seminais são detectadas na maioria dos homens inférteis e a mais frequente é a baixa concentração de espermatozoides no ejaculado, conhecida como oligozoospermia. Vários estudos mostram uma forte relação entre fatores genéticos e a infertilidade, incluindo alterações cromossômicas e microdeleções do cromossomo Y, porém as causas da oligozoospermia ainda permanecem obscuras. O desenvolvimento de novas tecnologias de investigação vem possibilitando a detecção de alterações a nível genômico, como mutações e variações no número de cópias (CNVs). O presente trabalho teve por objetivo a caracterização genômica de homens com oligozoospermia sem causa definida, visando estabelecer correlação entre alterações no número de cópias e perdas de heterozigidade (LOHs) e o fenótipo de infertilidade. Foram selecionados 18 pacientes após rigorosa avaliação clínica e investigação do histórico reprodutivo, sendo excluídos pacientes portadores de alterações cromossômicas e portadores de microdeleções do cromossomo Y. Seis homens comprovadamente férteis foram selecionados para o grupo controle. A investigação genômica de ambos os grupos, amostral e controle, foi realizada pela técnica de hibridação genômica comparativa em microarranjos (*aCGH*) utilizando a plataforma de resolução 180K (Agilent®,US), analisada pelo *software* Nexus 8.0. Foram detectadas alterações possivelmente patogênicas no cromossomo Y, no cromossomo X e em autossomos. Um ganho na região de AZFc envolvendo apenas os genes *DAZ1* e *DAZ4* foi detectado em nove pacientes e em quatro controles, sendo classificado como alteração benigna. Porém, alterações na região de AZFc possivelmente relacionadas ao fenótipo de oligozoospermia foram detectadas em três pacientes e incluíram extensas duplicações e deleções envolvendo, entre outros genes, as quatro cópias do gene *DAZ*. Após comparação de regiões selecionadas com a literatura e com diferentes bancos de dados genéticos, sugerimos que os genes *PLEC*, *SPATC1*, *COL1A1*, *MOV10L1*, *SYCE3* e *ODF3B* possam estar associados a alterações na produção espermática. Adicionalmente, entre os doze miRNAs presentes em regiões de LOH possivelmente relacionadas ao fenótipo de infertilidade, dez têm como alvo genes com funções relacionadas à espermatogênese e reprodução humana. Estudos adicionais a nível de expressão e sequenciamento gênico são necessários para confirmar a correlação entre o genótipo e o fenótipo de oligozoospermia.

PALAVRAS-CHAVE: infertilidade masculina; *array*-CGH, CNV, LOH, cromossomo Y, oligozoospermia, micro RNA.

ABSTRACT

GRZESIUK, J.D.. **Genomic investigation of infertile patients with oligozoospermia.** 2016, Thesis (PhD) Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

Infertility affects about 15% of the couples, and it is currently recognized, that male factors are involved in about 50% of cases. Changes in seminal parameters are detected in most infertile men and the most common alteration, known as oligozoospermia, is a low concentration of sperm in the ejaculate. Several studies show a strong relationship between genetic factors and infertility, including chromosomal abnormalities and microdeletions of Y chromosome, however, the causes of oligozoospermia remain unclear. The development of new research technologies has allowed the detection of changes at genomic levels, such as mutations and copy number variations (CNVs). This study aimed to perform a genomic characterization of patients with idiopathic oligozoospermia to determine whether there is a correlation between changes of copy number and losses of heterozygosity (LOHs) in relation to the phenotype of infertility. Eighteen patients were selected for the cases after rigorous clinical examination and investigation of their reproductive history. Patients with chromosomal abnormalities or microdeletions of the Y chromosome were excluded. Six proven fertile men comprised the control group. Genomic investigation of both groups was performed by microarray comparative genomic hybridization (aCGH) using 4X180K platform (Agilent, US) analysed by Nexus 8.0 software. Potential pathogenic changes were detected on Y chromosome, as well as on the X and autosome chromosomes. A gain in AZFc region involving only *DAZ1* and *DAZ4* genes was detected in nine patients and four controls, and was considered as benign. However, changes in AZFc region, that could be related to the oligozoospermia phenotype were detected in three patients. These changes included extensive duplications and deletions involving the four copies of the *DAZ* gene together with copy number changes affecting other genes. After comparing the selected regions with the literature and with different databases, we suggest that changes such as LOH affecting *PLEC*, *SPATC1*, *COL1A1*, *MOV10L1*, *SYCE3* and *ODF3B* genes may influence sperm production. Our analysis indicates that, ten out of the twelve miRNAs present in LOH regions could be involved in the infertility phenotype and could have target genes with functions related to spermatogenesis and human reproduction. Additional studies involving gene sequencing and expression analysis are needed to confirm the correlation between the genotype and oligozoospermia phenotype.

KEY WORDS: male infertility, *array*-CGH, CNV, LOH, Y chromosome, oligozoospermia, micro RNA.

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Frequência de deleções da região AZF entre homens inférteis ao redor do mundo	19
Figura 2- Microdeleções do cromossomo Y	20
Figura 3- Investigações genéticas da infertilidade masculina por cariótipo e detecção de microdeleções do cromossomo Y em casos de falhas da espermatogênese idiopáticas	21
Figura 4- Exemplos de ambas as reações A e B de PCR multiplex para microdeleções do cromossomo Y	38
Figura 5- Cariótipo masculino normal 46,XY do paciente 14.....	44
Figura 6- Cariótipo masculino 46,XY,16qh+ de um dos pacientes excluídos do grupo amostral.....	45
Figura 7- Gel de agarose da técnica de análise de microdeleções do cromossomo Y nos pacientes 5 e 19	46
Figura 8- Gráfico mostrando o número de alterações encontradas no grupo controle, no grupo amostral total e nos grupos dos diferentes graus de oligozoospermia.....	49
Figura 9- Visão geral das alterações em todo o genoma de todos os pacientes e indivíduos controles.....	51
Figura 10- Resultado da técnica de <i>array</i> -CGH mostrando a LOH detectada na região 11p12	53
Figura 11- Resultado da técnica de <i>array</i> -CGH mostrando a LOH detectada na região 8q24.3	54
Figura 12- Resultado da técnica de <i>array</i> -CGH mostrando o ganho detectado na região 17q21.33	66
Figura 13- Resultado da técnica de <i>array</i> -CGH mostrando a LOH detectada na região 22q13.32-13.33	67
Figura 14- Resultado da técnica de <i>array</i> -CGH mostrando as CNVs detectadas no cromossomo Y entre os pacientes e indivíduos controle	70
Figura 15- Deleções detectadas no cromossomo Y do paciente 5G pela técnica de <i>array</i> -CGH.....	71
Figura 16- Representação esquemática da localização celular da esperiolina no espermatozoide humano	80
Figura 17- Representação esquemática do complexo sinaptonêmico	83

ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1- <i>Locus</i> e sequencias dos <i>primers</i> utilizados na técnica de PCR para análise de microdeleções do cromossomo Y	37
Tabela 2- Caracterização amostral relacionando idade, parâmetros do espermograma e classificação diagnóstica dos indivíduos do grupo controle (C1 a C6) e dos pacientes com oligozoospermia (1 a 18)	47
Tabela 3- Número de alterações no número de cópias (ganhos e perdas) e LOHs detectadas nos controles e pacientes através da técnica de <i>array</i> -CGH após análise preliminar dos dados	48
Tabela 4- Média do número de alterações no número de cópias (ganhos e perdas) e LOHs detectadas no grupo controle, no grupo amostral total e nos grupos estratificados segundo o grau de oligozoospermia	49
Tabela 5- Caracterização das regiões 11p12 e 8q24.3 onde foram detectadas LOH, após análise comparativa entre o grupo de pacientes com oligozoospermia e o grupo controle	55
Tabela 6- Caracterização das regiões onde foram detectadas CNVs e LOH, após análise preditiva entre o grupo de pacientes com oligozoospermia e o grupo controle	57
Tabela 7- CNVs descritas na literatura como potencialmente relacionadas à alterações na concentração espermática	59 e 60
Tabela 8- Caracterização das regiões onde foram detectadas CNVs e LOH detectadas em pacientes com oligozoospermia e em controles, que se sobrepõem a regiões citadas na literatura	62
Tabela 9- Caracterização das regiões de CNVs e LOH detectadas após análise individualizada de cada alteração presente entre o grupo de pacientes com oligozoospermia e o grupo controle	64 e 65
Tabela 10- Caracterização das alterações no cromossomo Y detectadas em pacientes com oligozoospermia e em indivíduos controle	69
Tabela 11- Relação dos miRNAs encontrados em 5 regiões de LOH detectadas nos pacientes	72
Tabela 12- Resultados da pesquisa de vias relacionadas aos 12 miRNAs detectados em LOHs nos pacientes com oligozoospermia pela ferramenta DIANA-miRPath v3.0	73
Tabela 13- Relação de genes regulados pelos miRNAs relacionados à espermatogênese de acordo com o sistema de classificação de genes PANTHER	74

LISTA DE ABREVIATURAS

Array-CGH ou aCGH	Hibridação genômica comparativa por microarranjos, do inglês <i>Array Comparative Genomic Hybridization</i>
AZF	Fator de azoospermia, do inglês <i>Azoospermia Factor</i>
BAC	Cromossomo artificial bacteriano, do inglês <i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BSA	Albumina Sérica Bovina, do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
CNV	Variações no número de cópias, do inglês <i>Copy Number Variation</i>
DECIPHER	Banco de dados de desequilíbrios cromossômicos e fenótipos em humanos utilizando recursos Ensemble, do inglês <i>Database of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources</i>
DGV	Banco de dados de variantes genômicas, do inglês <i>Database of Genomic Variants</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico, do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxirribonucleotídeos Trifosfatados
EAA	Academia Europeia de Andrologia, do inglês <i>European Academy of Andrology</i>
EMQN	Rede Europeia de Qualidade na Genética Molecular, do inglês <i>European Molecular Genetics Quality Network</i>
ECARUCA	Registro de Aberrações Cromossômicas Desequilibradas da Associação Europeia de Citogeneticistas, do inglês <i>European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations</i>
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético, do inglês <i>Ethylenediamine tetraacetic acid</i>
FASST2	<i>Fast Adaptive States Segmentation Technique</i>
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
GTG	Bandeamento G combinado com Tripsina e Giemsa
HCFMRP-USP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

ISCA	Padrão Internacional para Arrays Citogenômicos, do inglês <i>International Standards for Cytogenomic Arrays</i>
lncRNAs	RNAs longos não codificadores, do inglês <i>Long Noncoding RNAs</i>
LOH	Perdas de heterozigosidade, do inglês <i>Loss Of Heterozygosity</i>
miRNA	MicroRNAs
NAHR	Recombinação homóloga não alélica, do inglês <i>Non-Allele Homologous Recombination</i>
OE	Oligozoospermia Extrema
OG	Oligozoospermia Grave
OM	Oligozoospermia Moderada
OMIM	Herança Mendeliana Humana Online, do inglês <i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
OT	Oligozoospermia, amostra total
OTA	Oligoteratoastenozoospermia
PCR	Reação em cadeia da polimerase, do inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i>
PGD	Diagnóstico genético pré-implantacional, do inglês, <i>Preimplantation Genetic Diagnosis</i>
piRNA	RNA que interage com Piwi, do inglês <i>Piwi-interacting RNA</i>
RNA	Ácido ribonucleico, do inglês <i>Ribonucleic Acid</i>
RPM	Rotações por minuto
SCOS	Aplasia das células germinativas, do inglês <i>Sertoli Cell-Only Syndrome</i>
SNP	Polimorfismo de nucleotídeo único, do inglês <i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TE	Tampão Tris-EDTA
TESE	Extração de espermatozoides testiculares, do inglês, <i>Testicular Sperm Extraction</i>

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	15
1.1 INFERTILIDADE MASCULINA	15
1.2 ETIOLOGIA GENÉTICA DA INFERTILIDADE MASCULINA.....	17
1.3 METODOLOGIA DE INVESTIGAÇÃO GENÔMICA EM INFERTILIDADE MASCULINA.....	22
1.4 CORRELAÇÃO ENTRE GENÓTIPO E FENÓTIPO DE INFERTILIDADE MASCULINA.....	25
2 JUSTIFICATIVA e HIPÓTESE	30
3 OBJETIVOS	32
3.1 OBJETIVO GERAL	32
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	34
4.1 MATERIAL.....	34
4.1.1 Casuística	34
4.1.2 Amostra.....	35
4.2 MÉTODOS.....	35
4.2.1 Citogenética Clássica	35
4.2.2 Genética Molecular	36
4.2.3 Investigação Citogenômica.....	38
5 RESULTADOS	44
5.1 ANÁLISE QUANTITATIVA.....	47
5.2 ANÁLISE COMPARATIVA.....	52
5.3 ANÁLISE DE PODER PREDITIVO.....	56
5.4 ANÁLISE COMPARATIVA À LITERATURA	58
5.5 ANÁLISE INDIVIDUALIZADA DE CADA ALTERAÇÃO.....	63
5.6 ANÁLISE DO CROMOSSOMO Y.....	68
5.7 ANÁLISE DE miRNAs.....	72
6 DISCUSSÃO	76
7 CONCLUSÕES	87
BIBLIOGRAFIA	89
APÊNDICE A	101
ANEXO 1	109
ANEXO 2	110

Introdução

1 INTRODUÇÃO

1.1 INFERTILIDADE MASCULINA

A infertilidade afeta aproximadamente 15% dos casais e é definida clinicamente como a incapacidade de conceber um filho após um ou mais anos de relações sexuais regulares sem o uso de métodos contraceptivos (ZEGERS-HOCHSCHILD et al., 2009). Ela tem sido relacionada a vários fatores como idade avançada, obesidade, doenças infecciosas, alterações imunológicas, hormonais, psicológicas, físicas ou alterações nos gametas (SHAN et al., 2003).

Fatores masculinos são exclusivamente responsáveis por 20% dos casos de infertilidade conjugal e contribuem em outros 30 à 40%. Alterações nas análises seminais são detectadas na maioria dos casos e elas podem ocorrer por diversos fatores. Alguns fatores são reversíveis, como a obstrução do ducto deferente e o hipogonadismo hipogonadotrófico. Outras condições são irreversíveis, como atrofia testicular bilateral resultante de uma orquite viral (JAROW et al.; 2010).

A análise seminal é uma importante ferramenta para a investigação da infertilidade masculina. O espermograma permite avaliar a função testicular (produção e qualidade espermática), o funcionamento adequado das glândulas acessórias do trato genital e a capacidade ejaculatória. Pelo menos duas amostras devem ser analisadas com um intervalo de coleta de 3 a 4 semanas, pois é comum a detecção de uma variação intraindividual substancial da qualidade espermática (CENTOLA, 2014). A Organização Mundial da Saúde (OMS) realizou, em 2010, um estudo do sêmen de mais de 1900 homens férteis de oito países. Os valores encontrados foram utilizados para estabelecer o percentil 5 (p5) como valor de referência limite para cada parâmetro com um intervalo de confiança de 95%:

- Volume: 1.5 mL.
- Concentração espermática: 15 milhões de espermatozoides/mL.
- Número total de espermatozoides: 39 milhões de espermatozoides por ejaculado.
- Motilidade total (progressiva + não progressiva): 40%.
- Motilidade progressiva: 32%.
- Morfologia: 4% dos espermatozoides com forma normal.
- Vitalidade: 58% de espermatozoides vivos (COOPER et al., 2010).

As alterações espermáticas mais comuns são a azoospermia, na qual é detectada a ausência de espermatozoides no sêmen ejaculado e a oligozoospermia, na qual a concentração de espermatozoides detectada é abaixo de 15 milhões/ml (KUMAR, SINGH, 2015). Para fins de tratamento, a oligozoospermia, muitas vezes, é subdividida de acordo com sua gravidade. Não existe um consenso na literatura sobre os valores considerados, porém, o mais comum, é classificar como oligozoospermia grave os casos em que a concentração espermática do paciente é abaixo de 5,0 milhões/ml (MCLACHLAN, O'BRYAN, 2010; JAROW et al., 2010; STAHL, SCHLEGEL, 2012; MASSART et al., 2012; MCLACHLAN, 2013; MIYAMOTO et al., 2015; MARSHBURSN, 2015; SONG et al., 2016). Alguns trabalhos utilizam, além do termo oligozoospermia grave, o termo oligozoospermia extrema, em casos onde a concentração espermática é abaixo de 1,0 milhão/ml (STEGEN et al., 2012).

São comuns também as alterações espermáticas relacionadas à motilidade e à morfologia dos espermatozoides. Chamamos de astenozoospermia quando a motilidade progressiva espermática está abaixo da referência limite e de teratozoospermia quando os espermatozoides com morfologia normal estão abaixo do esperado. Pacientes com oligozoospermia muitas vezes apresentam concomitantemente astenozoospermia e/ou teratozoospermia. Chamamos de oligoteratoastenozoospermia (OTA) quando as três alterações são detectadas no mesmo paciente (MIHARU, 2005).

Ao longo dos anos tem-se observado uma diminuição significativa na média da concentração de espermatozoides no ejaculado de homens em todo o mundo. Carlsen e colaboradores (1992) realizaram uma análise da literatura e observaram uma diminuição de 113 para 66 milhões/ml entre homens sem histórico de infertilidade entre os anos de 1938 a 1991. Vários outros trabalhos descreveram declínio similar em vários países, gerando um grande debate (revisado por MERZENICH et al.; 2010). Borges e colaboradores (2015) observaram na população brasileira sub fértil uma diminuição alarmante entre os anos 2000 a 2012, sendo que a concentração média observada caiu de 61,7 para 26,7 milhões/ml. A incidência de oligozoospermia grave aumentou de 15,7% para 30,3%, e de azoospermia de 4,9% para 8,5%.

Ao serem detectadas alterações no espermograma é essencial correlacionar os resultados com o histórico clínico do paciente. As informações reprodutivas do casal são as primeiras a serem levadas em consideração, uma vez que a oligozoospermia em si não é considerada diagnóstico de infertilidade. De acordo com

Mclachlan (2013), 5% dos homens férteis apresentam oligozoospermia e 30% dos casais com densidade espermática entre 1 a 5 milhões/ml alcançam concepção natural após 2 a 3 anos de relações sexuais sem uso de preservativos. O prosseguimento da investigação do histórico clínico deve focar o trato reprodutivo (puberdade, infecções genitais, caxumba, lesões ou cirurgias anteriores, sintomas de deficiência androgênica) e a saúde geral (doenças sistêmicas agudas ou crônicas, câncer, exposição a produtos químicos, metais pesados, altas temperaturas, uso de drogas recreativas, de medicamentos e estilo de vida).

Além de uma avaliação física geral, o grau de virilidade e alterações escrotais devem ser analisadas. Exames de orquidometria ou ultra-som podem detectar volume testicular diminuído (abaixo de 15 ml). O vaso deferente e epidídimos devem também ser avaliados por palpação (MCLACHLAN, 2013). A dilatação e alongação anormal das veias espermáticas é conhecida como varicocele e é considerada como a causa reversível mais comum de infertilidade masculina. Apesar de afetar 15% da população adulta masculina americana e em 80% não causar alteração de fertilidade, aproximadamente 25% dos homens com alteração do padrão espermático tem varicocele (LACERDA et al., 2011).

1.2 ETIOLOGIA GENÉTICA DA INFERTILIDADE MASCULINA

Além das causas físicas, hormonais e ambientais conhecidas, uma série de alterações genéticas já são bem estabelecidas como fatores de infertilidade. A espermatogênese é um processo complexo que envolve processos de diferenciação celular, meiose e diversas alterações morfológicas das células germinativas primordiais até os espermatozoides maduros. Interações entre as células somáticas e germinativas, assim como estímulos hormonais, são necessários para a correta progressão da produção espermática. Todos estes mecanismos são regidos por fatores genéticos essenciais, com envolvimento de genes mapeados tanto em cromossomos sexuais como em cromossomos autossômicos (SINGH; JAISWAL, 2011). Schultz e colaboradores (2003) realizaram uma análise da transcrição em células germinativas, a qual indicou que a expressão correta de aproximadamente 2.000 genes (correspondente a 7% do genoma humano) pode ser essencial para a fertilidade masculina completa.

Alterações genéticas responsáveis pela infertilidade masculina podem envolver desde aneuploidias de cromossomos inteiros até alterações em um único gene (MASSART et al., 2012). A síndrome de Klinefelter é a alteração cromossômica mais frequente entre homens inférteis, com uma incidência entre 30 a 100 vezes maior do que na população geral (ZUFFARDI, TIEPOLO, 1982; DE BRAEKELEER, DAO, 1991). Ela é diagnosticada em aproximadamente 5% dos homens com oligozoospermia grave e 10% dos homens com azoospermia não obstrutiva. O cariótipo 47,XXY é detectado em 8% dos casos enquanto os demais apresentam padrões de mosaicismo como 46,XY/47,XXY, 48,XXXXY ou 48,XXYY. Apesar da inativação do cromossomo X extra, aproximadamente 15% dos genes continuam ativos no cromossomo silenciado, resultando em um desequilíbrio gênico que prejudica a produção de andrógenos e a espermatogênese (NETO et al.; 2016).

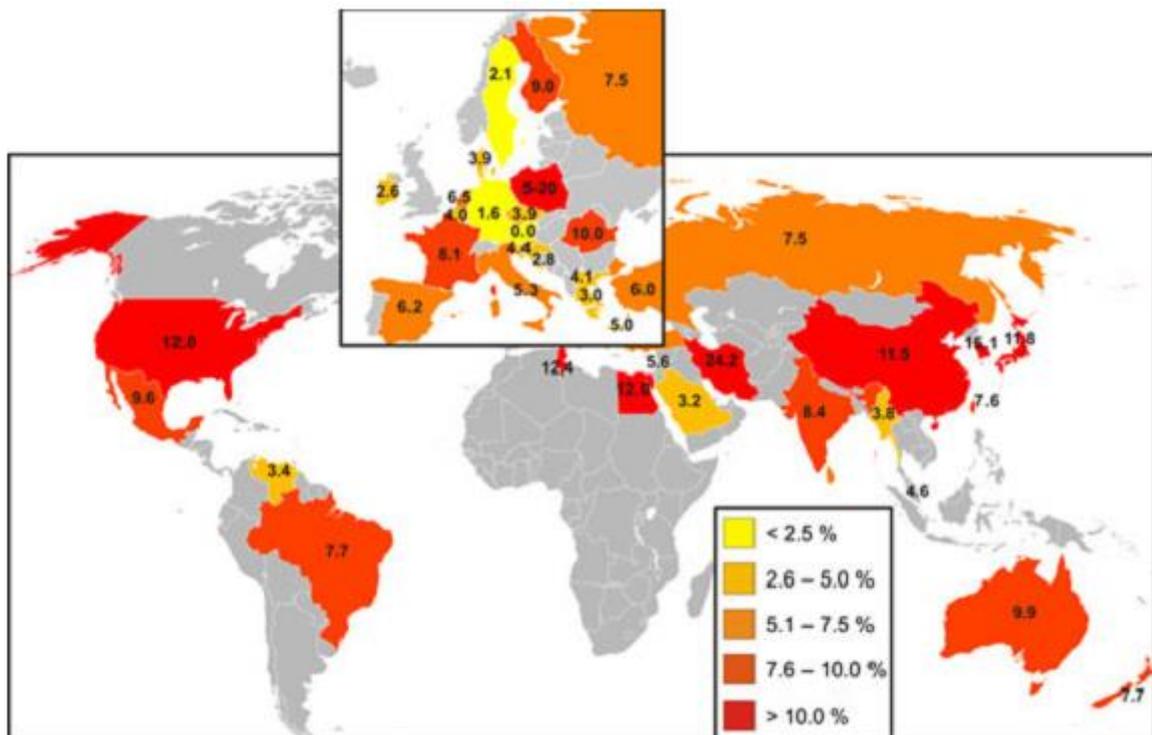
Alterações cromossômicas estruturais, como translocações e inversões, também são frequentemente associadas a alterações na fertilidade masculina. A literatura relata uma incidência de 4,6% de translocações autossômicas e inversões entre homens com oligozoospermia (MCLACHLAN, O'BRYAN, 2010). Dependendo do(s) cromossomo(s) envolvido(s), dos pontos de quebra e do tamanho do(s) fragmento(s), o mecanismo e o tempo consumido para o pareamento entre o(s) cromossomo(s) alterado(s) e normal(normais) podem impedir o processo meiótico, além de tornar a disjunção propensa à produção de gametas não equilibrados (OLIVER-BONET et al.; 2005). Alterações cromossômicas estruturais também podem causar infertilidade masculina ao gerar perdas de material genético, por efeito de posição ou pela disrupção de genes essenciais para a espermatogênese, localizados próximos aos pontos de quebra cromossômica (SONG et al.; 2016).

A literatura não é totalmente concordante em relação aos heteromorfismos, porém vários trabalhos descreveram evidências de que eles são mais frequentes entre pacientes inférteis (LISSITSINA et al., 2003; YAKIN et al., 2005; CHRISTOFOLINI et al., 2012). Os heteromorfismos são variações nas regiões de heterocromatina entre os indivíduos, tais como inversões, duplicações e deleções, e ocorrem com maior frequência nos cromossomos 1, 9, 16 e Y (GERSEN, KEAGLE, 2005). Como não há genes transcritos nessas áreas, geralmente não são relacionados a alterações fenotípicas aparentes. No entanto, essas regiões estão altamente relacionadas com a regulação da recombinação, a formação do complexo sinaptonêmico e a ancoragem de proteínas e estruturas específicas como coesinas e cinetócoro, sendo importantes

para a manutenção do centrômero e correta segregação meiótica e mitótica (PIECZARKA, MATTEVI, 1998). Desta forma, os heteromorfismos poderiam levar à baixa qualidade espermática e conseqüentes perdas fetais (WOLSTENHOLME, BURN, 1992).

Microdeleções do cromossomo Y são a segunda causa genética mais comum de infertilidade masculina e na última década foram muito estudadas, tornando a investigação destas alterações uma importante ferramenta diagnóstica para esses pacientes. Elas ocorrem em aproximadamente um a cada 4000 homens na população geral, mas tem sua frequência significativamente aumentada em homens inférteis, variando de 2 a 10%. A Figura 1 mostra as frequências de deleções das regiões de AZF em pacientes inférteis ao redor do mundo, demonstrando uma significativa incidência de aproximadamente 7,7% no Brasil (KRAUSZ et al., 2014).

Figura 1- Frequência de deleções da região AZF entre homens inférteis ao redor do mundo (KRAUSZ, et al; 2014).

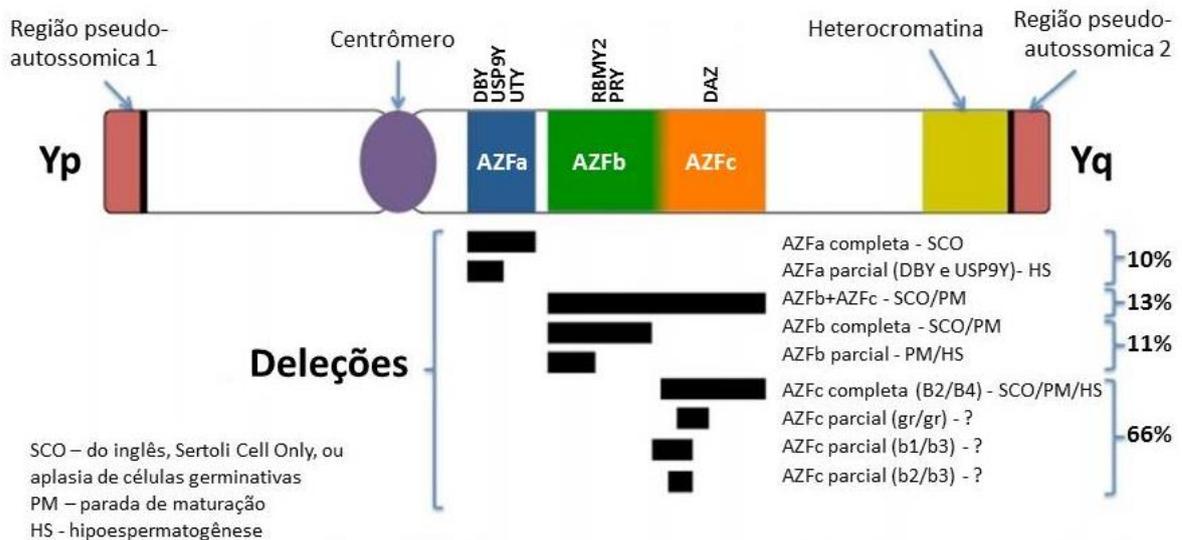


A região do fator de azoospermia (AZF) se encontra no braço longo do cromossomo Y e possui três sub-regiões denominadas de AZFa, AZFb e AZFc (Figura 2, p.20) (O'FLYNN O'BRIEN et al.; 2010). Microdeleções nessa região envolvem perdas de 0,8 a 7,7 megabases, contendo vários genes envolvidos no crescimento e

desenvolvimento dos espermatozoides. Na maioria dos casos trata-se de uma ocorrência *de novo*, evidenciando a natureza instável da região, fato atribuído à alta presença de sequências repetitivas de DNA. O alto grau de homologia dessas regiões promove recombinações intracromossômicas e rearranjos com padrões específicos de microdeleções (MCLACHLAN, O'BRYAN, 2010).

A região e a extensão da deleção podem ser preditivas da gravidade do fenótipo do paciente. Aproximadamente 60% dos casos de microdeleção envolvem apenas a região de AZFc e o fenótipo varia de azoospermia à normozoospermia. Neste caso, em mais de 50% dos pacientes com azoospermia, é possível recuperar espermatozoides por punção testicular (TESE, do inglês, *testicular sperm extraction*). Deleções envolvendo AZFa e/ou AZFb, assim como AZFb+c, são geralmente azoospermicos com pouca ou nenhuma chance de recuperação espermática por TESE (MCLACHLAN, O'BRYAN, 2010).

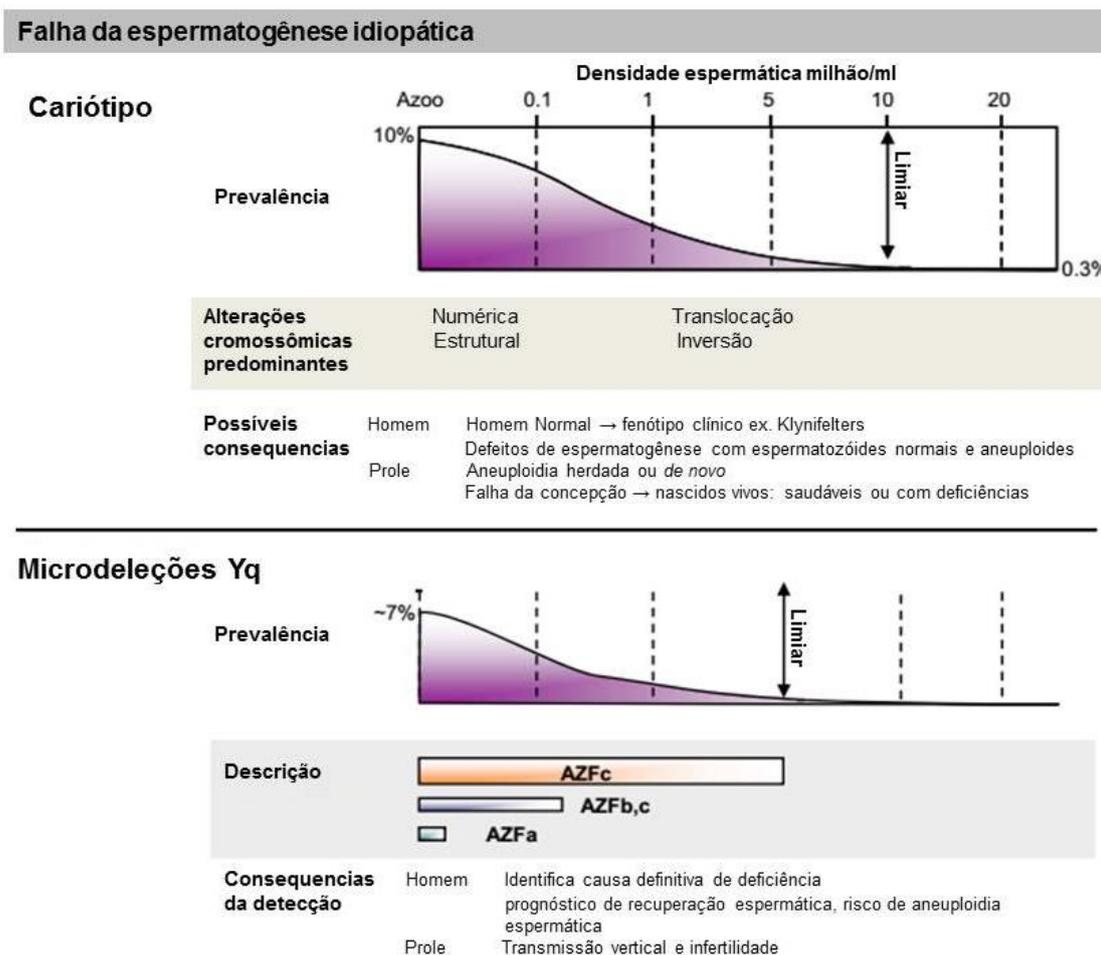
Figura 2- Microdeleções do cromossomo Y. Acima de cada região estão identificados os principais genes presentes e ao lado de cada tipo de microdeleção estão descritos os fenótipos comuns aos portadores e a incidência dos mesmos entre pacientes com microdeleções (traduzido de NETO et al.: 2016).



A literatura mostra que tanto as alterações cromossômicas como as microdeleções do cromossomo Y são progressivamente mais frequentes quanto menores as concentrações espermáticas, o que evidencia a forte influência genética nas alterações de espermatogênese, principalmente as graves (Figura 3, p. 21) (MCLACHLAN, O'BRYAN, 2010). As tecnologias presentes atualmente na rotina de investigação da infertilidade masculina detectam alterações genéticas em

aproximadamente 15 a 30% dos pacientes (NETO et al.; 2016). Os exames disponíveis permitem a detecção de anormalidades cromossômicas e algumas mutações gênicas envolvendo a produção e a funcionalidade das células germinativas como, por exemplo, mutações no gene *CFTR* em casos de agenesia congênita dos vasos deferentes (KRAUSZ, CHIANESE; 2014). Porém, apesar de a infertilidade masculina ter uma incidência preocupante, de 7% entre os homens em idade reprodutiva, grande parte dos casos são considerados idiopáticos, ou seja, sem causa definida, mesmo depois de uma longa e cuidadosa investigação (ASTON, 2014). Acredita-se que em pelo menos metade dos casos sem um diagnóstico preciso existam fatores genéticos envolvidos (NETO et al.; 2016). No entanto, poucas causas genéticas foram identificadas até o momento.

Figura 3- Investigações genéticas da infertilidade masculina por cariótipo e detecção de microdeleções do cromossomo Y em casos de falhas da espermatogênese idiopáticas são mostradas com suas frequências aproximadas, tipos e conseqüências para o indivíduo e a prole. Note a relação dos diferentes valores de limiar recomendados nos quais a frequência da anormalidade se aproxima da frequência encontrada na população em geral. A prevalência aproximada das microdeleções de AZF estão representadas pelo tamanho de suas barras (adaptado e traduzido de MCLACHLAN, O'BRYAN, 2010).



1.3 METODOLOGIA DE INVESTIGAÇÃO GENÔMICA EM INFERTILIDADE MASCULINA

A metodologia atualmente mais utilizada para a investigação de causas genéticas da infertilidade é o de sequenciamento por Sanger. Nesta técnica são analisadas regiões suspeitas de estarem envolvidas com o fenótipo, geralmente baseadas em estudos de genes nocauteados em modelos de camundongo. A análise tem por objetivo a identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) ou disrupções gênicas que ocorrem com maior frequência ou exclusivamente em pacientes inférteis (ASTON, 2014).

SNPs ocorrem quando um único nucleotídeo é alterado em uma sequência de DNA, tanto em regiões codificadoras ou não codificadoras. Muitos deles não têm nenhum efeito na função celular, mas podem predispor o organismo a doenças ou influenciar sua resposta a uma droga. Desta forma, estudos de SNP do genoma humano podem trazer importantes avanços para o entendimento de muitas doenças poligênicas e sugerir possíveis alvos terapêuticos (SEAL et al., 2014). Pelo menos 139 genes suspeitos de estarem relacionados à infertilidade já foram analisados pela técnica de sequenciamento Sanger, porém poucos resultados são suficientemente robustos para afirmar associações do genótipo com o fenótipo. Baseado em vários estudos e meta análises, alguns polimorfismos em genes como o *MTHFR*, *GSTM1* e *FSHB* mostraram evidências de associação com o fenótipo de infertilidade masculina, no entanto, o risco conferido por eles é baixo. Claramente, o desafio da caracterização genética da infertilidade masculina está relacionado à complexidade do processo da espermatogênese, a qual requer uma ação conjunta de centenas a milhares de genes sob o controle de elementos regulatórios ainda não caracterizados (ASTON, 2014).

O avanço das técnicas de análise genômica trouxe a enorme vantagem de permitir o estudo de múltiplos genes em paralelo, possibilitando a identificação da etiologia poligênica responsável por alterações da espermatogênese (MASSART et al., 2012). As técnicas citogenéticas clássicas combinadas com novas tecnologias de análise de todo o genoma permitem a detecção tanto de SNPs e pequenos *indels* (deleções e duplicações de bases nucleotídicas), como de variações estruturais envolvendo muitos pares de bases como as inversões, translocações e inserções, e as deleções e duplicações que constituem as variações no número de cópias (CNVs) (WISZNIEWSKA et al.; 2014).

CNVs são definidas como segmentos de DNA de 1Kb ou mais que estão presentes em número variado de cópias no genoma. Na década de 1980, foram descritas as primeiras CNVs, porém, acreditava-se que a sua incidência na população era baixa e estaria diretamente relacionada a doenças genéticas específicas. Somente na década de 2000 as CNVs foram reconhecidas como fonte de variação interindividual no genoma de indivíduos saudáveis. Hoje, sabe-se que aproximadamente 12% do genoma humano é constituído por CNVs, as quais abrangem milhares de genes e outros elementos funcionais. A alta incidência e as diferenças interpopulacionais descritas pela literatura sugerem que as CNVs tenham um importante papel na evolução das espécies e na suscetibilidade a doenças comuns (FANCIULLI et al., 2010). CNVs podem influenciar a expressão gênica por disrupção e alteração da dosagem gênica, por exposição de alelos recessivos e algumas vezes por efeito de posição e por predispor a ocorrência de alterações genética deletérias. Com isso, elas são capazes de causar doenças da mesma forma que microdeleções e microduplicações, ou de conferir riscos no caso de doenças complexas (REDON et al., 2006).

Um dos grandes desafios dos estudos das CNVs presentes no genoma humano é entender a influência das CNVs no fenótipo dos portadores. Para auxiliar na interpretação dessas variações foi criado o banco de dados DGV (*Database of genomic variants* - <http://dgv.tcag.ca/>) o qual reúne informações sobre as CNVs reconhecidas benignas segundo a literatura. Existem também bancos de dados que apresentam as CNVs já relacionadas a doenças como é o caso do DECIPHER (*DatabasE of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* - <https://decipher.sanger.ac.uk/>), ISCA (*International Standards for Cytogenomic Arrays* - <http://dbsearch.clinicalgenome.org/search/>), ECARUCA (*European Cytogeneticists Association Register of Unbalanced Chromosome Aberrations* - <http://umcecaruca01.extern.umcn.nl:8080/ecaruca/ecaruca.jsp>), entre outros. A pesquisa nestes bancos de dados permite classificar as CNVs em benignas, patogênicas ou de efeito desconhecido. Nestes casos, por meio da investigação do tamanho e do conteúdo gênico dos CNVs, da herança transmitida pelos pais, saudáveis ou não, e da concordância entre os fenótipos de portadores das mesmas alterações, é possível inferir se CNVs de efeitos desconhecidos são potencialmente benignos ou patogênicos (GIJSBERS et al., 2011).

A técnica de hibridação genômica comparativa por microarranjos (*array*-CGH) tem sido o método mais utilizado para a detecção de CNVs. Ela 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 indicará perdas (razão < 0,8 de sondas do paciente/sondas controle) ou ganhos (razão > 1,2 de sondas do paciente/sondas controle) de material cromossômico em todo o genoma (LICHTER et al., 2000).

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

As plataformas de *array*-CGH podem ser utilizadas para investigação de CNVs em regiões distintas do material genético, como cromossomos inteiros, segmentos cromossômicos, regiões cromossômicas relacionadas a doenças específicas, todas as regiões subteloméricas, ou mesmo o genoma inteiro. Esta técnica tem sido muito utilizada na análise de ganhos e perdas genômicas em tumores, e também vem sendo cada vez mais utilizada, com significantes contribuições, para caracterização e delimitação precisa de alterações genômicas e para associação entre anormalidades cromossômicas e manifestações clínicas, assim como para definição de variações genômicas normais na população (SPEICHER, CARTER, 2005).

Foram desenvolvidas diversas variações da técnica de *array*-CGH, como o *array* de cDNA, que permite a análise da expressão gênica (POLLACK et al., 1999), e os SNP arrays, que são baseados em uma alta densidade de oligonucleotídeos capazes de identificar além de CNVs, perdas de heterozigidade (LOH, do inglês,

loss of heterozygosity). No *SNP array*, diferente do CGH, o DNA da amostra em estudo e o DNA controle são hibridados independentemente e as intensidades das sondas dos possíveis alelos revelam qual dos genótipos esperados está presente (por exemplo AA, BB ou AB). A intensidade da marcação é também utilizada para identificar alterações no número de cópias (BIGNELL et al., 2004).

Atualmente existem também plataformas de *array-CGH* que combinam sondas de análise de CNVs e de SNPs em um único experimento. O *array-CGH* é uma excelente ferramenta para detectar ganhos e perdas de material genético, mas não é capaz de reconhecer regiões onde ocorreram perdas seguidas de duplicação do alelo remanescente, gerando a dissomia uniparental, uma forma de LOH (WONG et al., 2004). Outra forma de LOH são as regiões idênticas por descendência, em casos de consanguinidade ou endogamia (SOUTH et al., 2013). No *array-CGH+SNP*, além da detecção de CNVs, a alta densidade de sondas de SNPs altamente polimórficos na população é capaz de reconhecer regiões de sondas subsequentes em que apenas o genótipo homocigoto é detectado (AA ou BB), identificando a ocorrência de LOHs (KOH et al., 2014). LOHs podem influenciar o fenótipo dos portadores por expor alelos recessivos ou por envolver genes imprintados (D'AMOURS et al., 2014).

Estas tecnologias de alta resolução vêm ganhando espaço na pesquisa e colaboram para o conhecimento de processos envolvidos no funcionamento genômico normal e nas doenças humanas. Para os pacientes inférteis, esses resultados significam a possibilidade de um diagnóstico preciso e uma melhora do prognóstico. Além disso, os dados obtidos irão conduzir a uma melhor compreensão dos mecanismos moleculares da espermatogênese e, portanto, deverão contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da infertilidade (COUTTON et al., 2012).

1.4 CORRELAÇÃO ENTRE GENÓTIPO E FENÓTIPO DE INFERTILIDADE MASCULINA

Publicações recentes têm abordado a extensa contribuição genética para a infertilidade e novos genes potencialmente envolvidos neste fenótipo têm sido descritos. Massart e colaboradores (2012) revisaram a literatura sobre genes descritos

como alterados em pacientes com defeitos na espermatogênese ou parâmetros espermáticos, seja por mutações, microdeleções ou variações do número de cópias. Os autores descreveram uma série de genes candidatos envolvidos em fenótipos diferentes de infertilidade. Segundo os mesmos, alterações metabolicamente específicas e bem definidas na produção espermática seriam provavelmente causadas por alterações em um único gene. Os principais exemplos são as alterações nos genes *SPATA16* (*spermatogenesis associated protein 16*) e *PICK1* (*protein interacting with c kinase 1*) encontradas em pacientes globozoospermicos, detectados por Dam e colaboradores (2007) e Liu e colaboradores (2010), respectivamente. Em pacientes com espermatozoides poliplóides, multiflagelados e macrocéfalos foi descrita uma mutação no gene *AURKc* (*aurora kinase c*), o qual está envolvido na segregação cromossômica e na citocinese (DIETERICH et al., 2007). Já em pacientes astenozoospermicos, foram detectadas 10 mutações em 7 genes provavelmente relacionadas a esse fenótipo: *ADCY10*, *AKAP4*, *CATSPER1*, *CATSPER2*, *CATSPER3*, *CATSPER4* e *PLA2G6* (VISSER et al., 2011).

Apesar do aumento no número de estudos, as causas genéticas de falhas na espermatogênese permanecem obscuras. Além do envolvimento de milhares de genes durante a gametogênese masculina, é provável que, em muitos casos, como em indivíduos com produção espermática abaixo do normal sem causa aparente, a infertilidade seja causada por uma combinação de mutações e polimorfismos em um ou mais genes ou regiões cromossômicas, associados também a fatores ambientais. Cada um destes fatores pode ser considerado como um fator de risco para infertilidade (STAHL, SCHLEGEL, 2012).

Poucos trabalhos descrevem alterações encontradas exclusivamente em pacientes com oligozoospermia. Lai e colaboradores (2009) descreveram um aumento no número de repetições CAG no gene *SCA1* e Gu e colaboradores (2010) detectaram alterações em genes envolvidos na via do piRNA que poderiam também contribuir para o fenótipo de oligozoospermia. Yatsenko e colaboradores (2006) sugeriram associação de mutações no gene *KLHL10* com oligozoospermia em alguns pacientes avaliados.

Alguns autores, porém, descreveram mutações e polimorfismos candidatos como fatores de risco para a diminuição da produção espermática, sendo relacionados ao fenótipo tanto de oligozoospermia quanto de azoospermia. Dentre eles estão variações genéticas nos genes *KIT* e *KITLG* (GALAN et al., 2006), *MSY2* (DENG et

al., 2008), *TSSK2* (ZHANG et al., 2009), *TSSK6* (SU et al., 2010), *NALP14* (WESTERVELD et al., 2006), *ESR1* (GALAN et al., 2005), *NR5A1* (BASHAMBOO et al., 2010), *HSFY* (SHINKA et al., 2004) e *FASLG* (WANG et al., 2009). Outros grupos relacionaram variações genéticas à diminuição da concentração espermática juntamente com a diminuição da mobilidade dos espermatozoides, como é o caso do gene *GSTM1* (VANI et al., 2010), e da porcentagem de espermatozoides com formato normal, relacionada ao gene *NOS* (SAFARINEJAD et al., 2010).

Outros trabalhos importantes evidenciaram a origem multifatorial e poligênica da infertilidade. Wang e colaboradores (2011) analisaram o perfil de microRNAs (miRNAs) no plasma seminal de indivíduos inférteis, tanto com azoospermia quanto com oligozoospermia e astenozoospermia, observando alterações significantes em 19 miRNAs. Os miRNAs são nucleotídeos de fita simples não codificadores que exercem função regulatória da expressão gênica. Eles podem agir por destruição direta de mRNAs, por reprimir a transcrição e outras formas indiretas de inibir a síntese proteica. Durante a espermatogênese, vários estudos em modelos animais têm mostrado que os miRNAs participam da regulação da apoptose e da proliferação e diferenciação celular. Desta forma, alterações na expressão dos miRNAs podem prejudicar a espermatogênese e possivelmente sejam a causa de muitos casos de infertilidade “idiopática” (NETO et al., 2016).

Alterações epigenéticas também vêm sendo relacionadas a parâmetros alterados do sêmen e a infertilidade masculina. Processos epigenéticos são essenciais para a compactação do DNA na cabeça dos espermatozoides e na importante reprogramação epigenética que estabelecem um padrão de metilação das células germinativas masculinas. Alterações na metilação de vários genes têm sido associadas à baixa qualidade espermática (RAJENDER et al., 2011; NETO et al., 2016). Montjean e colaboradores (2012) analisaram um perfil de transcrição do esperma de homens com oligozoospermia e observaram uma série de transcritos *down-regulated* envolvidos na espermatogênese.

A infertilidade masculina é um alarmante problema de saúde global que exige ainda muitos esforços em pesquisa para se desvendar sua heterogênea etiologia e desenvolver tratamentos mais eficazes. Apesar da possibilidade de fertilização *in vitro* de pacientes com oligozoospermia, a utilização da técnica por portadores de alterações genéticas pode acarretar em abortamentos, prole com alterações fenotípicas ou simplesmente a propagação da infertilidade nas próximas gerações

(KRAUSZ, CHIANESE, 2014). O melhor entendimento das causas genéticas da infertilidade certamente trará grandes avanços para o aconselhamento em relação às alternativas reprodutivas do casal. Em casos de risco genético aos descendentes, é possível a utilização de ferramentas como o diagnóstico genético pré-implantacional (PGD, do inglês, *Preimplantation Genetic Diagnosis*), o qual permite uma seleção embrionária objetivando evitar aneuploidias cromossômicas ou a transmissão vertical de alterações específicas, como as microdeleções de AZF (MCLACHLAN, 2013).

Justificativa

2 JUSTIFICATIVA e HIPÓTESE

Durante muito tempo, a infertilidade conjugal foi atribuída às mulheres e só recentemente a contribuição em igual proporção pelos homens vem sendo reconhecida. Por essas e outras razões, como a extrema heterogeneidade dos fatores envolvidos, sabe-se muito pouco sobre a etiologia da infertilidade masculina. Tampouco é determinado o grau de contribuição genética na redução da fertilidade, uma vez que a maioria dos fatores associados, se não todos, mesmo classificados como fatores exclusivamente ambientais, são possivelmente influenciados ou determinados por algum componente genético. Dessa forma, diferentes técnicas de investigação genômica podem ser promissoras no sentido de identificar, simultaneamente, alterações em múltiplos genes, correlacionando alterações genômicas ao fenótipo de infertilidade.

A infertilidade masculina por oligozoospermia é um diagnóstico frequente no Ambulatório de Urologia assim como no Serviço de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP, os quais mantêm sólida parceria com o Laboratório de Citogenética Humana da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto no desenvolvimento de muitos trabalhos sobre a contribuição genética na infertilidade, nos últimos 15 anos.

A hipótese deste trabalho é que existem alterações genômicas presentes em pacientes com oligozoospermia que podem estabelecer uma assinatura molecular para o diagnóstico destes pacientes. Pressupomos que a técnica de array-CGH seja uma boa ferramenta para a investigação destes genes de forma rápida, efetiva e confiável.

Objetivos

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Realizar a caracterização genômica de homens inférteis com diagnóstico de oligozoospermia para identificação de alterações genômicas relacionadas ao fenótipo de infertilidade.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Descrição de variações no número de cópias (CNVs) e perdas de heterozigosidade (LOHs) que possam estar envolvidas com o fenótipo de oligozoospermia por meio da técnica de hibridação genômica comparativa em microarranjos (*array-CGH*).

Comparação entre os dados de investigação genômica (CNVs e LOHs) obtidos em pacientes com oligozoospermia e os dados obtidos em grupo controle composto por homens férteis.

Realizar análise comparativa *in silico* das alterações descritas na literatura por diferentes grupos de pesquisa em amostras de pacientes inférteis, para definição de regiões genômicas de interesse na investigação de pacientes com oligozoospermia.

Identificar alterações específicas do cromossomo Y para correlação entre genótipo e fenótipo de infertilidade.

Identificar genes e microRNAs relacionados à espermatogênese, possivelmente associados ao quadro de oligozoospermia.

Material e Métodos

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MATERIAL

4.1.1 Casuística

Este 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 Departamento de Ginecologia e Obstetrícia e com o Departamento de Cirurgia e Anatomia – disciplina de Urologia da FMRP-USP.

Todos os integrantes do grupo composto por homens com olizoospermia e do grupo controle foram convidados a participar voluntariamente da pesquisa e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) referente ao Projeto 3537/2013, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP (Anexos 1 e 2).

Foram investigados 18 homens com faixa etária entre 25 e 41 anos, com média de 35,4 anos, e diagnóstico de infertilidade masculina por oligozoospermia. Os critérios para inclusão da amostra foram:

- a) Análise de dois ou mais espermogramas com volume de espermatozoides abaixo de $15 \times 10^6/\text{ml}$, de acordo com critérios da Organização Mundial da Saúde (COOPER et al., 2010);
- b) Perfil hormonal e avaliação clínica normais dos pacientes, após protocolo de investigação de casais inférteis;
- c) Cariótipo normal 46,XY sem anormalidades numéricas ou estruturais, com exclusão de mosaicismo cromossômico.

Foram excluídos os pacientes portadores de microdeleções do cromossomo Y, assim como pacientes com alterações cromossômicas classificadas como variantes da normalidade. O grupo amostral final foi formado por 18 homens com oligozoospermia, sendo quatro pacientes com oligozoospermia moderada (entre 15 a 5 milhões/ml), sete pacientes com oligozoospermia grave (entre 5 e 1 milhão/ml) e sete pacientes com oligozoospermia extrema (<1 milhão/ml).

O grupo controle incluiu seis homens normospérmicos, com faixa etária entre 34 e 40 anos e média de 37,3 anos, fertilidade comprovada (dois filhos, sendo o mais novo de até dois anos), não fumantes e com cariótipo normal.

4.1.2 Amostra

Foram coletadas duas amostras de sangue periférico: uma para cultura de linfócitos e uma segunda para extração de DNA, de cada paciente do grupo com oligozoospermia e do grupo controle. Para o estudo citogenético convencional e determinação do cariótipo somático foram utilizados linfócitos extraídos de sangue periférico por venopunção. As amostras de 5ml de sangue foram coletadas em tubos Vacutainer® contendo heparina sódica. Já as amostras para extração de DNA foram coletadas em tubos Vacutainer® de 5ml contendo EDTA.

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Citogenética Clássica

Técnica de cultura temporária de linfócitos (MOORHEAD et al., 1960 modificada) e **bandamento GTG** (SCHERES, 1972):

500µL de sangue coletados dos pacientes e dos controles foram cultivados em 5ml de meio RPMI 1640 (cat nº 11875, GIBCO, Invitrogen) com L-glutamina suplementado com 2% de fitohemaglutinina (cat nº 10576-015, GIBCO, Invitrogen), estreptomicina / penicilina (cat nº 15140-148, GIBCO, Invitrogen) e 20% de soro bovino fetal (cat nº 12657-029, GIBCO, Invitrogen) em estufa a 37°C, por 72 horas. Meia hora antes de completar o tempo de cultura, foram adicionados ao meio 250µL de colchicina a 0,0016% (cat nº C3915-1G, Sigma), retornando assim à estufa pelo tempo restante, etapa em que as células são bloqueadas na fase de metáfase da divisão celular. Após meia hora, foi realizada a centrifugação a 1000 RPM por 10 minutos, o sobrenadante foi retirado e foram adicionados 5mL de solução hipotônica (KCl 0,075M) a 37°C. O material foi então incubado por 10 minutos em banho-maria a 37°C. No tubo foram adicionadas 10 gotas de solução Carnoy (3 metanol:1 ácido acético) para interromper a ação da hipotônica e, após homogeneização, foi realizada nova centrifugação por 10 minutos a 1000 RPM. O sobrenadante é retirado e o material

fixado pela adição de 5mL de solução Carnoy. O material foi homogeneizado e mantido por 10 minutos em repouso em temperatura ambiente. Em seguida, centrifugado a 1000 RPM por 10 minutos e o sobrenadante removido. Esta etapa de lavagem pela adição de solução Carnoy foi repetida mais duas vezes, agora sem o tempo de repouso, e a suspensão celular resultante foi utilizada para a confecção de lâminas. As lâminas foram então coradas com uma solução de Giemsa (Merck) em tampão fosfato 0,06M pH=6,8 (1:30) por cinco minutos e lavadas com água corrente. Para obtenção do bandeamento GTG, as lâminas preparadas a partir de suspensão celular obtidas de cultura temporária de linfócitos foram mantidas em temperatura ambiente por três a 15 dias e então mergulhadas em tripsina (DIFCO 1:250) diluída a 0,1% em tampão fosfato (0,06M pH6,8) por um a 20 segundos, dependendo do tempo de envelhecimento. A ação da tripsina foi neutralizada com água destilada e, em seguida, coradas com Giemsa (Merck), por 10 minutos. Foram analisadas 50 metáfases de cada paciente para determinação do número total de cromossomos e, em casos de suspeita de mosaicismo, o número foi aumentado para 100 metáfases de acordo com o protocolo de Hook e colaboradores (1983) para exclusão de mosaicismo com nível de confiabilidade de 3%. Foram capturadas 20 metáfases para determinação do cariótipo do paciente. A análise microscópica foi realizada em microscópio Axio ImagerD2 (Zeiss), em objetiva Plan APO 100x, acoplado a um sistema computadorizado de análise MetaSystems, utilizando o *software* IKARO para a documentação dos resultados.

4.2.2 Genética Molecular

Análise de Microdeleção do cromossomo Y

Para a exclusão de pacientes contendo microdeleções no cromossomo Y foi realizada a análise das regiões AZF por meio de PCR multiplex seguida de eletroforese em gel de agarose. O método foi realizado com o Quiagen Multiplex PCR Kit (Cat.No. 206143, Quiagen,Hilden, Alemanha) e *primers* da *Eurofins Genomics* (Ebersberg, Alemanha), desenhados segundo orientação da Academia Europeia de Andrologia (EAA, do inglês *European Academy of Andrology*) e da Rede Europeia de Qualidade na Genética Molecular (EMQN, do inglês *European Molecular Genetics Quality Network*) (Krausz *et al.*, 2014). A Tabela 1 (p. 37) contém a lista de *locus* e a sequência dos *primers* utilizados.

Tabela 1- Locus e sequencias dos *primers* utilizados na técnica de PCR para análise de microdeleções do cromossomo Y (editado e traduzido de Krausz *et al.*, 2014).

<i>Locus</i>	<i>Primer</i>	Sequencia	Tamanho do fragmento amplificado	Status na deleção completa
Reação A e B				
<i>ZFX/Y</i>	<i>ZFX/Y-F</i>	5'-ACC RCT GTA CTG ACT GTG ATT ACA C-3'	495pb	Presente
	<i>ZFX/Y-R</i>	5'-GCA CYT CTT TGG TAT CYG AGA AAG T-3'		
<i>SRY</i>	sY14-F	5'-GAA TAT TCC CGC TCT CCG GA-3'	472pb	Presente
	sY14-R	5'-GCT GGT GCT CCA TTC TTG AG-3'		
Reação A				
<i>AZFa</i>	sY86-F	5'-GTG ACA CAC AGA CTA TGC TTC-3'	318pb	Ausente
	sY86-R	5'-ACA CAC AGA GGG ACA ACC CT-3'		
<i>AZFb</i>	sY127-F	5'-GGC TCA CAA ACG AAA AGA AA-3'	274pb	Ausente
	sY127-R	5'-CTG CAG GCA GTA ATA AGG GA-3'		
<i>AZFc</i>	sY254-F	5'-GGG TGT TAC CAG AAG GCA AA-3'	380pb	Ausente
	sY254-R	5'-GAA CCG TAT CTA CCA AAG GAC C-3'		
Reação B				
<i>AZFa</i>	sY84-F	5'-AGA AGG GTC CTG AAA GCA GGT-3'	326pb	Ausente
	sY84-R	5'-GCC TAC TAC CTG GAG GCT TC-3'		
<i>AZFb</i>	sY134-F	5'-GTC TGC CTC ACC ATA AAA CG-3'	301pb	Ausente
	sY134-R	5'-ACC ACT GCC AAA ACT TTC AA-3'		
<i>AZFc</i>	sY255-F	5'- GTT ACA GGA TTC GGC GTG AT-3'	123pb	Ausente
	sY255-R	5'-CTC GTC ATG TGC AGC CAC-3'		

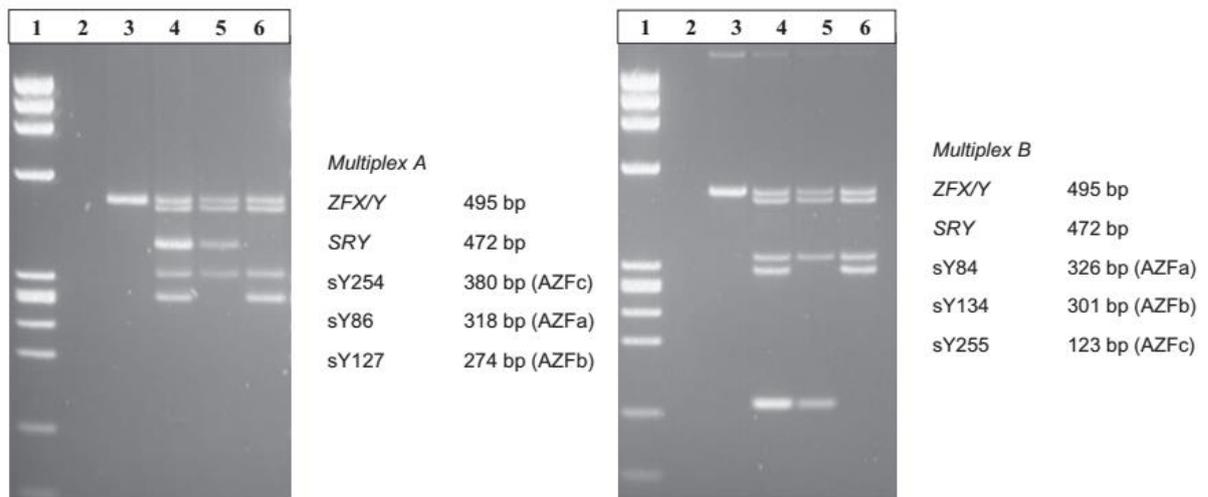
A análise foi realizada por meio de duas reações: A e B. O mix de *primers* de cada reação foi feito com 2µL de cada *primer*. Cada reação foi então realizada com 9µL de água ultrapura, 12,5µL de Qiagen Multiplex PCR MasterMix (contendo Hot-StarTaq DNA Polymerase, Qiagen Multiplex PCR Buffer com 6 mM MgCl² e mix de dNTP), 2,5µL do mix de *primers* A ou B e 1µL de DNA em concentração aproximada de 100ng.

As condições de amplificação em termociclador tiveram início com uma etapa de ativação de 15 minutos a 95°C, seguido por 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação (94°C), 90 segundos de anelamento (60°C) e 90 segundos de alongação (72°C), finalizado por uma etapa de alongação de 10 minutos e resfriamento a 4°C.

Os resultados da amplificação foram visualizados por eletroforese em gel de agarose 2% corrido a 90 V por aproximadamente 2 horas. Em ambas as reações multiplex foram utilizados um controle feminino, um masculino sem microdeleção e

um controle branco, ou seja, sem adição de DNA. Tanto na reação A quanto na B, são visualizados cinco fragmentos amplificados em pacientes sem microdeleções. A primeira banda de ambas as reações corresponde à amplificação do marcador molecular do gene *ZFX* (presente tanto no cromossomo Y como no X), servindo como controle interno da reação. Esta banda deve estar presente tanto nas amostras masculinas como femininas. A segunda banda corresponde à amplificação do marcador molecular do gene *SRY* presente no cromossomo Y. As bandas subsequentes correspondem as amplificações dos STSs (do inglês, *Site Tagged Sequence*) correspondentes às regiões de AZFa, AZFb e AZFc (Figura 4).

Figura 4- Exemplos de ambas as reações A e B de PCR multiplex para microdeleções do cromossomo Y. Na coluna um foi aplicado o marcador de peso molecular, na coluna dois o controle branco, na coluna três o controle feminino, na coluna quatro o controle masculino sem microdeleções, na coluna cinco um paciente apresentando microdeleção de AZFb e na coluna seis um paciente apresentando microdeleção de AZFc.



4.2.3 Investigação Citogenômica

4.2.3.1 Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada em triplicata por meio do método *MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit – Epicentre (US)*, a partir de sangue total coletado dos pacientes. Na primeira etapa de lise das células sanguíneas, foram aliqüotados 200µL de amostra em um tubo de 1,5mL e adicionados 600µL da solução de lise de células vermelhas do sangue, invertendo o tubo três vezes para misturar e então agitar o fundo para suspender qualquer material remanescente. O tubo foi

incubado por 5 minutos à temperatura ambiente e homogeneizado no vortex rapidamente. A incubação foi então repetida com nova homogeneização, seguida de centrifugação por 25 segundos para a sedimentação dos glóbulos brancos. O sobrenadante foi quase todo removido, deixando-se apenas aproximadamente 25µL onde o sedimento foi homogeneizado em vortex. Foram adicionados 300µL da solução de lise celular ou tecidual, pipetando várias vezes para resuspensão das células. Foi então adicionado 1µL de RNase A, homogeneizando cuidadosamente e incubando a 37°C por 30 minutos. Após esta etapa a amostra foi guardada em gelo por 3 a 5 minutos. Para a extração do DNA total foram adicionados 150µL do reagente de precipitação proteica MPC a 300µL da amostra e homogeneizados vigorosamente no vortex por 10 segundos. A amostra foi então centrifugada por 10 minutos a 4°C a 13.000rpm e o sobrenadante transferido para um novo tubo, descartando o sedimento. Foram adicionados ao tubo 500µL de isopropanol invertendo-o por 30-40 vezes. O DNA foi então sedimentado por centrifugação a 4°C por 10 minutos e o isopropanol descartado, enxaguando o sedimento com etanol 70% duas vezes. O sedimento resultante foi resuspenso então em 35µL de tampão TE, sendo estocados a -20°C após quantificação por NanoDrop, utilizando 2µL de cada amostra.

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

A técnica de *array*-CGH + SNP foi realizada utilizando a plataforma SurePrint G3 Human Genome CGH+SNP Microarray, 4x180K (Agilent Technologies®, Santa Clara, CA, USA). Esta plataforma apresenta 110.712 sondas para análise de variações no número de cópias (CNVs) e 59.647 sondas para polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs), dispostas ao longo de todo o genoma com um espaçamento médio entre as sondas de 25,3kb.

A primeira etapa após a extração de DNA foi a verificação da pureza e integridade das amostras através de corrida em gel de agarose 1%. Foram aplicados 10µL de amostra contendo 250ng de DNA e o gel foi corrido a 120V por 40 minutos. Nesta etapa foram desconsideradas as amostras que mostraram fragmentação do DNA ou contaminação por RNA.

O início da técnica de hibridação genômica se deu então com a fragmentação das amostras, realizada com o kit *Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit* (Agilent

Technologies®, Santa Clara, CA, USA). A solução de digestão foi preparada segundo protocolo para oito reações para cada lâmina, sendo quatro para o DNA amostral e quatro para os DNAs controles masculino, adquiridos da mesma empresa. Sendo assim, foram adicionados 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). Foram adicionados 5,8µL deste mix à cada tubo de reação contendo 1µg de DNA genômico diluídos em 20,2µL de água ultrapura, completando um volume de 26µL. Os tubos foram então levados ao termociclador programado para manter as amostras a 37°C por duas horas, em seguida a 65°C por 20 minutos, para inativação das enzimas, e então manter a 4°C até a finalização manual do programa. A verificação do tamanho dos fragmentos gerados foi feita com 2µL em gel de agarose 1%, devendo as bandas apresentar entre 200 a 800 pb.

Na segunda etapa, foi realizada a marcação do DNA teste e DNA controle com diferentes fluoróforos. Inicialmente, foram adicionados às amostras 5µL de *random primer* e novamente submetidas ao termociclador, programado com dois passos: o primeiro de três minutos a 98°C e o segundo a 4°C até a finalização manual. Então, uma mistura de 4 reações para cada fluoróforo foi preparada segundo o protocolo. A cada mistura foram adicionados 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 adicionados, então, 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 adicionado às reações com DNA amostral. Todas as reações foram então levadas ao termociclador, programado para manter as amostras a 37°C por duas horas, em seguida a 65°C por 10 minutos e então manter a 4°C até a finalização manual do programa.

A terceira etapa foi a de purificação, realizada com filtros Amicon 30kDa. Primeiramente, foram adicionados, a cada amostra, 430µL de TE 1x (pH 8.0). Os filtros foram posicionados em tubos de microcentrífuga e carregados com cada DNA marcado. As amostras foram então centrifugadas por 10 minutos a 14.000xg, em temperatura ambiente. Após o descarte do filtrado, foram adicionados mais 480µL de TE 1x, repetindo a centrifugação e o descarte do filtrado. O retido, juntamente com o filtro, foi vertido em novo tubo de microcentrífuga de 1,5mL e centrifugado por um

minuto a 1.000x g, em temperatura ambiente, para coletar a amostra purificada. Para equiparar a marcação de todas as amostras, estas foram concentradas ou diluídas em TE 1x, conforme as concentrações de cada amostra, para finalizar um volume de 21µL cada, com níveis de marcações semelhantes. Então, 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.

A etapa seguinte foi a de preparação do DNA marcado para a hibridação. Nesta etapa, foi preparada uma solução de hibridação com 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 levadas ao termociclador com um programa de três minutos a 98°C e 30 minutos a 37°C.

Na etapa de hibridação, 100µL do mix de hibridação misturados ao DNA foram depositados nos poços da lamínula, que foi unida virada para baixo a uma lâmina de hibridação e envolvida por uma câmara. Esta câmara foi colocada em prateleira rotatória em forno de hibridação a 67°C e 20rpm, por 24 horas.

Na etapa seguinte, foram feitas as pós-lavagens. Inicialmente, a lâmina e lamínula foram separadas manualmente enquanto mergulhadas em tampão de lavagem oligoCGH 1 em temperatura ambiente. A lâmina teste foi então lavada, sendo a primeira lavagem feita com tampão oligoCGH 1 limpo, em temperatura ambiente por cinco minutos, com agitação magnética. A segunda lavagem foi feita com o tampão oligoCGH 2, a 37°C com agitação magnética por um minuto. Em seguida, as lâminas foram lavadas em acetoneitrila, também em agitação magnética, por 10 segundos. As lâminas foram então mergulhadas em solução de estabilização e secagem, com a mesma agitação por 30 segundos.

Após as lavagens, as lâminas foram imediatamente posicionadas no suporte *SureScan* para serem escaneadas em seguida. Para o escaneamento das lâminas de microarranjo, utilizamos o *Agilent SureScan B Scanner* e o *The Feature Extraction software* v12.0 foi usado para a análise das imagens. 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-6 e um espaço máximo

entre sondas adjacentes de 10.000kb. Alterações no número de cópias menores que 1Kb e/ou incluindo menos de 3 sondas adjacentes foram desconsideradas, 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.

A interpretação dos dados foi então realizada por meio de pesquisa nos bancos de dados como o DGV, *Genome Browser* (UCSC versão hg19), PubMed, OMIM, DIANA-miRPath, mirBase, mirDB e o *GeneOntology*. Análises de significância e de poder preditivo das alterações encontradas foram realizados pelo *software* IBM SPSS (IBM, Armonk, NY, USA).

Resultados

5 RESULTADOS

Foram coletadas amostras de 38 pacientes encaminhados para investigação genética com diagnóstico de infertilidade masculina idiopática, com três espermogramas indicando oligozoospermia. Após avaliação física e investigação detalhada do histórico clínico dos pacientes, foram excluídos seis pacientes: dois por apresentarem varicocele, um por ter filho de outro relacionamento, um por ter histórico de hernioplastia inguinal na infância, um por apresentar histórico de abortamentos de repetição e um por histórico de falhas de implantação embrionária de causa indefinida.

Foram realizados os cariótipos de todos os pacientes com oligozoospermia e de todos os homens férteis do grupo controle, para exclusão de portadores de alterações cromossômicas numéricas ou estruturais detectáveis pela técnica de bandeamento GTG. Quatro pacientes foram excluídos nesta etapa por apresentarem heteromorfismos (16qh+, 1qh+, 9qh+ e 9qh+ com 21ps+) e um por apresentar bandeamento cromossômico de baixa resolução. As Figuras 5 e 6 (p. 45) mostram, respectivamente, um resultado de cariótipo normal (46,XY) do paciente 14 selecionado para o estudo e um resultado de cariótipo de um portador de heteromorfismo (46,XY,16qh+), excluído do estudo.

Figura 5- Cariótipo masculino normal 46,XY do paciente 14.

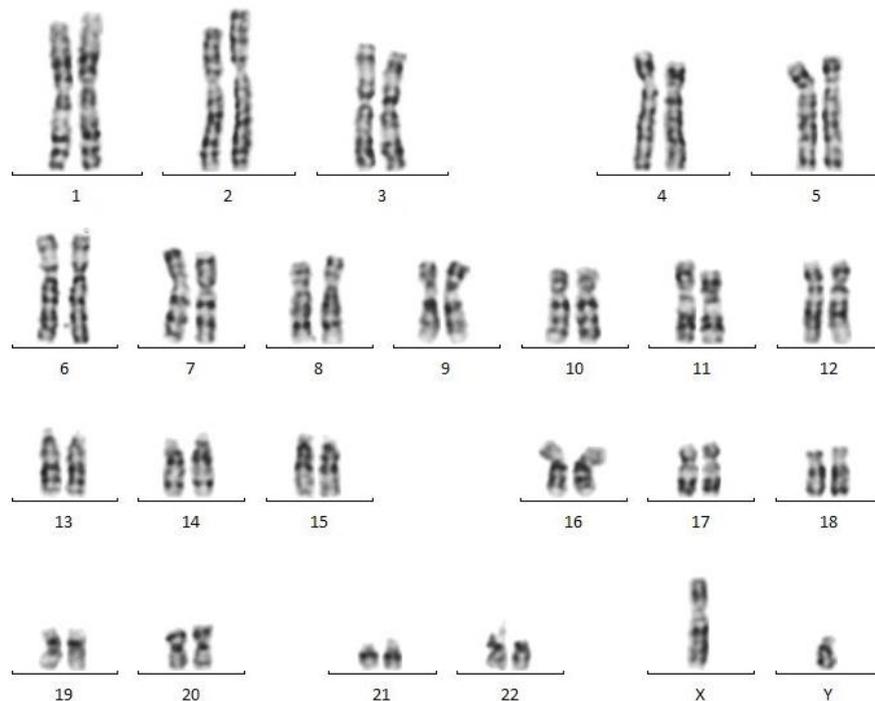
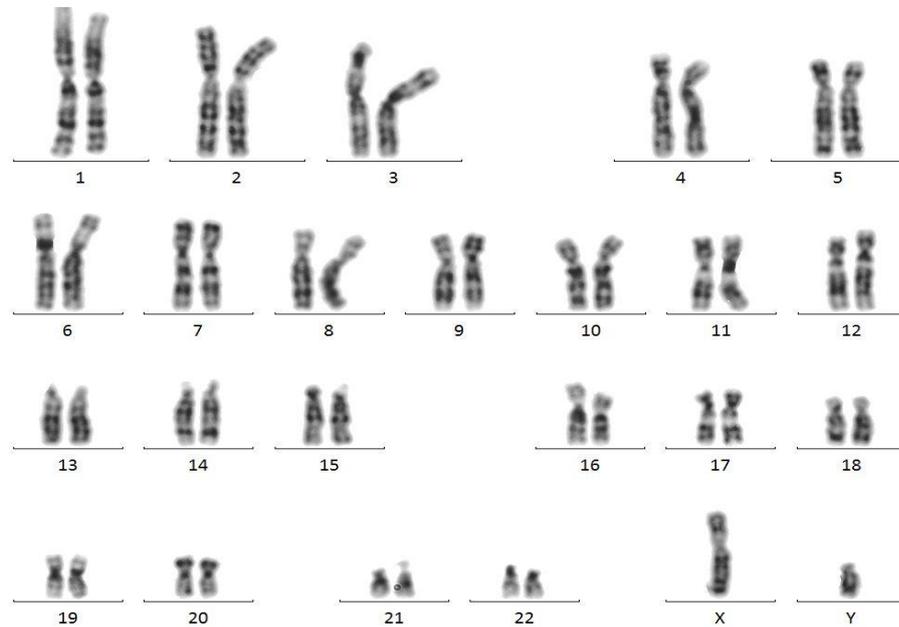


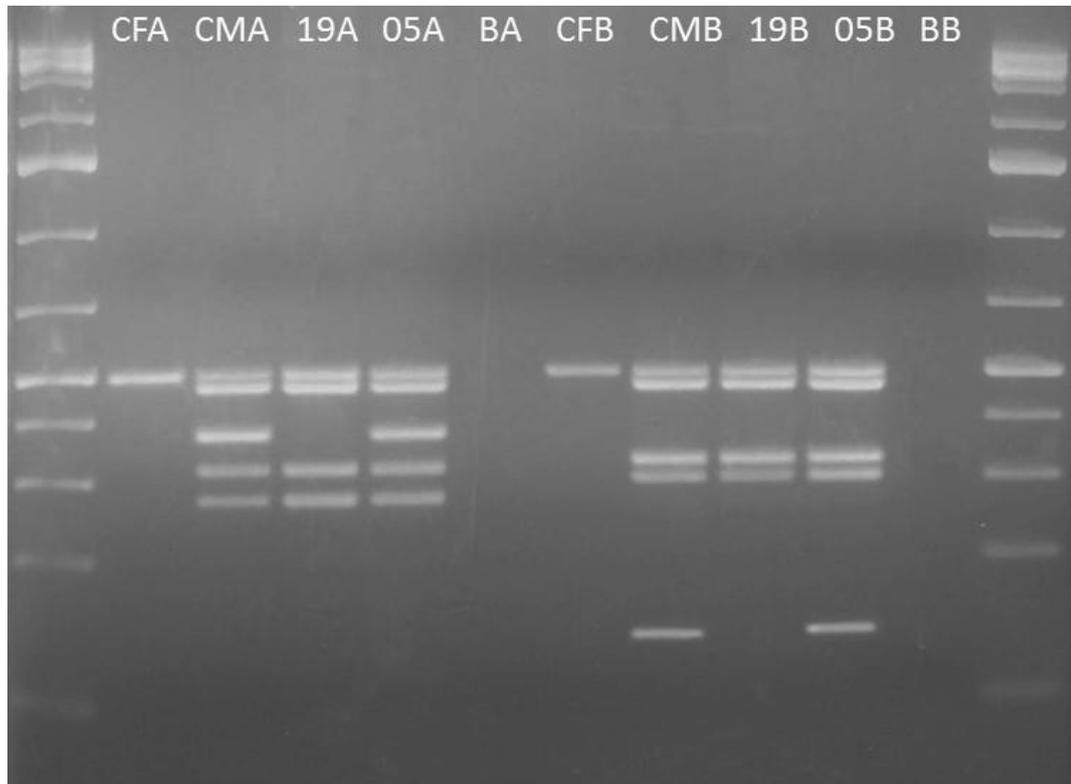
Figura 6- Cariótipo masculino 46,XY,16qh+ de um dos pacientes excluídos do grupo amostral.



A técnica de detecção de microdeleções do cromossomo Y por PCR multiplex e eletroforese em gel de agarose foi aplicada a todos os pacientes da amostra, tendo sido detectada microdeleção da região AZFc em um dos pacientes. Este paciente apresentava oligozoospermia extrema (concentração de 0,6 milhões de espermatozoides/ml) e foi excluído de nosso grupo amostral. Todos os demais pacientes apresentaram resultados negativos para microdeleções (Figura 7, p. 46). Sendo assim, a frequência de microdeleções detectada em nosso grupo amostral inicial foi de 2,6%.

No total foram excluídos 12 pacientes que não preenchiam os critérios de inclusão, restando 26 pacientes. Entre eles, foram selecionados 18 pacientes por critérios de melhor qualidade de DNA extraído e parâmetros espermáticos que permitissem uma boa representação e estratificação entre os graus de oligozoospermia.

Figura 7- Gel de agarose da técnica de análise de microdeleções do cromossomo Y nos pacientes 5 e 19. À esquerda observamos a reação A em paciente controle feminino (CFA) e masculino negativo para microdeleção (CMA), seguidas pelos pacientes 19 e 5, finalizando com a reação do controle branco. Em seguida a mesma sequência para a reação B, incluindo CFB, CMB, pacientes 19 e 5, finalizando com a reação do controle branco. O paciente 19 foi diagnosticado como portador da microdeleção de AZFc devido à ausência das bandas referentes a região em ambas as reações A e B, sendo assim excluído do nosso grupo amostral.



Os pacientes selecionados foram enumerados de 1 a 18, seguidos pela letra dos respectivos graus de oligozoospermia: M para oligozoospermia moderada, G para oligozoospermia grave e E para oligozoospermia extrema. Os valores de concentração espermática, motilidade total (progressiva + não progressiva) e morfologia foram informados através da média entre os resultados apresentados pelos espermogramas de cada paciente. Quatro pacientes apresentaram oligozoospermia moderada, sete oligozoospermia grave e sete oligozoospermia extrema. Os indivíduos controle foram enumerados de C1 a C6 (Tabela 2, p. 47).

Tabela 2- Caracterização amostral relacionando idade, parâmetros do espermograma e classificação diagnóstica dos indivíduos do grupo controle (C1 a C6) e dos pacientes com oligozoospermia (1 a 18).

Amostra	Idade	Concentração espermática	Motilidade total %	Morfologia %	Diagnóstico
C1	35	48	54	8	Normozoospermia
C2	38	72	55	6	Normozoospermia
C3	39	72	40	12	Normozoospermia
C4	38	336	76	4	Normozoospermia
C5	40	52	44	3	Normozoospermia
C6	34	42	40	57	Normozoospermia
1M	38	13,6	18,4	1	Oligoteratoastenozoospermia moderada
2M	34	12,7	12	0,7	Oligoteratoastenozoospermia moderada
3M	25	13,5	6	36,5	Oligoteratoastenozoospermia moderada
4M	26	11,4	52,5	0	Oligoteratozoospermia moderada
5G	41	1,3	0	0	Oligoteratoastenozoospermia grave
6G	41	1,5	0,25	13,5	Oligoastenozoospermia grave
7G	37	2,2	1,5	0	Oligoteratoastenozoospermia grave
8G	41	4,1	0	0,25	Oligoteratoastenozoospermia grave
9G	35	2,2	1,5	0	Oligoteratoastenozoospermia grave
10G	35	1,2	3,2	19,8	Oligoastenozoospermia grave
11G	34	2,75	29	0	Oligoteratoastenozoospermia grave
12E	37	0,8	2,33	30,3	Oligoastenozoospermia extrema
13E	38	0,13	6,7	0,3	Oligoteratoastenozoospermia extrema
14E	38	0,2	0	0	Oligoteratoastenozoospermia extrema
15E	28	<0,1	0	0	Oligoteratoastenozoospermia extrema
16E	34	<0,1	1	0	Oligoteratoastenozoospermia extrema
17E	37	0,65	0	0	Oligoteratoastenozoospermia extrema
18E	39	0,9	6	1	Oligoteratoastenozoospermia extrema

5.1 ANÁLISE QUANTITATIVA

A análise preliminar dos resultados da técnica de *array*-CGH mostrou que todas as amostras apresentaram alterações que incluíam perdas, ganhos e LOHs, com exceção dos indivíduos controles C3, C4, C5, C6 e dos pacientes 4M e 11G, que não apresentaram perdas de material genético. Os números de alterações encontradas entre pacientes e controles estão relacionados na Tabela 3 (p. 48).

Tabela 3- Número de alterações no número de cópias (ganhos e perdas) e LOHs detectadas nos controles e pacientes através da técnica de *array*-CGH após análise preliminar dos dados.

Amostras	Ganhos	Perdas	LOH	Total
C1	3	1	7	11
C2	13	5	2	20
C3	16	0	10	26
C4	6	0	1	7
C5	3	0	4	7
C6	2	0	3	5
1M	11	2	6	19
2M	3	1	4	8
3M	20	5	4	29
4M	11	0	14	25
5G	3	3	2	8
6G	5	3	7	15
7G	2	1	5	8
8G	10	3	3	16
9G	3	3	4	10
10G	4	2	5	11
11G	12	0	4	16
12E	5	3	4	12
13E	1	15	3	19
14E	3	4	5	12
15E	2	3	1	6
16E	5	1	3	9
17E	24	2	9	35
18E	12	4	2	18

Na Tabela 4 (p. 49) estão apresentadas as médias das alterações dos grupos amostrais, assim como do grupo controle. Identificamos, através da análise estatística utilizando o teste-T de amostras pareadas no *software* IBM SPSS (IBM, Armonk, NY, USA), que o número de alterações encontradas no grupo amostral total não foi estatisticamente diferente do número de alterações encontradas no grupo controle.

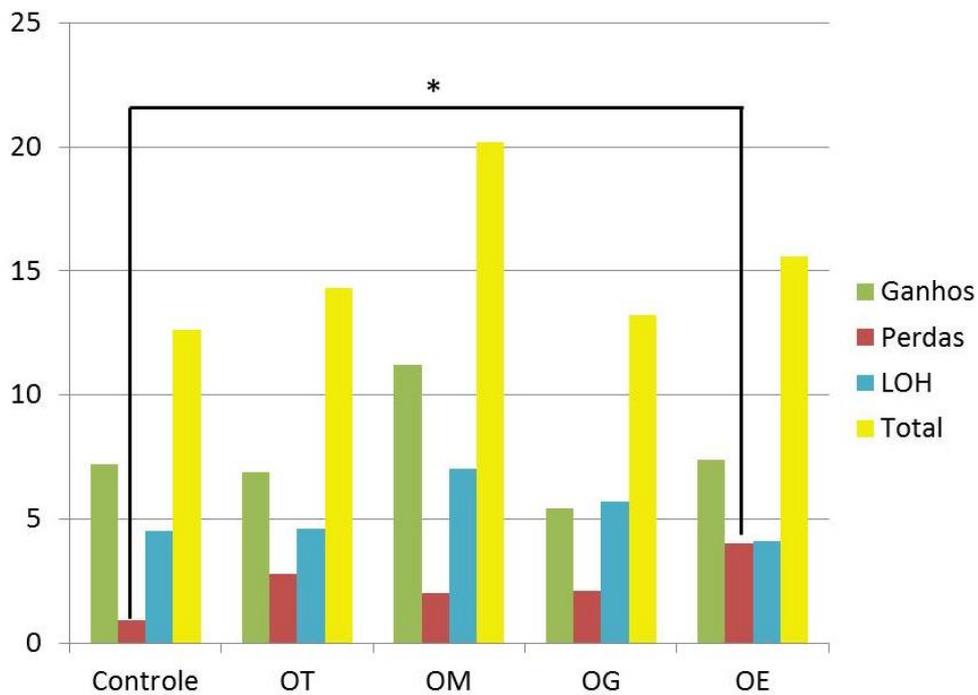
Porém, ao analisarmos os grupos amostrais estratificados segundo o grau de oligozoospermia, o número de perdas encontradas nos pacientes com oligozoospermia extrema mostrou-se significativamente maior do que o número de perdas detectadas no grupo controle ($p=0,040$) (Figura 8).

Tabela 4- Média do número de alterações no número de cópias (ganhos e perdas) e LOHs detectadas no grupo controle, no grupo amostral total e nos grupos estratificados segundo o grau de oligozoospermia.

	Média de Ganhos	Média de Perdas	Média de LOH	Total
Controles	7,2	0,9 ^a	4,5	12,6
Oligozoospermicos Total	6,9	2,8	4,6	14,3
Oligozoospermicos moderados	11,2	2	7	20,2
Oligozoospermicos graves	5,4	2,1	5,7	13,2
Oligozoospermicos extremos	7,4	4 ^b	4,1	15,6

* a é estatisticamente diferente de b.

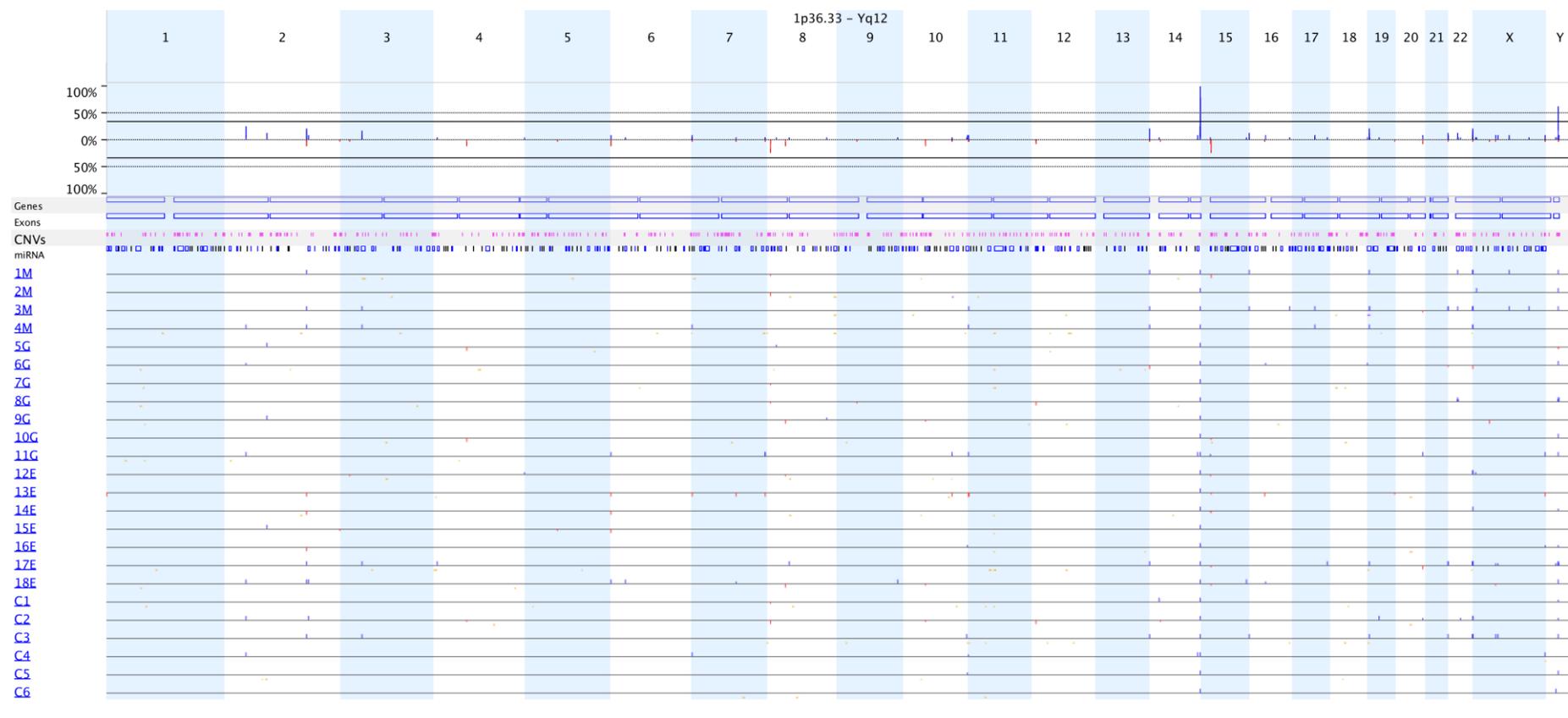
Figura 8- Gráfico mostrando o número de alterações encontradas no grupo controle, no grupo amostral total e nos grupos dos diferentes graus de oligozoospermia. OT (Oligozoospermia, amostra total); OM (Oligozoospermia moderada); OG (Oligozoospermia grave); OE (Oligozoospermia extrema).



* valor de $p < 0,05$

Foram encontradas alterações em todos os cromossomos. A Figura 9 (p.51) foi gerada pelo *software* Nexus 8.0 e mostra uma visão geral das alterações em todo o genoma de todos os pacientes e de todos os indivíduos controle. As alterações identificadas apresentaram tamanho variando de 1Kb a 8Mb.

Figura 9- Visão geral das alterações em todo o genoma de todos os pacientes e indivíduos controles. Cada linha horizontal representa o resultado da técnica de *array*-CGH do paciente indicado à esquerda e as colunas verticais correspondem aos pares cromossômicos. Linhas em azul representam ganhos enquanto linhas vermelhas representam perdas e amarelas LOHs.



5.2 ANÁLISE COMPARATIVA

Através do *software* Nexus 8.0, comparamos perdas, ganhos e perdas de heteroziguidade (LOH) entre o grupo amostral e o grupo controle, além de também comparamos variações entre cada grupo dos graus de oligozoospermia. Foram consideradas comparações com diferenças maiores que 25% e com um valor de $p \geq 0,05$. Uma LOH presente na banda p12 do cromossomo 11, com região de 2Mb compartilhada entre três indivíduos do grupo controle (C1, C3 e C6) foi caracterizada como significativamente diferente entre o grupo amostral e o grupo controle (Figura 10, p. 53). Na comparação dos pacientes com oligozoospermia moderados com o grupo controle, outra LOH na banda q24.3 do cromossomo 8, presente em 3 pacientes (2M, 3M e 4M), se mostrou significativamente diferente entre os grupos (Figura 11, p. 54). As demais comparações não mostraram resultados significativos.

A Tabela 5 (p. 55) relaciona as características das duas regiões compartilhadas entre pacientes ou indivíduos do grupo controle, citadas na análise comparativa.

Figura 10- Resultado da técnica de *array*-CGH mostrando a LOH detectada na região 11p12. Acima o mapeamento do cromossomo 11 e abaixo, as linhas amarelas representando a região que contém a LOH detectada em três pacientes com fenótipo de oligozoospermia moderada, após comparação com o grupo controle.



Figura 11- Resultado da técnica de *array*-CGH mostrando a LOH detectada na região 8q24.3. Acima o mapeamento do cromossomo 8 e abaixo, as linhas amarelas representam a região contendo a LOH detectada em três indivíduos controle relacionado ao fenótipo de normozoospermia pela análise comparativa.

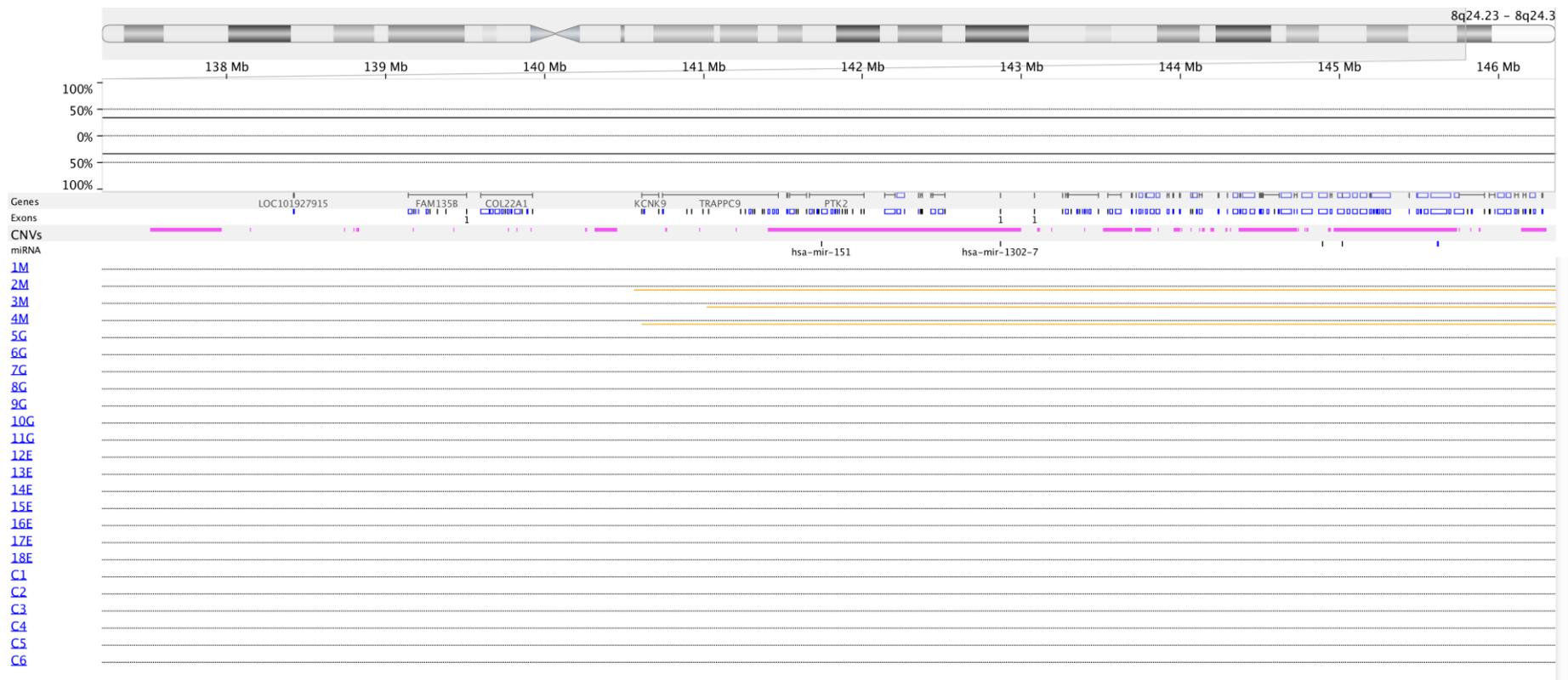


Tabela 5- Caracterização das regiões 11p12 e 8q24.3 onde foram detectadas LOH, após análise comparativa entre o grupo de pacientes com oligozoospermia e o grupo controle.

Cromossomo	Banda	Região	Tamanho	Evento	Genes	Indivíduos portadores
11	p12	37,293,707- 39,316,590	2.022.883pb	LOH	<i>LOC103312105 e LINC01493</i>	C1, C3 e C6
8	q24.3	141,019,815- 146,364,022	5.344.207pb	LOH	<i>TRAPPC9, CHRAC1, AGO2, PTK2, DENND3, SLC45A4, LOC105375787, LINC01300, GPR20, PTP4A3, MROH5, MIR1302-7, MIR4539, MIR4472-1, LINC00051, TSNARE1, ADGRB1, ARC, LOC101928087, JRK, PSCA, LY6K, LOC100288181, THEM6, SLURP1, LYPD2, LYNX1, LY6D, GML, CYP11B1, CYP11B2, CDC42P3, LOC100133669, LY6E, C8orf31, LY6H, GPIHBP1, ZFP41, GLI4, MINCR, ZNF696, TOP1MT, RHPN1-AS1, RHPN1, MAFA-AS1, MAFA, ZC3H3, GSDMD, MROH6, NAPRT, EEF1D, TIGD5, PYCRL, TSTA3, ZNF623, ZNF707, BREA2, CCDC166, LOC101928160, MAPK15, FAM83H, MIR4664, FAM83H-AS1, SCRIB, MIR937, PUF60, NRBP2, MIR6845, EPPK1, MIR661, PLEC, PARP10, GRINA, SPATC1, OPLAH, MIR6846, EXOSC4, MIR6847, GPAA1, CYC1, SHARPIN, MAF1, WDR97, HGH1, MROH1, MIR7112, SCX, HGH1, MIR7112, SCX, BOP1, HSF1, MIR6848, DGAT1, SCRT1, TMEM249, FBXL6, SLC52A2, LOC101928902, ADCK5, MIR939, MIR6849, CPSF1, SLC39A4, VPS28, MIR6893, TONSL, TONSL-AS1, CYHR1, KIFC2, FOXH1, PPP1R16A, GPT, MFSD3, RECQL4, LRRC14, LRRC24, C8orf82, ARHGAP39, ZNF251, ZNF34, RPL8, MIR6850, ZNF517, ZNF7, COMMD5, ZNF250, ZNF16, ZNF252P, TMED10P1, ZNF252P-AS1, C8orf33</i>	2M, 3M e 4M

5.3 ANÁLISE DE PODER PREDITIVO

A análise do poder preditivo permite correlacionar aberrações cromossômicas e informações de valores contínuos. O Nexus calcula o valor de p sorteando aleatoriamente os valores contínuos nos dois grupos (com e sem a alteração), formando uma distribuição para determinar quão provável é obter uma estatística semelhante à observada, apenas pelo acaso. Ele tenta capturar qual a eficiência de um evento numa localização em prever o valor contínuo, baseado no fato do evento pertencer ao grupo portador ou ao grupo não portador.

A análise foi realizada considerando os controles como número 0 e os pacientes com números progressivos conforme a gravidade de oligozoospermia: moderados como número 1, graves como número 2 e extremos como número 3.

A LOH da banda p12 do cromossomo 11, também detectada na análise comparativa, foi considerada preditiva de normozoospermia. Outras quatro alterações foram dadas como preditivas de maior gravidade da oligozoospermia: uma perda na banda q31.1 do cromossomo 2 presente nos pacientes 13E, 14E e 15E; uma perda na banda p25.3 do cromossomo 6 presente nos mesmos pacientes; uma LOH na banda q12.1 do cromossomo 11 presente nos pacientes 4M, 6G, 7G, 14E, 15E, 16E e 17E e uma perda na banda q11.2 do cromossomo 15, presente nos pacientes 1M, 10G, 13E, 14E, 17E e 18E.

A Tabela 6 (p. 57) relaciona as regiões compartilhadas entre pacientes ou controles citadas na análise preditiva.

Tabela 6- Caracterização das regiões onde foram detectadas CNVs e LOH, após análise preditiva entre o grupo de pacientes com oligozoospermia e o grupo controle.

Cromossomo	Banda	Região	Tamanho	Evento	Genes	Indivíduos portadores
11	p12	37,293,707- 39,316,590	2.022.883pb	LOH	<i>LOC103312105</i> e <i>LINC01493</i>	C1, C3 e C6
2	q31.1	172,964,936- 172,966,002	1.066pb	Perda	<i>DLX2</i>	13E, 14E e 15E
6	p25.3	1,613,405- 1,620,329	6.924pb	Perda	<i>FOXC1</i>	13E, 14E e 15E
11	q12.1	57,248,004- 57,445,213	197.209pb	LOH	<i>SLC43A1</i> , <i>TIMM10</i> , <i>SMTNL1</i> , <i>UBE2L6</i> , <i>SERPING1</i> , <i>MIR130A</i> , <i>YPEL4</i> , <i>CLP1</i> e <i>ZDHHC5</i>	4M, 6G, 7G, 14E, 15E, 16E e 17E
15	q11.2	22,297,051- 22,451,005	153.954pb	Perda	<i>LOC727924</i> , <i>LOC101927079</i> , <i>OR4M2</i> , <i>OR4N4</i> e <i>OR4N3P</i>	1M, 10G, 13E, 14E, 17E e 18E

O conjunto de alterações selecionadas pela análise preditiva gerou um valor preditivo para a identificação da severidade de oligozoospermia. Através do teste de correlação de Spearman, identificamos que há alta correlação entre o valor preditivo caracterizado e o grau de severidade de oligozoospermia ($p=0.002$).

Através do teste ANOVA *one-way* (Post-hoc Bonferroni), identificamos que o valor preditivo gerado foi capaz de diferenciar unicamente os controles dos pacientes com oligozoospermia ($p<0.0001$). Não identificamos diferenças entre os três níveis de oligozoospermia.

5.4 ANÁLISE COMPARATIVA À LITERATURA

Para análise comparativa dos nossos resultados em relação às alterações de CNVs descritas como relacionadas à oligozoospermia, foi realizada uma busca na literatura a partir do *site PubMed* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed>). Com o filtro para a seleção apenas de publicações relativas à espécie humana, foram utilizadas as seguintes palavras chave, obtendo os respectivos números de resultados:

- *Infertility Array CGH* = 27 resultados (22)
- *Male Infertility Array CGH* = 21 resultados (16)
- *Array cgh oligozoospermia* = 4 resultados
- *Infertility copy number variant* = 45 resultados (29)

Desta forma, retirando os artigos repetidos, foram encontradas 70 publicações de interesse. Destas, 66 foram excluídas por não apresentarem uma amostra bem definida clinicamente, por se referirem a outros tipos de alterações espermáticas, por incluírem pacientes com cromossomopatias, por não utilizarem a técnica de *array-CGH* ou por não descreverem alterações do número de cópias relacionadas ao fenótipo de infertilidade. Nas quatro publicações restantes foram encontradas descrições de alterações no número de cópias de diferentes genes mapeados em bandas e sub-bandas de 12 pares cromossômicos, descritos na Tabela 7 (p. 59 e 60). Foi também realizada uma busca com as mesmas palavras chaves através da página Google acadêmico (<http://scholar.google.com.br/>), onde foi encontrada mais uma publicação relevante, descrevendo CNVs potencialmente relacionadas à infertilidade masculina, também incluídas na Tabela 7 (p. 59 e 60).

Tabela 7- CNVs descritas na literatura como potencialmente relacionadas a alterações na concentração espermática (Continua).

Cromossomo	Banda	Região (Hg19)	Tamanho (kb)	Evento	Genes	Referência	Plataforma
1	p34.3	36,716,865-36,777,255	60,391	Ganho	<i>THRAP3, C1orf113</i>	Stouffs et al., 2012	Agilent 244k
1	p13.3	108,713,464-108,900,204	186,741	Perda	<i>SLC25A24, NBPF4</i>	Stouffs et al., 2012	Agilent 244k
1	p13.2	114,657,656-114,814,238	156,583	Ganho	<i>SYT6</i>	Stouffs et al., 2012	Agilent 244k
2	p25.2	3,062,188-3,325,509	263,322	Ganho	<i>TSSC1</i>	Stouffs et al., 2012	Agilent 244k
2	p22.2	38,085,399-38,180,014	94,616	Perda	<i>FAM82A1</i>	Stouffs et al., 2012	Agilent 244k
3	p11.1	89,394,029-89,416,943	22,915	Perda	<i>EPHA3</i>	Tulttelmann et al., 2011	Agilent 244k e 400k
3	q24	146,114,122-146,191,793	77,672	Ganho	<i>PLSCR2</i>	Stouffs et al., 2012	Agilent 244k
4	q13.2	69,386,856-69,483,419	96,564	Ganho	<i>UGT2B17</i>	Tulttelmann et al., 2011	Agilent 244k e 400k
5	q13.2	69,705,562-70,657,747	952,186	Ganho e Perda	<i>SERF1A, SERF1B, SMN1, SMN2, NAIP, GTF2H2</i>	Stouffs et al., 2012	Agilent 244k
6	p21.31	35,035,137-35,076,232	41,096	Ganho	<i>ANKS1A</i>	Tulttelmann et al., 2011	Agilent 244k e 400k
8	q24.3	144,989,321-145,093,349	104,029	Ganho e Perda	<i>PLEC / PARP10 / GRINA / SPATC1</i>	Tulttelmann et al., 2011	Agilent 244k e 400k
12	q24.31	120,734,605-120,755,841	21,237	Perda	<i>SIRT4</i>	Stouffs et al., 2012	Agilent 244k
15	q15.3	43,888,927-43,950,720	61,794	Ganho	<i>CKMT1B, STRC, CATSPER2</i>	Stouffs et al., 2012	Agilent 244k
16	q22.1	68,385,147-68,410,212	25,066	Ganho	<i>PRMT7, SMPD3</i>	Tulttelmann et al., 2011	Agilent 244k e 400k
16	q22.3	74,375,794-74,455,311	79,518	Perda	<i>CLEC18B</i>	Stouffs et al., 2012	Agilent 244k
17	p11.2	21,370,330-21,501,929	131,600	Ganho e Perda	<i>C17orf51</i>	Stouffs et al., 2012	Agilent 244k
17	q12	38,024,455-38,034,149	9,695	Ganho	<i>ZPBP2</i>	Damyanova et al., 2014	Cytochip BlueGnome
X	p22.33	1,936,197-1,937,608	1,412	Perda		Krausz et al., 2012; Giacco et al., 2014	Array customizado Agilent 60K
X	p11.4	38,491,339-38,628,897		Ganho	<i>TSPAN7</i>	Tulttelmann et al., 2011	Agilent 244k e 400k

Tabela 7- CNVs descritas na literatura como potencialmente relacionadas a alterações na concentração espermática (Conclusão).

Cromossomo	Banda	Região (Hg19)	Tamanho (kb)	Evento	Genes	Referência	Plataforma
X	p11.23	47,881,447-47,962,572	81,126	Perda	<i>ZNF630, SPACA5, SPACA5b</i>	Krausz et al., 2012 ; Giacco et al., 2014	Array customizado Agilent 60K
X	p11.22	52,049,058-52,053,203	4,146	Perda	<i>MAGED1, SNORA11D, SNORA11E, MAGED4B, MAGED4, XAGE2, XAGE2B, XAGE1B, XAGE1A, XAGE1D, XAGE1C, XAGE1E</i>	Krausz et al., 2012 ; Giacco et al., 2014	Array customizado Agilent 60K
X	p11.22	52,640,964-52,961,414	320,451	Ganho	<i>SSX7, SSX2, SPANXN5, XAGE5, XAGE3, FAM156A, FAM156B</i>	Tulttelmann et al., 2011	Agilent 244k e 400k
X	p11.22	52,825,355-52,893,165	67,811	Ganho	<i>SPANXN5, XAGE5, XAGE3</i>	Tulttelmann et al., 2011	Agilent 244k e 400k
X	q22.1	102,248,140-102,609,665	361,526	Ganho	<i>BEX1,4 NXF3, BEX4, TCEAL8, TCEAL5, BEX2, TCEAL7</i>	Tulttelmann et al., 2011	Agilent 244k e 400k
X	q22.2	103,179,445-103,303,531	124,089	Ganho	<i>TMSB15B, H2BFXP, H2BFWT, H2BFM</i>	Tulttelmann et al., 2011; Krausz et al., 2012 ; Giacco et al., 2014	Agilent 244k e 400k Array customizado Agilent 60K
X	q22.3	110,351,792-110,373,570	21,779	Ganho	<i>PAK3</i>	Tulttelmann et al., 2011	
X	q28	148,648,557-148,653,973	5,416	Perda	<i>MAGEA9B, SPANXE</i>	Krausz et al., 2012 ; Giacco et al., 2014	Array customizado Agilent 60K
X	q28	154,391,683-154,403,451	11,769	Perda		Krausz et al., 2012 ; Giacco et al., 2014	Array customizado Agilent 60K

OBS* Tulttelmann et al., 2011, Krausz et al., 2012, e Giacco et al., 2014, utilizaram Hg18 como sequência referência e, para padronização da tabela, as regiões citadas por estes autores foram convertidas para Hg19 pela ferramenta *Lift Genome Annotations* do *Genome Browser* (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgLiftOver>).

Foi então realizada uma avaliação dessas regiões em cada amostra, tanto de pacientes com oligozoospermia como dos controles, para detecção de alterações semelhantes. Foi detectada no paciente 1 uma LOH envolvendo toda a região p11.1 citada do cromossomo 3. Outra LOH foi detectada em três pacientes (2M, 3M e 4M) no cromossomo 8 envolvendo a banda q24.3 citada. Esta foi descrita anteriormente na análise comparativa (Figura 11, p. 54). Na região q13.2 do cromossomo 4, onde Tulttelmann e colaboradores (2011) descreveram a detecção de ganho em sua amostra, foram detectadas duas perdas em homozigose nos pacientes 5G e 10G e uma perda de uma única cópia em C2. No paciente 15E, foi detectada uma perda envolvendo grande parte da região descrita como alterada na banda q13.2 do cromossomo 5. A Tabela 8 (p. 62) relaciona os oito pacientes citados e as características das alterações semelhantes descritas na literatura.

Tabela 8- Caracterização das regiões onde foram detectadas CNVs e LOH detectadas em pacientes com oligozoospermia e em controles, que se sobrepõem a regiões citadas na literatura.

Indivíduos portadores	Cromossomo	Banda	Região	Tamanho (Kb)	Evento	Genes
1M	3	p11.2 - q11.1	87,396,342-91,000,000	3.603,658	LOH	<i>HTR1F, CGGBP1, ZNF654, C3orf38, EPHA3</i>
2M, 3M e 4M	8	q24.3	140,565,930-146,364,022	5.798,092	LOH	<i>KCNK9, TRAPPC9, CHRAC1, AGO2, PTK2, DENND3, SLC45A4, LOC105375787, LINC01300, GPR20, PTP4A3, MROH5, MIR1302-7, MIR4539, MIR4472-1, LINC00051, TSNARE1, ADGRB1, ARC, LOC101928087, JRK, PSCA, LY6K, LOC100288181, THEM6, SLURP1, LYPD2, LYNX1, LY6D, GML, CYP11B1, CYP11B2, CDC42P3, LOC100133669, LY6E, C8orf31, LY6H, GPIHBP1, ZFP41, GLI4, MINCR, ZNF696, TOP1MT, RHPN1-AS1, RHPN1, MAFA-AS1, MAFA, ZC3H3, GSDMD, MROH6, NAPRT, EEF1D, TIGD5, PYCRL, TSTA3, ZNF623, ZNF707, BREA2, CCDC166, LOC101928160, MAPK15, FAM83H, MIR4664, FAM83H-AS1, SCRIB, MIR937, PUF60, NRBP2, MIR6845, EPPK1, MIR661, PLEC, PARP10, GRINA, SPATC1, OPLAH, MIR6846, EXOSC4, MIR6847, GPAA1, CYC1, SHARPIN, MAF1, WDR97, HGH1, MROH1, MIR7112, SCX, HGH1, MIR7112, SCX, BOP1, HSF1, MIR6848, DGAT1, SCRT1, TMEM249, FBXL6, SLC52A2, LOC101928902, ADCK5, MIR939, MIR6849, CPSF1, SLC39A4, VPS28, MIR6893, TONSL, TONSL-AS1, CYHR1, KIFC2, FOXH1, PPP1R16A, GPT, MFSD3, RECQL4, LRRC14, LRRC24, C8orf82, ARHGAP39, ZNF251, ZNF34, RPL8, MIR6850, ZNF517, ZNF7, COMMD5, ZNF250, ZNF16, ZNF252P, TMED10P1, ZNF252P-AS1, C8orf33</i>
5G e 10G	4	q13.2	69,334,501-69,509,654	175,153	Perda em homozigose	<i>TMPRSS11E, UGT2B17</i>
C2	4	q13.2	69,271,467-69,509,654	238,187	Perda	<i>TMPRSS11E, UGT2B17</i>
15E	5	q13.2	68,955,639-70,209,873	1.254,234	Perda	<i>GUSBP3, SERF1A, SERF1B, SMN1, SMN2, SMA4, GUSBP3, GTF2H2B, LOC441081, SMA5, GUSBP9, SERF1A, SERF1B</i>

5.5 ANÁLISE INDIVIDUALIZADA DE CADA ALTERAÇÃO

Para a análise completa de todo o genoma dos pacientes, realizamos a análise específica e individual de todas as regiões cromossômicas onde foram encontradas alterações, considerando as alterações exclusivamente detectadas em dois ou mais pacientes ou controles. Esta análise permitiu a identificação de 21 alterações localizadas nos cromossomos 1, 2, 3, 8, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 20, 21, 22 e X, não identificadas nas análises anteriores e exclusivamente encontradas em pacientes com oligozoospermia. Os dados encontram-se descritos na Tabela 9 (p. 64 e 65).

Dentre elas, duas alterações genômicas apresentaram genes com funções relacionadas à espermatogênese: um ganho na banda q21.33 do cromossomo 17 nos pacientes 3M e 4M (Figura 12, p. 66) e uma LOH abrangendo as bandas q13.32 e q13.33 do cromossomo 22 nos pacientes 3M e 17E (Figura 13, p. 67).

Tabela 9- Caracterização das regiões de CNVs e LOH detectadas após análise individualizada de cada alteração presente entre o grupo de pacientes com oligozoospermia e o grupo controle. As regiões citadas foram exclusivamente detectadas em dois ou mais pacientes com oligozoospermia excluindo as regiões já identificadas pelas análises anteriores (Continua).

Cromossomo	Banda	Região	Tamanho (kb)	Evento	Gnes	Pacientes
1	p31.1	71,661,118-74,217,285	2.556,167	LOH	<i>NEGR1, ZRANB2-AS2, LINC01360</i>	6G, 8G e 18E
1	p31.1	79,779,864-80,061,006	281,142	LOH		7G, 10G
2	p11.2	89,172,747-89,346,280	173,533	Ganho		5G, 9G, 15E
2	q24.1-q24.3	159,520,868- 164,209,601	4.688,733	LOH	<i>PKP4, DAPL1, TANC1, WDSUB1, BAZ2B, MARCH7, LY75, CD302, PLA2R1, ITGB6, LOC100505984, RBMS1, TANK, LOC101929512, LOC100996579, PSMD14, AHCTF1P1, SLC4A10, DPP4, LOC101929532, FAP, IFIH1, GCA, KCNH7, LOC101929570</i>	4M, 14E
3	q11.2-q12.2	96,349,310-100,280,144	3.930,834	LOH	<i>EPHA6, ARL6, CRYBG3, MINA, GABRR3, OR5AC2, OR5H1, OR5H14, OR5H15, OR5H6, OR5H2, OR5K4, OR5K3, OR5K1, OR5K2, CLDND1, GPR15, CPOX, ST3GAL6-AS1, ST3GAL6, DCBLD2, COL8A1, MIR548G, CMSS1, TMEM30C, TBC1D23, NIT2, TOMM70A, LNP1, TMEM45A</i>	10G, 12E
8	p11.22	39,240,660-39,393,247	152,587	Perda	<i>ADAM5, ADAM3A</i>	9G, 12E, 18E
8	q11.1-q11.21	46,942,956-51,188,693	4.245,737	LOH	<i>LINC00293, LOC100287846, PRKDC, SPIDR, UBE2V2, LOC101929268, EFCAB1, SNAI2, C8orf22, LOC100507464, SNTG1</i>	2M, 12E, 14E
12	q11-q12	37,964,161-40,422,281	2.458,120	LOH	<i>ALG10B, CPNE8, KIF21A, ABCD2, C12orf40, SLC2A13</i>	4M, 5G
12	q21.1	72,626,010-74,861,632	2.235,622	LOH	<i>TRHDE, LOC101928137, LOC100507377</i>	3M, 9G, 17E
13	q33.1-q33.2	104,709,650-106,581,438	1.871,788	LOH	<i>DAOA, DAOA-AS1, LINC00343</i>	6G, 16E
14	q23.1	59,221,886-61,658,225	2.436,339	LOH	<i>LINC01500, DAAM1, GPR135, L3HYPDH, JKAMP, CCDC175, RTN1, LRRC9, PCNXL4, DHR57, PPM1A, C14orf39, SIX6, SALRNA 1, SIX1, SIX4, MNAT1, TRMT5, SLC38A6</i>	1M, 8G
15	q11.2	21,060,571-21,161,327	100,756	Perda	<i>POTEB3, NF1P2, LINC01193</i>	12E, 14E
16	p11.2-p11.1	34,467,343-34,760,414	293,071	Ganho	<i>LINC01566, FRG2DP, TP53TG3HP</i>	6G, 18E
17	q21.33	48,264,314-48,270,899	6,585	Ganho	<i>COL1A1</i>	3M, 4M

Tabela 9- Caracterização das regiões de CNVs e LOH detectadas após análise individualizada de cada alteração presente entre o grupo de pacientes com oligozoospermia e o grupo controle. As regiões citadas foram exclusivamente detectadas em dois ou mais pacientes com oligozoospermia excluindo as regiões já identificadas pelas análises anteriores (Conclusão).

Cromossomo	Banda	Região	Tamanho (Kb)	Evento	Genes	Pacientes
18	p11.11-p11.21	10,496,275-13,826,369	3.330,094	LOH	<i>NAPG, PIEZO2, LINC01255, GNAL, IMPA2, ANKRD62, C18orf61, CIDEA, TUBB6, AFG3L2, PRELID3A, SPIRE1, PSMG2, CEP76, LOC100996324, PTPN2, SEH1L, CEP192, LDLRAD4, FAM210A, RNMT</i>	3M, 7G
20	q13.32	57,464,481-57,466,984	2,503	Perda	<i>GNAS</i>	3M, 17E
21	q22.3	48,068,564-48,129,895	61,331	Ganho	<i>PRMT2</i>	3M, 17E
22	q11.21	19,766,085-19,784,228	18,143	Ganho	<i>TBX1, GNB1L</i>	1M, 3M, 8G
22	q13.32-q13.33	49,073,169-51,160,665	2.086,896	LOH	<i>FAM19A5, LINC01310, C22orf34, BRD1, ZBED4, ALG12, CRELD2, IL17REL, MLC1, MOV10L1, PANX2, TRABD, SELO, TUBGCP6, HDAC10, MAPK12, MAPK11, PLXNB2, DENND6B, PPP6R2, SBF1, MIOX, LMF2, NCAPH2, KLHDC7B, SYCE3, CHKB, CPT1B, CHKB, CHKB-AS1, MAPK8IP2, ARSA, SHANK3, SBF1, ODF3B</i>	4M, 17E
X	q21.1	77,158,835-77,160,060	1,225	Ganho	<i>COX7B</i>	1M, 3M
X	q22.33	598,566-599-718	1,152	Ganho	<i>SHOX</i>	1M, 3M

Figura 12- Resultado da técnica de *array*-CGH mostrando o ganho detectado na região 17q21.33. Acima o mapeamento do cromossomo 17 e abaixo, as linhas em azul representam a região contendo o ganho detectado em dois pacientes, relacionado ao fenótipo de oligozoospermia pela análise individualizada de cada alteração.

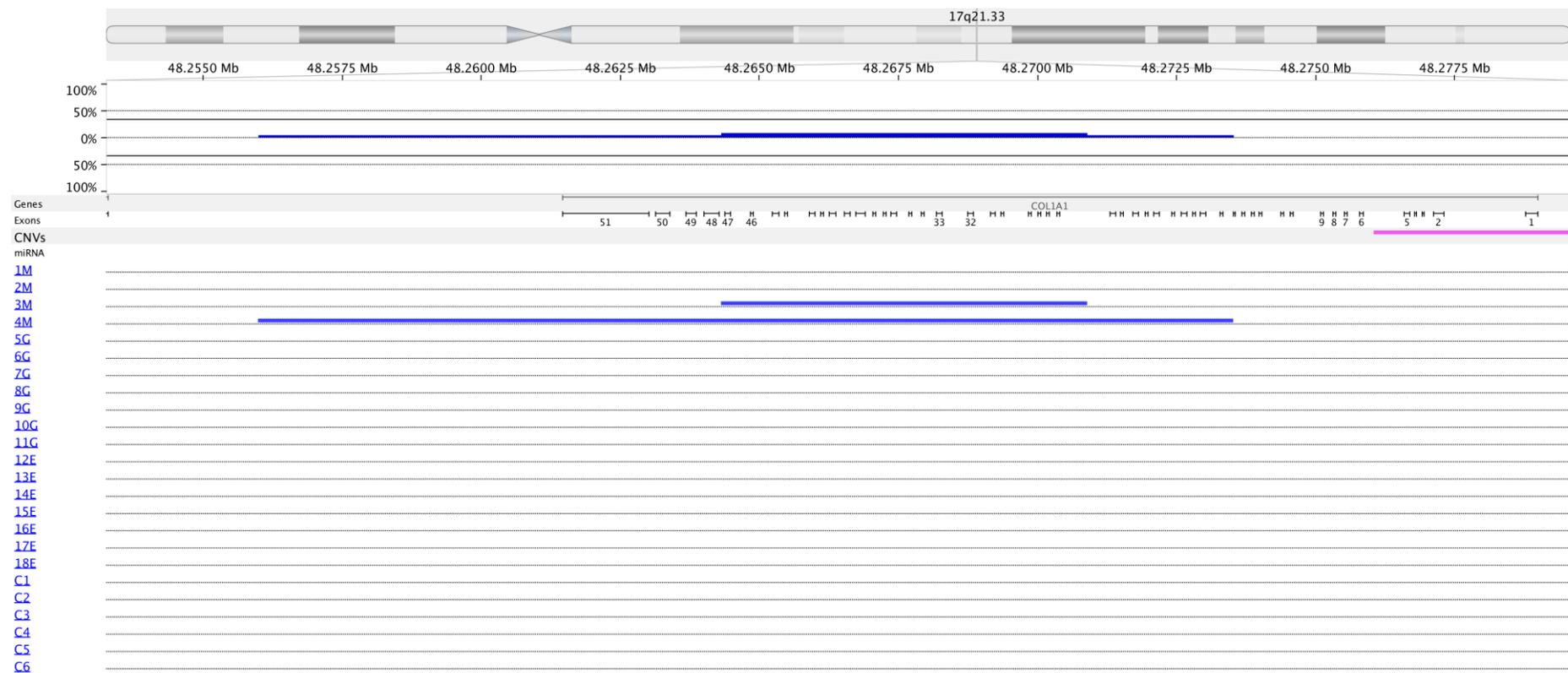
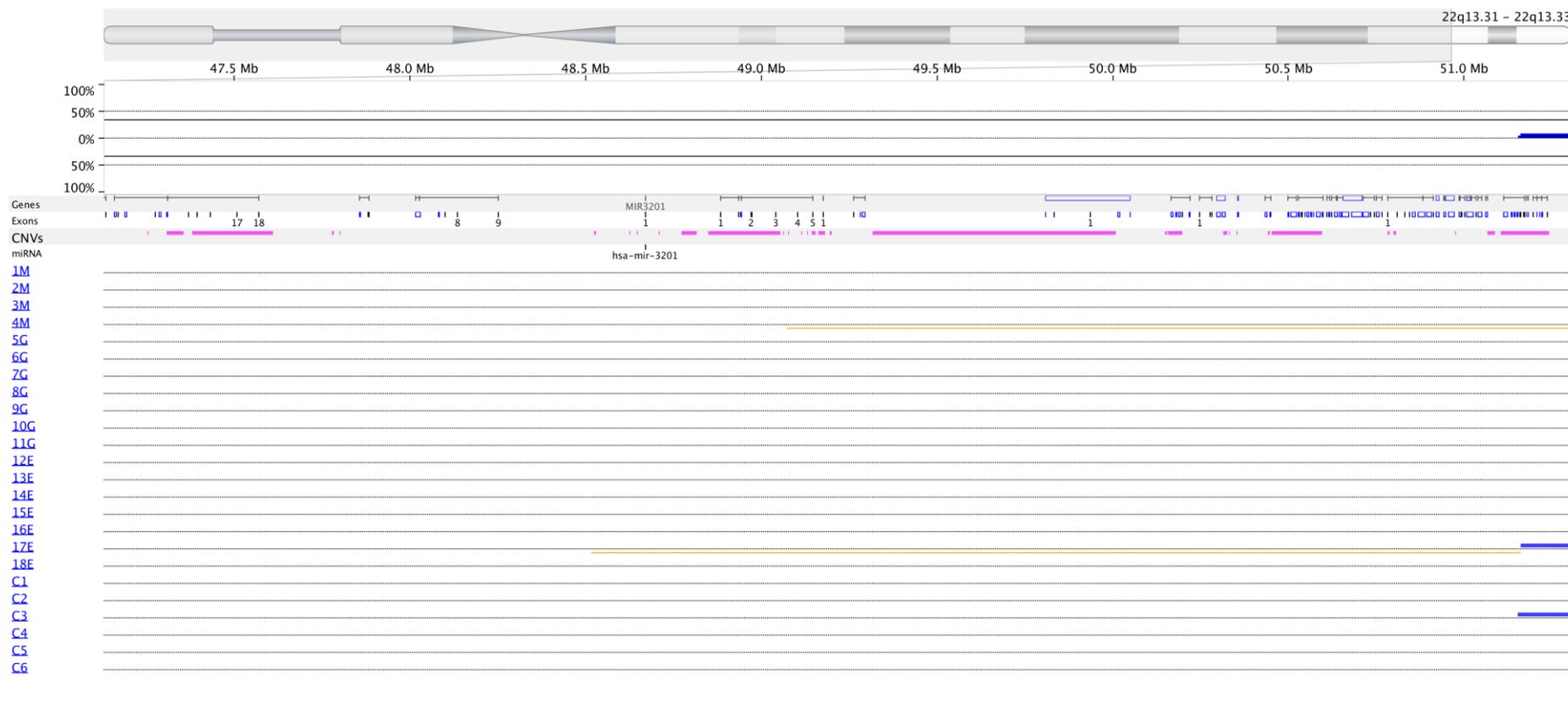


Figura 13- Resultado da técnica de *array*-CGH mostrando a LOH detectada na região 22q13.32-13.33. Acima o mapeamento do cromossomo 22 e abaixo, as linhas em amarelo representam a região contendo a LOH detectada em dois pacientes, relacionado ao fenótipo de oligozoospermia pela análise individualizada de cada alteração.



5.6 ANÁLISE DO CROMOSSOMO Y

Devido à reconhecida importância do cromossomo Y na espermatogênese, todas as alterações detectadas neste cromossomo foram analisadas especificamente. Nove pacientes e quatro controles apresentaram um ganho ou alto ganho entre 11kb e 17kb na sub banda q11.22.3, pertencente a região de AZFc, envolvendo os genes *DAZ1* e *DAZ4*. Diferentemente, os pacientes 8G e 17E, mostraram extensas regiões de ganhos e alto ganhos fragmentados ao longo das sub bandas q11.22.3 e q11.23 envolvendo grande parte da região de AZFc. Nesses pacientes, além das regiões alteradas abrangerem os genes *DAZ1* e *DAZ4*, elas também envolvem os genes *DAZ2*, *DAZ3*, vários genes das famílias *TTY*, *PRY*, *BPY2*, *RBY1*, *CDY* e outros descritos na Tabela 10 (p. 69). O paciente 17E mostrou também um ganho na sub banda q11.22.2, presente na região de AZFb. Já o paciente 5G, apresentou duas deleções na região de AZFc, de 247kb e 286kb, ambas na sub banda q11.22.3, envolvendo os genes *DAZ1*, *DAZ2*, *DAZ3*, *DAZ4*, *TTY3* e *TTY3B*. A Figura 14 (p. 70) mostra as alterações encontradas nos dois grupos da amostra e a Figura 15 (p. 71) especifica a deleção do cromossomo Y detectada no paciente 5G.

Tabela 10- Caracterização das alterações no cromossomo Y detectadas em pacientes com oligozoospermia e em indivíduos controle.

Paciente	Banda	Região	Tamanho (pb)	Evento	Genes
1M, 2M, 3M, 6G, C2 e C5	q11.223	25,292,630-25,308,750	16.121	Alto Ganho	<i>DAZ1, DAZ4</i>
10G, 11G e 18E	q11.223	25,292,630-25,310,391	17.762	Alto ganho	<i>DAZ1, DAZ4</i>
14E e C3	q11.223	25,297,250-25,308,750	11.501	Ganho	<i>DAZ1, DAZ4</i>
16E e C1	q11.223	25,292,630-25,306,798	14.169	Ganho	<i>DAZ1, DAZ4</i>
5G	q11.223	25,207,634-25,455,630	247.997	Perda	<i>DAZ1, DAZ4, DAZ3, DAZ4, DAZ2</i>
	q11.223	25,853,958-26,140,622	286.665	Perda	<i>TTY3B, TTY3</i>
C6	q11.222	20,344,234-20,834,004	489.771	Alto ganho	<i>FAM224A, FAM224B, FAM41AY1, FAM41AY2, HSFY2, HSFY1, TTY9A, TTY9B</i>
8G	q11.223	24,581,268-25,281,926	700.659	Ganho	<i>TTY6B, TTY6, LOC101929148, PRY, PRY2, TTY17A, TTY17B, TTY17C, TTY4B, TTY4C, TTY4, BPY2, BPY2B, BPY2C, DAZ1, DAZ4</i>
	q11.223	25,281,926-25,338,358	56.433	Alto ganho	<i>DAZ1, DAZ4</i>
	q11.223	25,338,358-25,565,607	227.250	Ganho	<i>DAZ1, DAZ4, DAZ3, DAZ4, DAZ2</i>
	q11.223 - q11.23	25,615,281-26,291,625	676.345	Ganho	<i>TTY3B, TTY3, CDY1, CDY1B</i>
17E	q11.23	26,733,724-27,028,530	294.807	Alto ganho	<i>TTY4B, TTY4C, TTY4, BPY2, BPY2B, BPY2C, DAZ3, DAZ4, DAZ3, DAZ4, DAZ2</i>
	q11.222	19,875,066-19,991,795	116.730	Ganho	<i>XKRY, XKRY2, CDY2B, CDY2A</i>
	q11.223	24,037,243-24,226,515	189.273	Ganho	<i>RBMY1D, RBMY1E, RBMY1A1, RBMY1B, RBMY1D, RBMY1E, RBMY1B, PRY, PRY2</i>
	q11.223	24,803,880-25,455,630	651.751	Alto Ganho	<i>TTY17A, TTY17B, TTY17C, TTY4B, TTY4C, TTY4, BPY2, BPY2B, BPY2C, DAZ1, DAZ4, DAZ3, DAZ4, DAZ2</i>
	q11.223 - q11.23	25,615,281-26,291,625	676.345	Alto ganho	<i>TTY3B, TTY3, CDY1, CDY1B</i>
	q11.23	26,335,262-26,425,669	90.408	Ganho	<i>GOLGA2P2Y, GOLGA2P3Y</i>
q11.23	26,485,615-27,028,530	542.916	Ganho	<i>TTY17A, TTY17B, TTY17C, TTY4B, TTY4C, TTY4, BPY2, BPY2B, BPY2C, DAZ3, DAZ4, DAZ3, DAZ4, DAZ2</i>	

Figura 14- Resultado da técnica de *array*-CGH mostrando as CNVs detectadas no cromossomo Y entre os pacientes e indivíduos controle. Acima o mapeamento do cromossomo Y e abaixo, as linhas em azul representam regiões de ganho enquanto linhas em vermelho representam regiões de perdas.



Figura 15- Deleções detectadas no cromossomo Y do paciente 5G pela técnica de *array*-CGH nas regiões chrY:25,207,634-25,455,630 e chrY:25,853,958-26,140,622.



5.7 ANÁLISE DE miRNAs

Foram detectados 12 miRNAs entre cinco regiões de LOH descritas pelas diferentes análises, relacionados na Tabela 11. Estes miRNAs foram inicialmente analisados em conjunto pela ferramenta DIANA-miRPath v3.0 (<http://www.microrna.gr/miRPathv3>), um software *online* dedicado a análise das funções de regulação dos miRNAs e a identificação das vias controladas por eles. Essa ferramenta relaciona os dados da Enciclopédia de Genes e Genoma de Kioto (banco de dados KEGG) à lista de miRNAs de interesse, identificando vias moleculares em que estes miRNAs estão significativamente envolvidos e quantos e quais genes dessa via estão sendo regulados por eles. (VLACHOS et al., 2015). Os resultados obtidos pela ferramenta estão relacionados na Tabela 12 (p. 73).

Tabela 11- Relação dos miRNAs encontrados em 5 regiões de LOH detectadas nos pacientes.

Cromossomo	Região	miRNAs	Pacientes portadores
3	96,349,310-100,280,144	hsa-mir-3921	10G, 12E
8	141,019,815-146,364,022	hsa-mir-1302-7, hsa-mir-4472-1, hsa-mir-4664, hsa-mir-937, hsa-mir-661, hsa-mir-939, hsa-mir-1234	2M, 3M e 4M
14	59,221,886-61,658,225	hsa-mir-5586	1M, 8G
18	10,496,275-13,826,369	hsa-mir-5190, hsa-mir-4526	3M, 7G
22	49,073,169-51,160,665	hsa-mir-3667	4M, 17E

Tabela 12- Resultados da pesquisa de vias relacionadas aos 12 miRNAs detectados em LOHs nos pacientes com oligozoospermia pela ferramenta DIANA-miRPath v3.0.

Vias relacionadas	Valor de p	Genes	miRNAs
Proteoglicanos em câncer	2,37E+06	50	11
Biosíntese de glicoproteínas tipo mucina	0.012393403772	7	5
Via de sinalização reguladora da pluripotência de células-tronco	0.012393403772	36	11
Sinapse glutamatérgica	0.012393403772	32	11
Contração do músculo liso vascular	0.0143845583117	31	10
Sinapse colinérgica	0.020851061072	30	11
Orientação axonal	0.0236584245434	33	10
Meiose em oócitos	0.028034959513	32	10
Sinalização adrenérgica em cardiomiócitos	0.029048539534	34	11
Via de sinalização do estrógeno	0.029048539534	24	12
Via de sinalização Ras	0.0312974770291	54	12
Via de sinalização cGMP-PKG	0.034489943744	44	11
Via de sinalização do cálcio	0.0371174438267	42	10
Potenciação de longa duração	0.0371174438267	21	11
Regulação do citoesqueleto de actina	0.0421164662919	53	10
Sistema de sinalização fosfatidilinositol	0.0430751229384	23	10
Carcinogênese viral	0.0452105564306	43	11
Metabolismo de ácido lipóico	0.0484684867176	2	2
Arrastamento do ciclo circadiano	0.0494778087116	27	10

Após análise em conjunto dos miRNAs, eles foram analisados individualmente através do banco de dados miRBase (<http://www.mirbase.org/>) e miRDB (<http://www.mirdb.org/miRDB/>) para análise dos genes alvos de cada miRNA. Os genes alvos foram então analisados pelo sistema de classificação de genes PANTHER do GeneOntology (<http://pantherdb.org/>) para identificar genes com funções relacionados à espermatogênese. Uma vez listado todos os genes alvos de todos os miRNAs e suas funções, foi realizada uma busca utilizando as palavras: *sperm*, *meiosis* e *reproduction*. Os genes encontrados estão relacionados na Tabela 13 (p. 74).

Tabela 13- Relação de genes regulados pelos miRNAs relacionados à espermatogênese de acordo com o sistema de classificação de genes PANTHER.

miRNA	Genes
hsa-mir-3921	<i>ARID4A, ARNTL, MEA1, NDRG3, TTC26, BCL2L11, MTL5, SPATA9, HCFC1, STK4, WIPF3, ADARB1, STRBP, SEPT4, FAZ, NLRP5, UMODL1, PDS5A</i>
hsa-mir-1302-7	<i>CELF1, TYRO3, NDC1, TMBIM6, MOSPD2, ATRX, FOXA3</i>
hsa-mir-4472-1	<i>GLP1R, CETN2, PRKCA, SLC4A2, PRKACA, M6PR, BCL2L10, CELSR2, CCND2, SPACA4, BCL6, CALR, ATP2B4, TBT, HOXB5, SHISA7, HOXB4, SPATA12, MTMR10, PCYT1B, HOXC5, PAX5, ZFR2, HOXA3, CYP26B1, SPATA31D4, OSBP2, BCL2L1, HOXC8, SCMH1, FAZ, ADAM11</i>
hsa-mir-4664	<i>ATAT1, KIF2A, CNBD2, TMEM119, PRELID1, LMNA, KDM4B, PDX1, CNTD1, SCMH1, SLC2A14, FAZ</i>
hsa-mir-937	
hsa-mir-661	<i>CTSB, DNM2, DNAL1, SGPL1, HOXB3, PHC2, ERCC1, HOXB13, NR2C2, TCP10L, CATSPERG, CHD5, TYRO3, ADARB2, FAM154A, TCP11, CYP26B1, ADARB1, OSBP2, LIN54, SCMH1, IFT81, LIN54</i>
hsa-mir-939	<i>CELF1, PRKACA, NOS2, PHC2, SPATA31C2, TCP11L2, TMEM119, RARA, YBX2, CYP26B1, ADAM23</i>
hsa-mir-1234	
hsa-mir-5586	<i>AK8, NR2C2, PPP1CA</i>
hsa-mir-5190	<i>LZTR1, CELSR2, DAZAP1, KDM5B, DYNC2H1, SOHLH2, PAIP2, MOSPD1, ZFR2, PAFAH1B2, SMARCA4</i>
hsa-mir-4526	<i>FNDC3A, PRKACA, SSR3, JAG2, NR6A1, ACVR2A, SPATA22, SPAG8, HOXC8</i>
hsa-mir-3667	<i>KLHL32, SPO11, HOXD10, MICALCL, MYCBP, CCT6B, PYGO1, KDM5D, PSMD13, TUBGCP4</i>

Discussão

6 DISCUSSÃO

Desde a sua introdução, a tecnologia de *array*-CGH tem proporcionado avanços significativos na identificação e caracterização de genes novos ou conhecidos possivelmente relacionados à infertilidade masculina (HE et al., 2006). Esta técnica demonstra um grande potencial em estabelecer assinaturas moleculares para o diagnóstico da infertilidade e traz a oportunidade de desenvolvimento de terapias gênicas para o problema que acomete atualmente tantos homens na sociedade.

As alterações genômicas mais amplamente relacionadas ao fenótipo de infertilidade são as microdeleções de AZF. As microdeleções em AZFc são as mais frequentes entre pacientes com oligozoospermia, uma vez que microdeleções em AZFa e AZFb são quase exclusivamente detectadas em pacientes com azoospermia (AMBULKAR et al., 2014). A detecção de uma microdeleção de AZFc entre os 38 pacientes iniciais analisados pela técnica de PCR multiplex, indica uma frequência de 2,6% em nossa amostra, sendo concordante com a literatura, que considera frequência de 2 a 10% para pacientes inférteis. Provavelmente a porcentagem está abaixo da descrita para o país (7,7%) por se tratarem apenas de homens com oligozoospermia, não incluindo os azoospermicos, os quais apresentam maiores frequências de microdeleções (KRAUSZ et al., 2014).

A região do fator de azoospermia c (AZFc) é composta de múltiplas repetições de amplicons quase idênticos, o que torna a região extremamente vulnerável a alterações estruturais, devido às frequentes recombinações homólogas não alélicas (NAHR, do inglês *non-allele homologous recombination*). Entre as três regiões de AZF, ela é a que possui as maiores taxas de rearranjos. As pesquisas são concordantes ao relacionarem a deleção completa da região a alterações da espermatogênese, porém bastante controversas em relação às consequências fenotípicas das deleções parciais e das duplicações completas ou parciais.

Alguns trabalhos afirmam que as duplicações de AZFc não representam risco para a fertilidade masculina, uma vez que os mecanismos de regulação da espermatogênese são capazes de compensar, em certo nível, desequilíbrios gerados pelo aumento da dosagem gênica (BOSCH, JOBLING, 2003; SEBAT et al., 2004; GIACHINI et al., 2008). Writzl e colaboradores (2005) encontraram distribuição similar de duplicações parciais de AZFc entre homens férteis e inférteis. Porém, pesquisas

mais recentes associaram essas duplicações a falhas da espermatogênese (LIN et al., 2007; ZHANG et al., 2007; YANG et al., 2015). Os trabalhos sugerem que o aumento do substrato para as NAHR acontecerem pode estar relacionado a uma maior suscetibilidade a rearranjos secundários que interfiram na espermatogênese. A grande divergência da literatura sugere, no entanto, que os efeitos destas alterações possam ser modulados por fatores populacionais, como os diferentes haplogrupos do cromossomo Y (NAVARRO-COSTA et al., 2010; YANG et al., 2015).

Em nosso estudo, a pequena duplicação da região de AZFc, de 11 a 17kb, envolvendo apenas os genes *DAZ1* e *DAZ4*, é evidentemente benigna, uma vez que foi detectado em 9 pacientes e em 4 indivíduos controle, assim como na duplicação da sub banda q11.22.2, encontrada somente no controle C6. As extensas duplicações encontradas nos pacientes 8G e 17E, envolvendo mais de 2Mb, no entanto, foram exclusivamente encontradas em pacientes e podem estar envolvidas com o fenótipo de oligozoospermia. Entre os genes presentes nas regiões duplicadas de ambos os pacientes estão todas as cópias dos genes *DAZ* (*DAZ1*, *DAZ2*, *DAZ3* e *DAZ4*), *PRY* (*PRY* e *PRY2*), *BPY2* (*BPY2*, *BPY2B* e *BPY2C*) e *CDY1* (*CDY1* e *CDY1B*). Estes genes não foram ainda muito estudados e suas funções não estão totalmente esclarecidas, porém todos eles são exclusivamente expressos em testículos e, possivelmente, estão relacionados a espermatogênese (STOUFFS et al., 2001; ALECHINE, CORACH, 2014). Lu e colaboradores (2014) detectaram duplicações do gene *DAZ* e do gene *BPY2* com maior frequência entre pacientes inférteis quando comparada ao grupo controle. Noordam e colaboradores (2011) também demonstraram a desvantagem da super dosagem do gene *DAZ* ao relacionar duplicações em AZFc que resultavam em 8 cópias dos genes *DAZ* com alterações severas na espermatogênese.

Além do possível efeito da dosagem gênica, as duplicações ou deleções presentes nos pacientes podem causar maior instabilidade cromossômica. A proporção de células germinativas portadoras da deleção parcial de AZFc presente no indivíduo, pode comprometer a eficiência da espermatogênese, além de torná-las mais suscetíveis a apresentarem deleções completas da mesma ou de outras regiões de AZF (YANG et al., 2015).

As microdeleções parciais de AZFc mais comuns envolvem duas cópias dos genes *DAZ* e uma ou duas cópias dos genes *CDY1* e *BPY2*. Sen e colaboradores (2015) relacionaram a perda de ambos os genes *DAZ* e *CDY1* como fatores de risco

para alterações na espermatogênese, mas não a perda somente dos genes *DAZ*. Não encontramos na literatura relato de pacientes com deleções parciais de AZFc que envolvam as quatro cópias do gene, como detectado no paciente 5G. Possivelmente o envolvimento de todas as cópias seja mais grave do que a perda de apenas duas, mesmo que relacionado a perda de outros genes, uma vez que microdeleções parciais de AZFc são algumas vezes detectadas em indivíduos férteis na mesma proporção do que em indivíduos inférteis.

Regiões cromossômicas compostas por sequências repetitivas como as regiões centroméricas, o DNA satélite e o cromossomo Y, possuem baixa ou nenhuma cobertura de sondas pelas plataformas de *array*-CGH. Por isso a determinação dos pontos de quebra e extensão das alterações no cromossomo Y detectadas pela técnica pode não ser precisa. A validação das alterações por técnicas de maior resolução é considerada necessária para uma melhor correlação genótipo-fenótipo.

Embora o cromossomo Y, até então, seja mais amplamente estudado, devido à alta incidência de microdeleções envolvidas com o fenótipo de infertilidade masculina, muitos genes prevalentemente ou exclusivamente expressos no testículo e grandes candidatos envolvidos no fenótipo de infertilidade estão mapeados em cromossomos autossômicos (Tuttelmann et al., 2011).

Dentre as alterações detectadas nesta pesquisa em cromossomos autossômicos está a LOH na banda p12 do cromossomo 11 detectada em três controles e nenhum paciente. Essa região apresenta dois genes não caracterizados: o *LOC103312105*, que transcreve um RNA longo não codificador, e o *LINC01493*, que codifica um RNA intergênico longo não codificador. Nenhum desses genes se sobrepõe a regiões de CNV descritas no mapa de estringência da base de dados de variantes normais DGV (*Database of Genomic Variants*) (<http://dgv.tcag.ca/dgv/app/downloads?ref=GRCh37/hg19>). Este mapa lista apenas as variações no número de cópias detectadas em dois ou mais indivíduos aparentemente saudáveis por dois ou mais estudos, a fim de eliminar resultados falsos positivos. Neste nível de estringência, a contribuição das CNVs no genoma é de 4,8%.

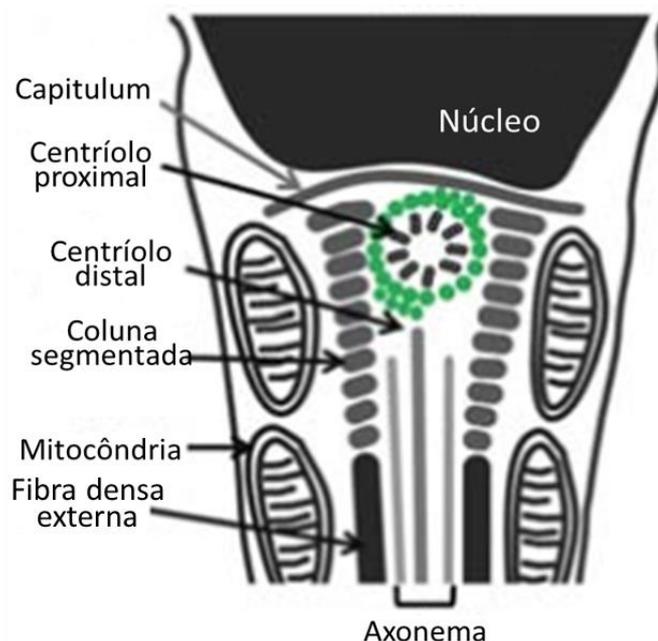
RNAs longos não codificadores (lncRNAs, do inglês *long noncoding RNAs*) estão sendo reconhecidos como importantes reguladores de diversas funções biológicas. Métodos genéticos e bioquímicos têm sido aplicados na investigação dos lncRNAs, porém muitos estudos ainda são necessários para desvendarmos seus mecanismos de ação (LEONE, SANTORO, 2016). A função dos dois lncRNAs

presentes na região descrita nas análises comparativas e preditivas não foram descritas ainda, mas a presença de uma LOH unicamente em controles sugere que o genótipo homocigoto possa conferir aos portadores alguma vantagem reprodutiva em relação ao genótipo heterocigoto.

Outra alteração em cromossomo autossômico foi a LOH na banda q24.3 do cromossomo 8 presente em três pacientes com oligozoospermia moderados (2M, 3M e 4M). Ela foi detectada pela análise comparativa e também pela análise comparada à literatura, o que reforça a sua possível relevância para o fenótipo. Tuttelmann e colaboradores (2011) detectaram um ganho e uma deleção nessa região em dois pacientes com aplasia das células germinativas (ou SCOS, do inglês *Sertoli Cell-Only Syndrome*) e sugeriram que o gene envolvido com o fenótipo seja o gene *PLEC* (não pertencente a regiões de CNV descritas no DGV). Este gene transcreve a proteína plectina que interliga filamentos intermediários com microtúbulos e microfilamentos e ancoram filamentos intermediários aos desmossomos ou hemidesmossomos. Guttman e colaboradores (1999) identificaram a presença de plectina nas junções intercelulares e na superfície nuclear de células de Sertoli em ratos. Porém, apesar de extensa literatura, não há trabalhos correlacionando este gene à espermatogênese em humanos.

Dentre os demais genes envolvidos na LOH, e também presente na região alterada detectada por Tuttelmann e colaboradores (2011), está o gene *SPATC1* (*spermatogenesis and centriole associated 1*). Este gene codifica a proteína esperiolina, expressa somente em testículos e associada ao centríolo do espermatozoide humano (Figura 16, p. 80). A integridade desta estrutura é considerada crítica para o sucesso da fertilização e do desenvolvimento embrionário em humanos. Espermatozoides em que não foi detectada a presença da esperiolina geralmente possuem morfologia anormal (GOTO et al., 2010). Apesar do gene *SPATC1* estar sobreposto a uma região de perda descrita no DGV, não podemos descartar a possibilidade dos pacientes apresentarem mutações neste gene, uma vez que a literatura descreve a relação do mesmo com o sucesso da reprodução em humanos.

Figura 16- Representação esquemática da localização celular da esperiolina (verde) no espermatozoide humano (adaptado e traduzido de Goto et al., 2010).



A presença da LOH do cromossomo 8 em três pacientes e a ausência da mesma em qualquer indivíduo controle sugere que a homozigose da região alterada possa estar influenciando negativamente a concentração espermática dos portadores. Uma possibilidade é a homozigose estar revelando uma mutação deletéria em algum(ns) dos genes envolvidos. Sugerimos os genes *PLEC* e *SPATC1* como genes candidatos a apresentarem alterações. Estudos de sequenciamento e expressão destes genes se fazem necessários para confirmar ou excluir nossa hipótese.

Outra alteração que podemos destacar foi o ganho na região q21.33 do cromossomo 17 detectado pela análise individualizada dos pacientes 3M e 4M. Essa região envolve parte do gene *COL1A1* (*Collagen type I alpha 1*). Este gene codifica uma das subunidades do colágeno tipo 1 que pertence à família das proteínas da matriz extracelular, que são essenciais para a proliferação e diferenciação celular. Chen e colaboradores (2012) fizeram um estudo com camundongos nocauteados para o gene *COL1A1* e sugeriram que seu silenciamento poderia reprimir a auto-renovação das espermatogônias, promovendo sua diferenciação. A espermatogênese é um processo pelo qual as células-tronco germinativas sofrem auto-renovação e se diferenciam em espermatozoides. O balanço entre a auto-renovação e a diferenciação deve ser rigidamente controlado a fim de manter a homeostase no epitélio seminífero normal. Uma maior diferenciação do que auto-renovação pode resultar em um epitélio

com apenas células de sertoli, enquanto o contrário pode resultar em um epitélio apenas com células-tronco germinativas, o que poderia gerar o surgimento de tumores. Os autores sugeriram que o gene *COL1A1* estivesse envolvido no mecanismo de controle desta homeostase. Em nossa amostra, os ganhos encontrados nessa região podem estar gerando uma super expressão do gene *COL1A1*. Porém, as alterações abrangem apenas parte do gene *COL1A1*, e não toda sua extensão, sendo possível que sua expressão esteja diminuída por uma disrupção gênica. Estudos de expressão gênica podem elucidar o efeito dessas alterações em relação à atividade do gene.

Outra alteração importante foi a LOH presente na região q13.32-q13.33 do cromossomo 22 dos pacientes 4M e 17E. Dos 36 genes presentes na região, quatro deles podem ser relacionados à correta produção espermática: *MOV10L1*, *SYCE3*, *SBF1* e *ODF3B*.

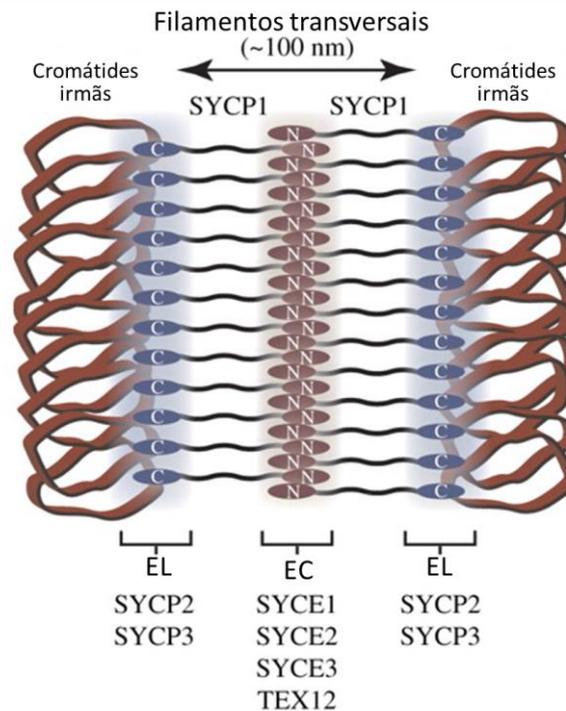
O gene *MOV10L1* (*Moloney leukemia virus 10-like 1*) é exclusivamente expresso em testículos e é uma RNA helicase essencial para a repressão dos retrotransposons pelos RNAs de interação com Piwi (piRNA, do inglês Piwi interacting RNA). Aproximadamente 45% do genoma de mamíferos contêm elementos transponíveis e a maioria deles são os retrotransposons. Embora eles tenham um importante papel na diversidade transcricional, eles também são potencialmente uma ameaça à integridade genômica. A literatura mostra que os genes piwi (*P-element-induced wimpy testes*) são críticos para a manutenção das células-tronco germinativas. Os piRNAs são um grupo de pequenos RNAs não codificadores, abundantemente expressos nas gônadas de diversos animais, que participam do mecanismo de defesa contra elementos transponíveis através do silenciamento da expressão gênica. Estudos em animais portadores de deleções em genes associados à via dos piRNAs mostraram que alterações na expressão de um ou mais destes genes resulta em infertilidade (ZHU et al., 2015).

Hadziselimovic e colaboradores (2011) descreveram alterações na expressão dos genes *DDX4*, *MAEL*, *MOV10L1*, *PIWIL2*, *PIWIL4* e *TDRD9* em pacientes com criptorquidia e alto risco de azoospermia. Os autores sugeriram que a instabilidade gênica induzida pela expressão deficiente de genes envolvidos no silenciamento de transposons contribuiria para o desenvolvimento de azoospermia nestes pacientes. Sarkardeh e colaboradores (2014) também encontraram associação de polimorfismos no gene *MOV10L1* com a completa parada da maturação germinativa em humanos.

Zheng e colaboradores (2010) detectaram um grande aumento de transcritos de retrotransposons em testículos de camundongos *Mov10l1^{-/-}*. Interessantemente, Bao e colaboradores (2013) detectaram que camundongos com nocaute incompleto (70% de inativação) do gene *MOV10L1*, apresentaram um fenótipo menos severo em relação ao grupo completamente nocauteado (100% de inativação). Apesar da diminuição drástica da concentração em relação ao grupo controle, os autores identificaram a presença tanto de espermatozoides normais como morfologicamente alterados. Em nosso trabalho, os portadores da LOH na região deste gene podem apresentar uma mutação em homozigose que gere uma proteína parcialmente funcional, uma vez que provavelmente eles seriam azoospermicos caso não houvesse a produção da proteína ou se ela fosse completamente disfuncional. O gene *MOV10L1* também se encontra em região de sobreposição a uma perda descrita no DGV, porém, da mesma forma, não podemos descartar a possibilidade dos pacientes apresentarem mutações neste gene, pois existem trabalhos sugerindo correlação entre mutações no mesmo e alterações na produção espermática (ZHENG et al., 2010; HADZISELIMOVIC et al., 2011; SARKARDEH et al., 2014).

O gene *SYCE3* (*Synaptonemal Complex Central Element 3*) faz parte da estrutura de fibras do elemento central do complexo sinaptonêmico. O complexo sinaptonêmico é uma estrutura proteica complexa que une os cromossomos homólogos durante a meiose I e permite a recombinação cromossômica e a formação dos quiasmas. Sua estrutura é composta por um elemento central flanqueado por dois elementos laterais. Os elementos centrais mantêm as cromátides irmãs unidas e os cromossomos homólogos se interconectam ao longo de toda sua extensão por filamentos transversais – estruturas que abrangem a região central do complexo sinaptonêmico, formando uma estrutura tipo zíper ou escada (Figura 17, p.83) (HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ et al., 2016).

Figura 17- Representação esquemática do complexo sinaptonêmico. As moléculas de SYCP1 se orientam com a porção N-terminal voltada para o elemento central e a porção C-terminal para os elementos laterais. EL- elemento lateral. EC- elemento central. (Adaptado e traduzido de Davies et al., 2012).



Estudos com camundongos nocauteados para o gene *SYCE3* e *SYCE1* mostraram que a interação entre as porções N-terminais de *SYCP1* não são suficientes para que as sinapses ocorram (BOLCUN-FILAS et al., 2009; SCHRAMM et al., 2011). Schramm e colaboradores (2011) demonstraram que a perda de *SYCE3* bloqueia o início da sinapse o que resulta em interrupção da meiose, sendo assim, essencial para a fertilidade em ambos os sexos. Não existem estudos em humanos que analisem a consequência de alterações neste gene, porém mutações deletérias em homozigose podem estar relacionadas à alteração da meiose.

O gene *SBF1* (*SET-binding fator 1*) é membro de uma família de pseudofosfatase. Pseudofosfatases possuem sequencias similares às fosfatases, mas com alterações em aminoácidos que fazem com que elas percam sua atividade catalítica. Acredita-se que ela aja como uma “antifosfatase”, sequestrando os alvos de fosfatases ativas e tendo, assim, um papel importante na homeostase celular (KUZMIN et al., 2009). Firestein e colaboradores (2002) identificaram, em camundongos, que o gene *SBF1* apresenta altos níveis de expressão nos túbulos seminíferos, especificamente em células de Sertoli, espermatogônias e espermatozoides em paquíteno, mas não em espermátides pós meióticas.

Camundongos nocauteados para o gene *SBF1* apresentaram azoospermia. Os autores sugeriram papel importante do gene na sinalização da diferenciação das células germinativas diploides para haploides na espermatogênese.

Em humanos, mutações em homozigose no gene *SBF1* já foram associadas à síndrome de Charcot-Marie-Tooth, enquanto mutações heterozigotas foram detectadas em indivíduos apenas com perda progressiva de células germinativas durante a puberdade, vacuolização das células de Sertoli e azoospermia (LIŠKA et al., 2016). Kuzmin e colaboradores (2009) detectaram oito novos SNPs diferentes, em heterozigose, ao longo do gene *SBF1*, sete em azoospérmicos e outro em um indivíduo controle. Os autores sugeriram que o gene seja predisposto a mutações. Dificilmente, porém, este gene apresentará mutações deletérias em homozigose em nossos pacientes, uma vez que eles não apresentam sinais da síndrome de Charcot-Marie-Tooth. Mutações em homozigose relacionadas a um fenótipo mais brando, com perda de função parcial da proteína, não foram descritas na literatura, mas não podemos excluir a possibilidade.

Por fim, o gene *ODF3B* (*outer dense fiber of sperm tails 3B*) pertence à família das fibras densas externas que fazem parte da estrutura da cauda do espermatozoide (Figura 16, p.80). A fibra densa externa é composta por pelo menos 14 polipeptídeos, dentre os quais poucos foram identificados devido à dificuldade de isolamento das proteínas componentes (PETERSEN et al., 2002). O gene *ODF3B* não foi ainda caracterizado e não existem trabalhos que o relacionem com alterações na fertilidade masculina, porém é um gene potencialmente envolvido com a motilidade espermática. O paciente 17E, portador da LOH envolvendo este gene, apresenta espermatozoides completamente imóveis, porém o paciente 4M apresenta motilidade espermática total normal, enfraquecendo a possibilidade deste gene estar relacionado ao fenótipo dos pacientes.

Dentre todas as demais regiões selecionadas pelas diferentes análises, aquelas com sobreposição ao DGV são menos prováveis de estarem envolvidas com o fenótipo dos pacientes. As deleções que apresentaram sobreposição a regiões de ganho citadas no DGV são mais prováveis de estarem envolvidas do que as regiões de ganhos sobrepostas a regiões de perdas no banco de dados. Isso porque as perdas de material genético são, geralmente, mais relacionadas a efeito deletério do que ganhos (YEO et al., 2011).

Através da pesquisa dos genes alvos dos miRNAs encontrados em algumas regiões de LOH podemos perceber que, apesar de não ter sido apontado com relevância estatística pelo DIANA-miRPath, 10 dos 12 miRNAs regulam a expressão de variados genes com funções relacionadas à espermatogênese. Assim como os genes presentes em regiões de LOH, as sequências codificadoras dos miRNAs podem apresentar mutações deletérias em homozigose que alterem o seu mecanismo ação. Desta forma, o estudo da expressão e funcionalidade desses miRNAs poderá ser informativo.

O presente trabalho não detectou nenhuma alteração comum a todos os pacientes e sim várias alterações compartilhadas entre alguns membros do grupo amostral ou do grupo controle, corroborando com o conceito da etiologia poligênica da infertilidade. Foram descritas as regiões de CNVs e LOH possivelmente relacionadas ao fenótipo de oligozoospermia, discutindo os genes com funções relacionadas a produção espermática presentes em algumas dessas regiões. Não podemos excluir a influência de alterações em regiões que não possuem genes ou seus genes não possuem relação direta com a infertilidade. Regiões sem informação genética conhecida podem ser importantes regiões de regulação de expressão gênica ainda não descritas, assim como genes com funções diversas podem ter efeitos secundários sob a espermatogênese ainda não reconhecidos. Além disso, mesmo que as alterações cromossômicas não afetem a expressão gênica, um aumento da distribuição específica dessas alterações pode resultar em recombinações incorretas e conseqüentemente em defeitos da espermatogênese (TUTTELMANN et al., 2011).

Para confirmar ou descartar a relação dos genes e miRNAs relacionados ao fenótipo dos pacientes, a utilização de técnicas como a de sequenciamento e estudo da expressão gênica tornam-se necessárias.

Conclusões

7 CONCLUSÕES

- (1) Detectamos alterações em número de cópias (CNVs) e perdas de heterozigosidade (LOHs) tanto no grupo amostral composto por homens inférteis, com oligozoospermia, como no grupo controle, composto por homens férteis.
- (2) A comparação entre os resultados obtidos nos dois grupos permitiu a identificação de várias alterações compartilhadas entre pacientes e indivíduos controles, corroborando com o conceito da característica poligênica da infertilidade.
- (3) Um ganho na região de AZFc envolvendo os genes *DAZ1* e *DAZ4* foi detectado em nove pacientes com oligozoospermia e em quatro indivíduos controles, sendo classificado como uma alteração benigna. Alterações possivelmente patogênicas encontradas na região de AZFc incluíram extensas duplicações detectadas nos pacientes 8G e 17E e duas deleções presentes no paciente 5G.
- (4) A análise comparativa dos resultados obtidos pela técnica de aCGH detectaram alterações em diferentes regiões genômicas, sendo selecionadas as regiões 8q24.3, 17q21.33 e 22q13.32-13.33.
- (5) Após investigação e análise *in silico* das regiões genômicas selecionadas, sugerimos que os genes *PLEC*, *SPATC1*, *COL1A1*, *MOV10L1*, *SYCE3* e *ODF3B* possam estar envolvidos com o fenótipo de oligozoospermia.
- (6) Dez dos doze miRNAs presentes em regiões de LOH investigadas têm como alvo genes com funções relacionadas à espermatogênese e reprodução humana, sendo objetos interessantes para estudos posteriores.

Bibliografia

BIBLIOGRAFIA

ALECHINE, E.; CORACH, D.. High-throughput screening for spermatogenesis candidate genes in the AZFc region of the Y chromosome by multiplex real time PCR followed by high resolution melting analysis. **PLoS One**, vol.9, n.5, 2014.

AMBULKAR, P.S.; SIGH, R.; REDDY, M.; VARMA, P.S.; GUPTA, D.O.; SHENDE, M.R.; PAL, A.K.. Genetic risk of azoospermia factor (AZF) microdeletions in idiopathic cases of azoospermia and oligozoospermia in Central India population. **Journal of clinical and diagnostic research**, vol.8, n.3, p.88-91, 2014.

ASTON, K.I.. Genetic susceptibility to male infertility: news from genome-wide association studies. **Andrology**, vol.2, n.3, p.315-321, 2014.

BAO, J.; MA, H.Y.; SCHUSTER, A.; LIN, Y.M.; YAN, W.. Incomplete Cre-mediated excision leads to phenotypic differences between *Stra8-iCre; Mov10l1lox/lox* and *Stra8-iCre; Mov10l1lox/Δ* mice. **Genesis**, vol.51, n.7, p.481-490, 2013.

BASHAMBOO, A.; FERRAZ-DE-SOUZA, B.; LOURENÇO, D.; LIN, L.; MONTJEAN, D.; BIGNON-TOPALOVIC, J.; MANDELBAUM, J.; SIFFROI, J.P.; CHRISTIN-MAITRE, S.; RADHAKRISHNA, U.; ROUBA, H.; RAVEL, C.; SEELER, J.; ACHERMANN, J.C.; MCELREAVEY, K.. Human male infertility associated with mutations in NR5A1 encoding steroidogenic factor 1. **American Journal of Human Genetics**, vol.87, n.4, p.505,512, 2010.

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

BOLCUN-FILAS, E.; HALL, E.; SPEED, R.; TAGGART, M.; GREY, C.; DE MASSY, B.; BENAVENTE, R.; COOKE, H.J.. Mutation of the mouse *Syce1* gene disrupts synapsis and suggests a link between synaptonemal complex structural components and DNA repair. **PLoS Genetics**, vol.5, n.1, 2009.

BORGES, E.Jr.; SETTI, A.S.; BRAGA, D.P.; FIGUEIRA, R. de C.; IACONELLI, A.Jr.. Decline in semen quality among infertile men in Brazil during the past 10 years. **International Brazilian Journal of Urology**, vol.41, n.4, p.757-763, 2015.

BOSCH, E.; JOBLING, M.A.. Duplications of the AZFa region of the human Y chromosome are mediated by homologous recombination between HERVs and are compatible with male fertility. **Human Molecular Genetics**, vol. 12, n.3, p.341-347, 2003.

CARLSEN, E.; GIWERCMAN, A.; KEIDING, N.; SKAKKEBAEK, N.E.. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. **BMJ**, vol.305, n.6854, p.609-613, 1992.

CENTOLA, G.M.. Semen assessment. **The Urologic clinics of North America**, vol.41, n.1, p.163-167,2014.

CHEN, S.H.; LI, D.; XU, C.. Downregulation of Col1a1 induces differentiation in mouse spermatogonia. **Asian Journal of Andrology**, vol.14, n.6, p.842-849, 2012.

CHRISTOFOLINI , D.M.; MAFRA, F.A.; NETO, R.P.; BARROS, R.A.S.; SANTOS, A.A.D. Correlation between Chromosomal Variants and Male Infertility in a Population of Brazilian Infertile Men. **Reproductive Sys Sexual Disorders**, v.1, n. 1, p. 1-6, 2012.

COOPER, T.G.; NOONAN, E.; VON ECKARDSTEIN, S.; AUGER, J.; BAKER, H.W.B.; BEHRE, H.M.; HAUGEN, T.B.; KRUGER, T.; WANG, C.; MBIZVO, M.T.; VOGELSONG, K.M.. World Health Organization reference values for human sêmen characteristics. **Human Reproduction Update**, vol.16, n.3, p.231-245, 2010.

COUTTON, C.; SATRE, V.; ARNOULT, C.; RAY, P.. Genetics of male infertility: the new players. **Médecine Sciences**, vol. 28, n.5, p.497, 502, 2012.

DAM, A.H.; KOSCINSKI, I.; KREMER, J.A.; MOUTOU, C.; JAEGER, A.S.; OUDAKKER, A.R.; TOURNEYE, H.; CHARLET, N.; LAGIER-TOURENNE, C.; VAN BOKHOVEN, H.; VIVILLE, S.. Homozygous mutation in SPATA 16 is associated with male infertility in human globozoospermia. **American Journal of Human Genetics**, vol.81, n.4, p.813-820, 2007.

DAMYANOVA, V.; DIMOVA, I.; SAVOC, A.; NESHEVA, D.; HADJIDEKOVA, S.; RUKOVA, B.; JIVKOVA, R.; NIKOLOVA, V.; VATEC, I.; TONCHEVA, D.. Comprehensive Genomic Study in Patients with Idiopathic Azoospermia and Oligoasthenoteratozoospermia. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, vol. 27, n.1, p.3529-3533, 2014.

DAVIES, O.R.; MAMAN, J.D.; PELLEGRINI, L.. Structural analysis of the human SYCE2-TEX12 complex provides molecular insight into synaptonemal complex assembly. **Open Biology**, vol.2, n.7, 2012.

DE BRAEKELEER, M.; DAO, T.N.. Cytogenetic studies in male infertility: a review. **Human Reproduction**, vol.6, p.245-250, 1991.

DENG, Y.; ZHANG, W.; SU, D.; YANG, Y.; MA, Y.; ZHANG, H.; ZHANG, S.. Some single nucleotide polymorphisms of MSY2 gene might contribute to susceptibility of spermatogenic impairment in idiopathic infertile men. **Urology**, vol.71, n.5, p.878,882, 2008.

DIETERICH, K.; SOTO RIFO, S.R.; FAURE, A.K.; HENNEBICQ, S.; BEN AMAR, B.; ZAHI, M.; PERRIN, J.; MARTINEZ, D.; SÈLE, B.; JOUK, P.S.; AHLMANN, T.; ROUSSEAU, S.; LUNARDI, J.; RAY, P.F.. Homozygous mutation of AURKC yields large-headed polyploidy spermatozoa and causes male infertility. **Nature Genetics**, vol. 39, n.5.; p.661,665, 2007.

D'AMOURS, G.; LANGLOIS, M.; MATHONNET, G.; FETNI, R.; NIZARD, S.; SROUR, M.; TIHY, F.; PHILLIPS, M.S.; MICHAUD, J.L.; LEMYRE, E.. SNP arrays: comparing diagnostic yields for four platforms in children with developmental delay. **BMC Medical Genomics**, vol.7, n.70, 2014.

FANCIULLI, M.; PETRETTO, E.; AITMAN, T.J.. Gene copy number variation and common human disease. **Clinical Genetics**, vol. 77, n.3 , p.201-213, 2010.

FIRESTEIN, R.; NAGY, P.L.; DALY, M.; HUIE, P.; CONTI, M.; CLEARY, M.L.. Male infertility, impaired spermatogenesis, and azoospermia in mice deficient for the pseudophosphatase Sbf1. **The Journal of clinical investigation**, vol.109, n.9, p.1165-1172, 2002.

GALAN, J.J.; BUCH, B.; CRUZ, N.; SEGURA, A.; MARON, F.J.; BASSAS, L.; MARTINEZ-PINEIRO, L.; REAL, L.M.; RUIZ, A.. Multilocus analyses of estrogen-related genes reveal involvement of the ESR1 in male infertility and the polygenic nature of pathology. **Fertility and Sterility**, vol.84, n.4; p.910,918, 2005.

GALAN, J.J.; DE FELICI, M.; BUCH, B.; RIVERO, M.C.; SEGURA, A.; ROYO, J.L.; CRUZ, N.; REAL, L.M.; RUIZ, A.. Association of genetic markers within the KIT and KITLG genes with human male infertility. **Human Reproduction**, vol.21, n.12, p.3185,3192, 2006.

GERSEN, S.L.; KEAGLE, M.B. **The principles of clinical cytogenetics**. Segunda edição. Totowa, New Jersey. Humana Press Inc. 2005.

GIACCO, D. LO.; CHIANESE, C.; ARS, E.; RUIZ-CASTAÑE, E.; FORTI, G.; KRAUSZ, C.. Recurrent X chromosome-linked deletions: discovery of new genetic factors in male infertility. **Journal of Medical Genetics**, v.51, p.340-344, 2014.

GIACHINI, C.; LAFACE, I.; GUARDUCCI, E.; BALERCIA, G.; FORTI, G.; KRAUSZ, C.. Partial AZFc deletions and duplications: clinical correlates in the Italian population. **Human Genetics**, vol.124, n.4, p.399–410, 2008.

GIJSBERS, A.C.J.; SCHOUMANS, J.; RUIVENKAMP, C.A.L.. Interpretation of Array Comparative Genome Hybridization Data: A Major Challenge. **Cytogenetic and Genomic Research**, vol. 135, n.3-4, p.222-227, 2011.

GOTO, M.; O'BRIEN, D.A.; EDDY, E.M.. Speriolin is a novel human and mouse sperm centrosome protein. **Human reproduction**, vol.25, n.8, p.1884-1894, 2010.

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

GUTTMAN, J.A.; MULHOLLAND, D.J.; VOGL, A.W.. Plectin is concentrated at intercellular junctions and at the nuclear surface in morphological differentiated rat Sertoli cells. **The Anatomical record**, vol.254, n.3, p.418-428, 1999.

HADZISELIMOVIC, F.; HADZISELIMOVIC, N.O.; DEMOUGIN, P.; KREY, G.; OAKELEY, E.J.. Deficient expression of genes involved in the endogenous defense system against transposons in cryptorchid boys with impaired mini-puberty. **Sexual Development**, vol.5, n.6, p.287-293, 2011.

HE, Z.; CHAN, W.Y.; DYM, M.. Microarray technology offers a novel tool for the diagnosis and identification of therapeutic targets for male infertility. **Reproduction**, vol.132, n.1, p.1-9, 2006.

HERNÁNDEZ-HERNÁNDEZ, A.; MASICH, S.; FUKUDA, T.; KOUZNETSOVA, A.; SANDIN, S.; DANEHOLT, B.; HÖÖG, C.. The central element of the synaptonemal complex in mice is organized as a bilayered junction structure. **Journal of cell science**, vol.129, n.11, p.2239-2249, 2016.

JAROW, J.; SIGMAN, M.; KOLETTIS, P.N.; LIPSHULTZ, L.R.; MCCLURE, R.D.; NANJIA, A.K.; NAUGHTON, C.K.; PRINS, G.S.; SANDLOW, J.I.; SCHLEGEL, P.N.. In: **The Optimal Evaluation of the Infertile Male: AUA Best Practice Statement**, American Urological Association, 2010.

KOH, K.N.; LEE, J.O.; SEO, E.J.; LEE, S.W.; SUH, J.K.; IM, H.J.; SEO, J.J.. Clinical significance of previously cryptic copy number alterations and loss of heterozygosity in pediatric acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome determined using combined array comparative genomic hybridization plus single-nucleotide polymorphism microarray analyses. **Journal of Korean medical science**, vol.29, n.7, p.926-933, 2014.

KOMURA, D.; MACDONALD, J.R.; MARSHALL, C.R.; MEI, R.; MONTGOMERY, L.; NISHIMURA, K.; OKAMURA, K.; SHEN, F.; SOMERVILLE, M.J.; TCHINDA, J.; VALSESIA, A.; WOODWARK, C.; YANG, F.; ZHANG, J.; ZERJAL, T.; ZHANG, J.; ARMENGOL, L.; CONRAD, D.F.; ESTIVILL, X.; TYLER-SMITH, C.; CARTER, N.P.; ABURATANI, H.; LEE, C.; JONES, K.W.; SCHERER, S.W.; HURLES, M.E.. Global variation in copy number in the human genome. **Nature**, vol. 444, n.23, p.444-454, 2006.

KRAUSZ, C.; GIACHINI, C.; LO GIACCO, D.; DAGUIN, F.; CHIANESE, C.; ARS, E.; RUIZ-CASTANE, E.; FORTI, G.; ROSSI, E.. High resolution X chromosome-specific Array-CGH detects new CNVs in Infertile males. **Plos one**, vol.7, n.10, e44887, 2012.

KRAUSZ, C.; CHIANESE, C.. Genetic testing and counselling for male infertility. **Current opinion in endocrinology, diabetes, and obesity**, vol. 21, n.3, p.244-250, 2014.

KRAUSZ, C.; HOEFSLOOT, L.; SIMONI, M.; TUTTELMANN, F.. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. **Andrology**, vol.2, p.5-19, 2014.

KUMAR, N.; SINGH, A.K.. Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. **Journal of Human Reproduction**, vol. 8, n.4, p.191-196, 2015.

KUZMIN, A.; JARVI, K.; LO, K.; SPENCER, L.; CHOW, G.Y.; MACLEOD, G.; WANG, Q.; VARMUZA, S.. Identification of Potentially Damaging Amino Acid Substitutions Leading to Human Male Infertility. **Biology of reproduction**, vol.81, n.2, p.319-326, 2009.

LACERDA, J. I.; DEL GUIUDICE, P. T.; SILVA, B. F.; NICHI, M.; FARIELLO, R.M.; FRAIETTA, R.; RESTELI, A. E.; BLUMER, C. G.; BERTOLLA, R. P.; CEDENHO, A. P. Adolescent varicocele: improved sperm function after varicocelectomy. **Fertility and Sterility**, vol. 95, n.3, p. 994–999, 2011.

LAI, Y.C.; W, W.C.; YANG, J.J.; LI, S.Y.. Expansion of CAG repeats in the spinocerebellar ataxia type 1 (SCAN1) gene in idiopathic oligozoospermia patients. **Journal of assisted reproduction and genetics**, vol. 26, n.5, p.257,261, 2009.

LEONE, S.; SANTORO, R.. Challenges in the analysis of long noncoding RNA functionality. **FEBS letters**, (No prelo) 2016.

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

LIN, Y.W.; HSU, L.C.; KUO, P.L.; HUANG, W.J.; CHIANG, H.S.; YEH, S.D.; HSU, T.Y.; YU, Y.H.; HSIAO, K.N.; CANTOR, R.M.; YEN, P.H.. Partial duplication at AZFc on the Y chromosome is a risk factor for impaired spermatogenesis in Han Chinese in Taiwan. **Human Mutation**, vol.28, n.5, p.486–494, 2007.

LIŠKA, F.; CHYLÍKOVÁ, B.; JANKŮ, M.; ŠEDA, O.; VERNEROVÁ, Z.; PRAVENEK, M.; KŘEN, V.. Splicing mutation in *Sbf1* causes nonsyndromic male infertility in the rat. **Reproduction**, vol.152, n.3, p.215-223, 2016.

LISSITSINA, J; MIKELSAAR, R; VARB, K; PUNAB, M. Cytogenetic study in infertile men. **Systems Biology in Reproductive Medicine**, v. 52, n. 2, p. 91-95, 2003.

LIU, G.; SHI, Q.W.; LU, G.X.. A newly discovered mutation in PICK1 in a human with globozoospermia. **Asian Journal of Andrology**, vol.12, n.4, p.556-560, 2010.

MARSHBURSN, P.B.. Counseling and diagnostic evaluation for the infertile couple. **Reproductive endocrinology**, vol. 42, n.1, p.1-14, 2015.

MASSART, A.; LISSENS, W.; TOURNAYE, H.; STOUFFS, K.. Genetic causes of spermatogenic failure. **Asian Journal of Andrology**, vol.14, p.40-48, 2012.

MERZENICH, H.; ZEEB, H.; BLETTNER, M.. Decreasing sperm quality: a global problem? **BMC Public Health**, vol.10, n.24, 2010.

MCLACHLAN, R.I.; O'BRYAN.. State of the art for genetic testing of infertile men. **The journal of clinical endocrinology and metabolism**, vol.95, n.3, p.1013-1024, 2010.

MCLACHLAN, R.I.. Approach to the patient with oligozoospermia. **The journal of clinical endocrinology and metabolism**, vol.93, n.3, p.873-880, 2013.

MIHARU, N.. Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: oligozoospermia. **Cytogenetic and genome research**, vol.111, n.3-4, p.347-351, 2005.

MIYAMOTO, T.; MINASE, G.; OKABE, K.; UEDA, H.; SENGOKU, K.. Male infertility and its genetic causes. **Obstetrics and Gynaecology Research**, vol. 41, n.10, p.1501-1505, 2015.

MONTJEAN, D.; DE LA GRANGE, P.; GENTIEN, D.; RAPINAT, A.; BELLOC, S.; COHEN-BACRIE, P.; MENEZO, Y.; BENKHALIFA, M.. Sperm transcriptome profiling in oligozoospermia. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, vol.29, p.3-10, 2012.

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

NAVARRO-COSTA, P.; GONÇALVES, J.; PLANCHA, C.E.. The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility. **Human Reproduction updates**, vol.16, n.5, p.525-542, 2010.

NETO, F.T.; BACH, P.V.; NAJARI, B.B.; LI, P.S.; GOLDSTEIN, M.. Spermatogenesis in human and its affecting factors. **Seminars in cell and developmental biology**, (no prelo) 2016.

NOORDAM, M.J.; WESTERVELD, G.H.; HOVINGH, S.E.; VAN DAALLEN, S.K.; KORVER, C.M.; VAN DER VEEN F.; VAN PELT, A.M.; REPPING, S.. Gene copy number reduction in the azoospermia factor c (AZFc) region and its effect on total motile sperm count. **Human Molecular Genetics**, vol.20, n.12, p.2457-2463, 2011.

O'FLYNN O'BRIEN, K.L.; VARGHESE, A.C.; AGARWAL, A.. The genetic causes of male infertility: a review. **Fertility and Sterility**, vol.93, n.1, p.1-12, 2010.

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

PETERSEN, C.; AUMÜLLER, G.; BAHRAMI, M.; HOYER-FENDER, S.. Molecular cloning of Odf3 encoding a novel coiled-coil protein of sperm tail outer dense fibers. **Molecular reproduction and development**, vol.61, n.1, p.102-112, 2002.

PIECZARKA, J.C.; MATTEVI, M.S. Heterocromatina Constitutiva. In: **Sociedade Brasileira de Genética**. Série Monografias – n. 7, Ribeirão Preto: Sociedade Brasileira de Genética p.191-225, 1998.

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

RAJENDER, S.; AVERY, K.; AGARWAL, A.. Epigenetics, spermatogenesis and male infertility. **Mutation Research**, vol.727, p.62-71, 2011.

REDON, R.; ISHIKAWA, S.; FITCH, K.R.; FEUK, L.; PERRY, G.H.; ANDREWS, T.D.; FIEGLER, H.; SHAPERO, M.H.; CARSON, A.R.; CHEN, W.; CHO, E.K.; DALLAIRE, S.; FREEMAN, J.L.; GONZÁLEZ, J.L.; GRATACÒS, M.; HUANG, J.; KALAITZOPOULOS, D.; SAFARINEJAD, M.R.; SHAFIEI, N.; SAFARINEJAD, S.. The role of endothelial nitric oxide synthase (Enos) T-786C, G894T, and 4a/b gene polymorphisms in the risk of idiopathic male infertility. **Molecular Reproduction & Development**, vol.77, p.720,727, 2010.

SARKARDEH, H.; TOTONCHI, M.; ASADPOUR, O.; SADIGHI GILANI, M.A.; ZAMANI ESTEKI M.; ALMADANI, N.; BORJIAN BOROUJENI, P.; GOURABI, H.. Association of MOV10L1 gene polymorphisms and male infertility in azoospermic men with complete maturation arrest. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, vol.31, n.7, p.865–871, 2014.

SCHERES, J.M.. Human chromosome banding. **Lancet**, v.1, p.849, 1972.

SCHRAMM, S.; FRAUNE, J.; NAUMANN, R.; HERNANDEZ-HERNANDEZ, A.; HÖÖG, C.; COOKE, H.J.; ALSHEIMER, M.; BENAVENTE, R.. A novel mouse synaptonemal complex protein is essential for loading of central element proteins, recombination, and fertility. **PLoS Genetics**, vol.7, n.5, 2011.

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

SEAL, A.; GUPTA, A.; MAHALAXMI, M.; AYKKAL, R.; SINGH, TR.; ARUNACHALAM, V.. Tools, resources and databases for SNPs and indels in sequences: a review. **International Journal of Bioinformatics Research and Applications**, vol. 10, n.3, p.264-296, 2014.

SEBAT, J.; LAKSHMI, B.; TROGE, J.; ALEXANDER, J.; YOUNG, J.; LUNDIN, P.; MANER, S.; MASSA, H.; WALKER, M.; CHI, M.; NAVIN, N.; LUCITO, R.; HEALY, J.; HICKS, J.; YE K.; REINER, A.; GILLIAM, T.C.; TRASK, B.; PATTERSON, N.; ZETTERBERG, A.; WIGLER, M.. Large-scale copy number polymorphism in the human genome. **Science**, vol. 305, n. 5683, p.525–528, 2004.

SEN, S.; AMBULKAR, P.; HINDUJA, I.; ZAVERI, K.; GOKRAL, J. PAL, A.; MODI, D.. Susceptibility of gr/gr rearrangements to azoospermia or oligozoospermia is dependent on DAZ and CDY1 gene copy deletions. **Journal of assisted reproduction and genetics**, vol.32, n.9, p.1333-1341, 2015.

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

SHINKA, T.; SATO, Y.; CHEN, G.; NARODA, T.; KINOSHITA, K.; UNEMI, Y.; TSUJI, K.; TOIDA, K.; IWAMOTO, T.; NAKAHORI, Y.. Molecular Characterization of Heat Shock-like factor encoded on the human Y chromosome, and implications for male infertility. **Biology of reproduction**, vol.71, p.297-306, 2004.

SINGH, K.; JAISWAL, D.. Human Male infertility: A Complex Multifactorial Phenotype. **Reproductive Sciences**, vol.18, n.5, p.418-425, 2011.

SONG, S.H.; Chiba, K.; Ramasamy, R.; Lamb, D.J.. Recent advances in the genetics of testicular failure. **Asian Journal of Andrology**, vol.18, n.3, p.350-355, 2016.

SOUTH, S.T.; LEE, C.; LAMB, A.N.; HIGGINS, A.W.; KEARNEY, H.M.; WORKING GROUP FOR THE AMERICAN COLLEGE OF MEDICAL GENETICS AND GENOMICS LABORATORY QUALITY.. ACMG Standards and Guidelines for constitutional cytogenomic microarray analysis, including postnatal and prenatal applications: revision 2013. **Genetics in Medicine**, vol.15, n.11, p.901-909, 2013.

SPEICHER, M.R.; CARTER, N.P.. The new cytogenetics: blurring the boundaries with molecular biology. *Nature reviews*. **Genetics**, vol.6, n.10, p.782-792, 2005.

STAHL, P.J.; SCHLEGEL, P.N.. Genetic evaluation of the azoospermic or severely oligozoospermic male. **Current opinion in obstetrics & gynecology**, vol.24, n.4, p.221-228, 2012.

STEGEN, Ç.; VAN RUMSTE, M.M.; MOL, B.W.; KOKS, C.A.. The value of chromosomal analysis in oligozoospermic men. **Fertility and Sterility**, vol. 98, n.6, p.1438-1442, 2012.

STOUFFS, K.; LISSENS, W.; VAN LANDUYT, L.; TOURNAYE, H.; VAN STEIRTEGHEM, A.; LIEBAERS, I.. Characterization of the genomic organization, localization and expression of

four PRY genes (PRY1, PRY2, PRY3 and PRY4). **Molecular Human Reproduction**, vol, 7, n.7, p.603-610, 2001.

STOUFFS, K.; VANDERMAELEN, D.; MASSART, A.; MENTEN, B.; VERGULT, S.; TOURNAYE, H.; LISSENS, W.. Array comparative genomic hybridization in male infertility. **Reproductive genetics**, vol.27, n.3, p.921-929, 2012.

SU, D.; ZHANG, W.; YANG, Y.; ZHANG, H.; LIU, Y.Q.; BAI, G.; MA, Y.X.; PENG, Y.; ZHANG, S.Z.. c.822+126T>G/C: a novel triallelic polymorphism of the TSSK6 gene associated with spermatogenic impairment in a Chinese population. **Asian Journal of Andrology**, vol. 12, n.2, p.234, 239, 2010.

TÜTTELMANN, F.; SIMONI, M.; KLIESCH, S.; LEDIG, S.; DWORNICZAK, B.; WIEACKER, P.; RÖPKE, A.. Copy number variants in patients with severe oligozoospermia and Sertoli-cell-only syndrome. **Plos One**, vol.6, n.4, 2011.

VANI, G.T.; MUKESH, N.; PRASAD, B.S.; DEVI, P.R.; PRASAD, M.H.; RANI, P.U.; REDDY, P.P.. Role of glutathione S-transferase Mu-1 (GSTM1) polymorphism in oligospermic infertile males. **Andrologia**, vol.42, n.2, p.213, 217, 2010.

VISSER, L.; WESTERVELD, G.H.; XIE, F.; VAN DAALEN, S.K.; VAN DER VEEN, F.; LOMBARDI, M.P.; REPPING, S.. A comprehensive gene mutation screen in men with asthenozoospermia. **Fertility and Sterility**, vol.95, n.3, p.1020,1024, 2011.

WANG, W.; LU, N.; XIA, Y.; GU, A.; WU, B.; LIANG, J.; ZHANG, W.; WANG, Z.; SU, J.; WANG, X.. FAS and FASLG polymorphisms and susceptibility to idiopathic azoospermia or severe oligozoospermia. **Reproductive biomedicine online**, vol.18, n.1, p.141-147, 2009.

WANG, C.; YANG, C.; CHEN, X.; YAU, B.; YANG, C.; ZHU, C.; LI, L.; WANG, J.; LI, X.; SHAO, Y.; LIU, Y.; JI, J.; ZHANG, J.; ZEN, K.; ZHANG, C.Y.; ZHANG, C.. Altered profile of seminal plasma microRNAs in the molecular diagnosis of male infertility. **Clinical Chemistry**, vol.12, p.1722-1731, 2011.

WESTERVELD, G.H.; KORVER, CM.; VAN PELT, A.M.M.; LESCHOT, N.J.; VAN DER VEEN, F.; REPPING, S.; LOMBARDI, M.P.. Mutations in the testis-specific NALP14 gene in men suffering from spermatogenic failure. **Human Reproduction**, vol.21, n.12, p.3178-3184, 2006.

WISZNIEWSKA, J.; BI, W.; SHAW, C.; STANKIEWICZ, P.; KANG, S.L.; PURSLEY, A.N.; LALANI, S.; HIXSON, P.; GAMBIN, T.; TSAI, C.; BOCK, H.; DESCARTES, M.; PROBST, F.J.; SCAGLIA, F.; BEAUDET, A.L.; LUPSKI, J.R.; ENG, C.; CHEUNG, S.; BACINO, C.; PATEL, A.. Combined array CGH plus SNP genome analyses in a single assay for optimized clinical testing. **European Journal of Human Genetics**, vol.22, n.1, p.79-87, 2014.

WOLSTENHOLME, J.; BURN, J. The application of cytogenetic investigation to clinical practice. In: ROONEY, D. E.; CZEPULKOWSKI, B. H. **Human Cytogenetics- Constitutional Analysis: a practical approach**. Oxford: Oxford University Press, v. 1, p. 119-156, 1992.

WONG, K.K.; TSANG, Y.T.; SHEN, J.; CHENG, R.S.; CHANG, Y.M.; MAN, T.K.; LAU, C.C.. Allelic imbalance analysis by high-density single-nucleotide polymorphic allele (SNP) array with whole genome amplified DNA. **Nucleic Acids research**, vol.32, n.9, 2004.

WRITZL, K.; ZORN, B.; PETERLIN, B.. Copy number of DAZ genes in infertile men. *Fertility and Sterility*, vol.84, n.5, p.1522–1525, 2005.

YATSENKO, A.N.; ROY, A.; CHEN, R.; MA, L.; MURTHY, L.J.; YAN, W.; LAMB, D.J.; MATZUK, M.M.. Non-invasive genetic diagnosis of male infertility using spermatozoa RNA: KLHL10 mutations in oligozoospermic patients impair homodimerization. **Human Molecular Genetics**, vol.15, n.23, p.3411,3419, 2006.

YAKIN, K.; BALABAN, B.; URMAN, B.. Is there a possible correlation between chromosomal variants and spermatogenesis? **International Journal of Urology**, v. 12, p. 984-989, 2005.

YANG, B.; MA, Y.Y.; LIU, Y.Q.; LI, L.; YANG, D.; TU, W.L.; SHEN, Y.; DONG, Q.; YANG, Y.. Common AZFc structure possess the optimal spermatogenesis efficiency relative to the rearranged structures mediated by non allele homologous recombination. **Scientific reports**, vol.22, n.5, 2015.

YEO, R.A.; GANGESTAD, S.W.; LIU, J.; CALHOUN, V.D.; HUTCHISON, K.E.. Rare copy number deletions predict individual variation in intelligence. **PLoS One**, vol.6, n.1, 2011.

ZEGERS-HOCHSCHILD, F.; ADAMSON, G.D.; DE MOUZON J.; ISHIHARA, O.; MANSOUR, R.; NYGREN, K.; SULLIVAN, E.; VANDERPOEL, S.; for ICMART and WHO. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO revised glossary of ART terminology, 2009. **Fertility and Sterility**, vol.92, n.5, p.1520-1524, 2009.

ZHANG, F.; LU, C.; LI, Z.; XIE, P.; XIA, Y.; ZHU, X.; WU, B.; CAI, X.; WANG, X.; QIAN, J.; WANG, X.; JIN, L.. Partial deletions are associated with an increased risk of complete deletion in AZFc: a new insight into the role of partial AZFc deletions in male infertility. **Journal of Medical Genetics**, vol.44, n.7, p.437–444, 2007.

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

ZHANG, H.; SU, D.; YANG, Y.; ZHANG, W.; LIU, Y.; BAI, G.; MA, M.; MA, Y.; ZHANG, S.. Some single-nucleotide polymorphism of the TSSK2 gene may be associated with human spermatogenesis impairment. **Journal of Andrology**, vol.31, n.4, p.388-392, 2009.

ZHENG, K.; XIOL, J.; REUTER, M.; ECKARDT, S.; LEU, N.A.; MCLAUGHLIN, K.J.; STARK, A.; SACHIDANANDAM, R.; PILLAI, R.S.; WANG, P.J.. Mouse MOV10L1 associates with Piwi proteins and is an essential component of the Piwi-interacting RNA (piRNA) pathway. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol.107, n.26, p.11841–11846, 2010.

ZHU, X.; ZHI, E.; LI, Z.. MOV10L1 in piRNA processing and gene silencing of retrotransposons during spermatogenesis. **Reproduction**, vol.149, n5, p.229,235, 2015.

ZUFFARDI, O. TIEPOLO, L. Frequencies and types of chromosome abnormalities associated with human male infertility. In: CROSIGNANI, P.G.; RUBIN, B.L.. (Org.). **Genetic control of gamete production and function**. Academic Press, New York, USA, 1982.

Apêndice

APÊNDICE A

Manuscrito publicado na revista *Molecular Cytogenetics* em 15 de Junho de 2016.

Grzesiuk et al. *Molecular Cytogenetics* (2016) 9:45
DOI 10.1186/s13039-016-0249-5

Molecular Cytogenetics

CASE REPORT

Open Access



Familial chromosomal translocation X; 22 associated with infertility and recurrent X mosaicism

Juliana Dourado Grzesiuk^{1*}, Ciro Silveira Pereira², Carlos Henrique Paiva Grangeiro¹, Clarissa Gondim Picanço-Albuquerque¹, Flávia Gaona Oliveira-Gennaro¹, Filipe Brum Machado³, Enrique Medina-Acosta³, Ester Silveira Ramos¹, Maisa Yoshimoto⁴ and Lucia Martelli¹

Abstract

Background: Individuals with apparently balanced translocations, often, show no clinical findings. However, in meiosis, translocations tend to cause errors on chromosome disjunction and the ones involving sex chromosomes have particular implications for the phenotype. Male carriers of balanced X-autosome translocations are almost invariably infertile due to interruption of the spermatogenesis, but the mechanism is not fully understood.

Case presentation: In this case report, we performed a combination of classical cytogenetics (G-banding), molecular cytogenetics (fluorescence in situ hybridization and X-chromosome inactivation study), and cytogenomics (microarray-based comparative genomic hybridization) techniques for characterization of an inherited (X;22) translocation in a family originally referred for infertility investigation. Both proband and his sister are infertile and present the maternally inherited translocation. Interestingly, the maternal grandmother was mosaic for X chromosome monosomy suggesting that the t(X;22) in the proband's mother arose by errors at oogenesis. The presence of the same mosaicism of the X chromosome in the proband's aunt is consistent with this consideration. Array-CGH analysis showed no constitutional pathogenic gains or losses in the translocation carriers. The X-chromosome inactivation studies revealed that the translocated X;22 was active in 99.3% of cells in the mother and in 88% of cells in the daughter. We suggest that incomplete skewing of X inactivation (>97 %) of the daughter could justify the infertility. This study is the first description of recurrent mosaicism of the X chromosome associated with a familial X-autosome translocation.

Conclusions: The phenotype of infertility was probably caused by disruption of spermatogenesis due to gametogenesis specific errors resulted from meiotic pairing and segregation anomalies on the translocated chromosomes.

Keywords: Infertility, X; autosome translocation, recurrent mosaicism, X inactivation, array-CGH

Background

Reciprocal translocations are the most common balanced chromosomal rearrangements in humans [1]. Individuals with balanced translocations often present with no obvious phenotypic abnormalities, but may have a history of infertility. This phenotype occurs because chromosome disjunction and pairing between the translocated chromosomes

may not normally occur at meiosis [2]. Such segregation anomalies during gametogenesis may result in infertility, an increased risk of spontaneous miscarriages or an abnormal phenotype in the offspring. The variable consequences depend on the structural constitution of the translocated chromosome, the length of the chromosomal region involved, the number and position of the breakpoints and their impact on chiasmata. Breakpoint regions in apparently balanced translocations seem to be more complex than previously considered and small genomic imbalances have been detected even in carriers with a normal

* Correspondence: juli_dourado@hotmail.com

¹Genetics Department, Ribeirão Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirão Preto 14049-900, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© 2016 Grzesiuk et al. **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

phenotype [3, 4]. Translocations involving sex chromosomes have particular implications [5], and their impact in the male fertility is well documented in the literature [6].

Male carriers of balanced X-autosome translocations are almost invariably infertile due to interruption of the spermatogenesis, characterized by azoospermia or severe oligozoospermia [7]. The causes of this type of spermatogenesis failure are not fully understood. However, spermatogenesis is generally much more likely to involve meiotic disruption, when compared with oogenesis, due to the more efficient meiotic cell cycle checkpoints in male gametogenesis. This protection mechanism ensures that most potentially aneuploid gametes undergo cell death due to apoptosis. The effect of any disruption of male meiosis is thus likely to lead to a lowered sperm count [8]. Chromosomal translocations create specific pairing problems during meiotic recombination that often generates double strand DNA breaks. The presence of unrepaired DNA breaks can lead to aneuploid gametes since translocated autosomes which fail to synapse effectively can retain numerous unrepaired double-strand DNA breaks that may lead to meiotic arrest and impaired fertility. Unsynapsed chromosomes can be silenced during the meiotic phase of spermatogenesis, and this type of epigenetic regulation may also contribute to the meiotic arrest by silencing ‘meiosis-critical’ genes [9].

De novo balanced X-autosome translocations are considered to arise by errors in spermatogenesis [10]. This can be explained by the mispairing between the sex chromosomes during meiosis since the pairing only occurs on a short homologous region. Wrong pairing may allow crossing between heterologous chromosomes, resulting in translocation of chromosome segments. Although the origin of X-autosome translocations is usually paternal, its transmission happens mainly through the mother since male carriers are frequently infertile.

The correlation between the genotype and the phenotype of the patients can be established using classical and molecular cytogenetics techniques. The study of the genetic causes of infertility allows us to indicate the best treatment through assisted reproduction techniques and is important for the development of new approaches in the field of male infertility. Therefore, in this case report, we describe a unique (X;22) familial translocation associated with the infertility phenotype for a karyotype-phenotype correlation, using different methodologies.

Case presentation

The proband (A1) is a married male, 30-years-old, carrier of a maternal translocation t (X;22). The couple did not use any methods of contraception for three years, without pregnancy. Physical examination showed diminished testis with parenchymatous consistency, normal epididymis and palpable deferens. Hormonal tests (FSH, LH, testosterone) were normal. Spermogram showed azoospermia. Additionally, the testicular biopsy showed hyalinization in the basal membrane of the seminiferous tubule and germinative cells in the initial stages of maturation. His youngest sister (A2) is 27 years old, married with no children, carrying the same apparently balanced translocation t (X;22). She is phenotypically normal and was referred to the Human Reproduction Division due to infertility. She is attempting pregnancy and has been under ovarian stimulation treatment. Their mother (C1) had three children and all carried the translocation t (X;22). The proband's father (B1) present both normal phenotype and karyotype. The maternal aunt (C2) had three spontaneous abortions and one normal son. The maternal uncle (C3) had two children and one grandson, all of them with normal phenotype. The maternal grandmother (G1) gave birth to two healthy sons and three healthy daughters. Figure 1 shows the family pedigree.

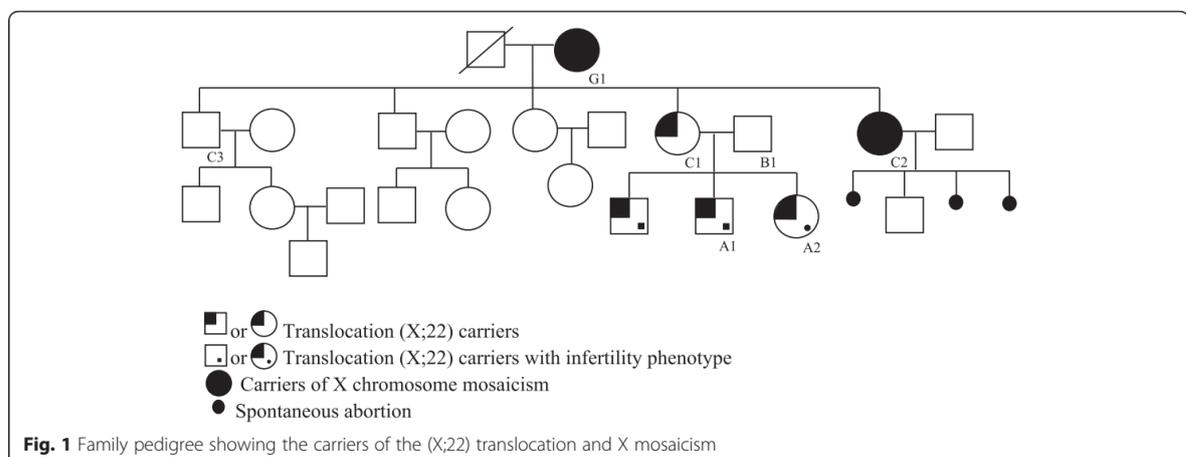


Fig. 1 Family pedigree showing the carriers of the (X;22) translocation and X mosaicism

Peripheral blood samples were collected from the patient and all cited relatives (A2, B1, C1, C2, C3, G1). Metaphase chromosomes were prepared using standard cytogenetic methods and 100 metaphases were analyzed by G-banding. Both proband and sister (A1, A2) had an apparently balanced translocation between chromosomes X and 22, of maternal origin, classified as: $t(X;22)(22qter \rightarrow 22q11.2::Xp22.3 \rightarrow Xqter;22pter \rightarrow 22q11.2::Xp22.3 \rightarrow Xpter)$. Their father (B1) and uncle (C3) presented normal karyotypes. Cytogenetic analysis of their aunt (C2) and grandmother (G1) identified a low level mosaicism for chromosome X aneuploidy. The karyotype of the aunt was: $45, X [09]/47, XXX [01]/46, XX [90]$ and of the grandmother was $45, X [13]/47, XXX [05]/48, XXXX [01]/46, XX [81]$. None of them has any phenotypic features consistent with Turner syndrome.

Molecular cytogenetics studies

The fluorescence in situ hybridization (FISH) technique was performed on metaphase chromosomes of the translocated patients by standard procedures, using Whole Chromosome Painting (WCP) probes for chromosomes X (LPP 0XR, Cytocell, UK) and 22 (LPP 22G, Cytocell, UK). FISH analysis showed a fragment of chromosome 22 translocated to chromosome X but we were unable to detect any segment of the X chromosome translocated to chromosome 22 likely because the reciprocal

region involved on the X chromosome was too small to generate signal using a conventional paint probe.

FISH analysis using the probes LSI DiGeorge/VCFS TUPLE 1 (LPU 004, Cytocell, UK) and Kallmann/Steroid Sulphatase (LPU 016, Cytocell, UK) has showed that both genes *STS* and *KAL1* (also known as *ANOS1*) mapped to p22.31 remained on the derivative X chromosome and did not translocate to the chromosome 22. Additionally, the subtelomeric probe of chromosome 22 (N85A3) was displayed in the terminal portion of the short arm of the translocated X chromosome, while the *TUPLE1* gene (also known as *HIRA*), mapped to 22q11.21, remained on the chromosome 22 translocated (Fig. 2a). Figure 2b shows a schematic image of the position of the genes investigated by FISH in normal and translocated chromosomes. These results suggest that the translocation may involve the distal bands of the X chromosome, as p22.32 or p22.33 and that the breakpoint on chromosome 22 occurred between q11.21 and the subtelomeric region. Thus the definitive karyotype was: $t(X;22)(22qter \rightarrow 22q11.2::Xp22.3 \rightarrow Xqter;22pter \rightarrow 22q11.2::Xp22.3 \rightarrow Xpter)$ [20].ish t(X;22)(N85A3+, wcpX+, wcp22+ KAL1+, STS+; wcpX-, wcp22+, TUPLE1+) [10].

Genomic investigation

Genomic DNA was isolated from peripheral blood from the proband and his six mentioned relatives,

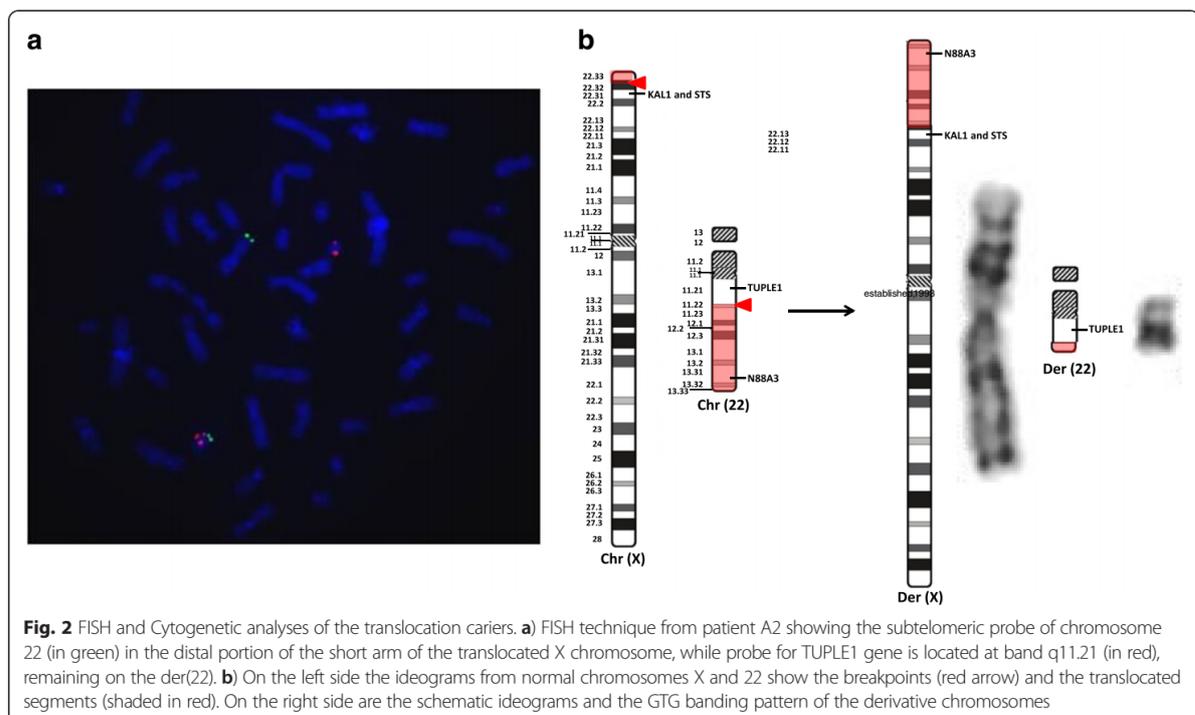


Fig. 2 FISH and Cytogenetic analyses of the translocation carriers. **a**) FISH technique from patient A2 showing the subtelomeric probe of chromosome 22 (in green) in the distal portion of the short arm of the translocated X chromosome, while probe for *TUPLE1* gene is located at band q11.21 (in red), remaining on the der(22). **b**) On the left side the ideograms from normal chromosomes X and 22 show the breakpoints (red arrow) and the translocated segments (shaded in red). On the right side are the schematic ideograms and the GTG banding pattern of the derivative chromosomes

using QIAamp DNA Blood Mini Kit (Qiagen, The Netherlands) and the microarray-based comparative genomic hybridisation (array-CGH) was performed using the platform Human Genome CGH Microarray Chip Kit, 2x400K (Agilent, USA) following the manufacturer's protocol. This platform has 420,288 probes with an average spacing of 5.3 kb. In brief, genomic DNA from peripheral blood of each patient was fragmented and labeled with Cy3-dCTP or Cy5-dCTP using a Genomic DNA Enzymatic Labeling Kit (Agilent, USA). Samples were then hybridized on arrays for 40 h at 65 °C. After washing, the samples were scanned using the DNA microarray scanner SureScan (Agilent). The scan images were analyzed using the feature extraction software v10.5 (Agilent) and further analyzed with Nexus6.0. Copy number variations (CNVs) were taken into consideration when four or more flanking probes exceeded a value of the intensity ratios four times the standard deviation of the log 2 of all intensity ratios for that experiment. CNVs were considered as pathogenic or benign as suggested by the literature [11].

No significant copy gains and losses were detected by array-CGH analysis in the patients or their relatives in the genomic profiles of the chromosomes involved in the translocation or any other chromosome.

X-chromosome inactivation assay

X-chromosome inactivation (XCI) was investigated by a methylation-sensitive restriction enzyme-based PCR indirect assay [12]. Briefly, 200 ng of genomic DNA were digested with *HpaII* (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), for 2 h at 37 °C, or mock-digested. DNA genotyping was carried out in quantitative fluorescence polymerase chain bplex reactions (QF-PCR) in approximately 20 ng of digested or mock-digested DNA using 0.8 μM (*AR*) and 1.2 μM (*RP2*) of each primer pair. The forward primers were labeled at the 5' end with the fluorochrome 6-FAM. The allele profiles were determined in an ABI 310 Prism Genetic Analyzer (Applied Biosystems). The data were analyzed with GeneScan Analysis 3.7 and Genotyper 3.7 software (Applied Biosystems). The proportion of blood cells carrying the active or the inactive X was estimated as described by Busque et al. [13].

This assay is based on methylation statuses of CpG near the short tandem repeats from the promoter region of retinitis pigmentosa 2 (*RP2*) gene and exon 1 of androgen receptor (*AR*) gene on X-chromosome. Cleavage with the restriction enzyme *HpaII* is blocked when the DNA is methylated. After digestion, only uncleaved alleles are amplified by the QF-PCR. The ratio between the area under allele peaks after *HpaII* cleavage was used to estimate the proportion of inactivation of each X

chromosome. The size of the area under the informative allelic peak is inversely proportional to the percentage of cells with the corresponding active X chromosome.

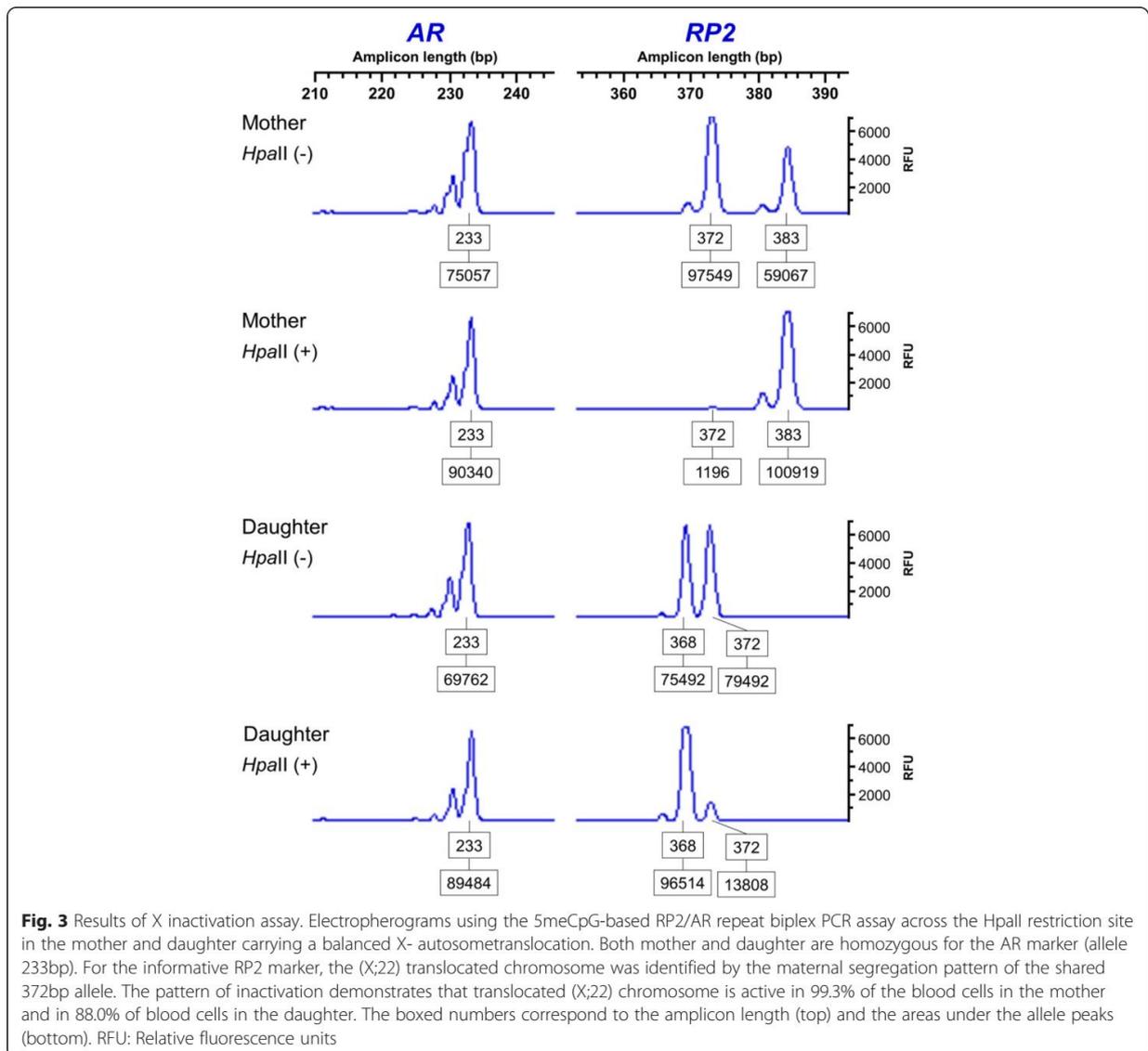
Both mother (C1) and sister (A2) were homozygous for the *AR* marker. Thus, this marker was uninformative in the XCI assay. Segregation analysis of the *RP2* alleles indicated that the X chromosome represented by the 372 bp allele corresponds to the X;22 translocated chromosome, and that it was preferentially active in both mother and daughter (Fig. 3). We estimated that the translocated chromosome was active in 99.3 % of the mother's cells and in 88.0 % of the sister's.

Discussion

Molecular cytogenetic investigation has confirmed that the translocation present in the proband and his sister was maternally inherited. The coincident and unexpected finding of mosaicism of X-chromosome in the aunt (C3) and grandmother (G1) is intriguing. Chromosomal mosaicisms are not heritable since they always occur as post-zygotic segregation anomalies. Incidences of mosaicism occur as genetically altered clonal lineages that can arise following mitotic errors in normal cells. In addition there are also cases where a new lineage emerged from multiple trisomic or monosomic rescue events in altered cells [14–17]. The possibility of independent rescue events occurring in a single individual lineage is supported by the high chromosomal instability detected in studies of human embryogenesis [18–20].

There are a limited number of cases of reported mosaicism in which the clonally aneusomic line was inherited [21]. However, there are currently no reports of recurrence of identical mosaicism between members of the same family. In both aunt (C2) and grandmother (G1), it is likely that the mosaic karyotype with normal, trisomic and monosomic lineages for the X chromosome arose by chromosomal non-disjunction from a chromosomally normal zygote. It is unlikely that the postulated occasional post-zygotic error, occurred by coincidence in both mother and daughter. But it is possible that, at least in the aunt (C2), one of the X aneuploid lineage was inherited. Hultén et al. [22] showed that most normal female fetuses are mosaics for trisomy 21 in their ovarian tissues. Considering that normal females can present detectable rates of aneuploid gametes we can expect a higher rate in mosaicism carriers. The detection of one 48, XXXX cell suggests that rescue events in a triple X cell have prompted the emergence of a 46, XX cell line and a 48, XXXX cell line. In this case, the normal strain would be strongly selected and the altered strain would be repressed.

The translocation (X;22) detected in the mother's proband (C1) could be originated by an abnormal gamete from the grandmother (G1). Robles et al. [23] show that the pairing between trisomic chromosomes is slower



than among disomic ones. Chromosome 22 is the second smallest autosomal chromosome and, on average, it binds to its homologous chromosome by only one or two chiasmata during meiosis. Thus, unlike the larger chromosomes, the loss of a single chiasma between chromosomes 22 is likely to cause errors on chromosome pairing and migration during meiosis [24]. Therefore, it is likely that the incorrect pairing between chromosomes 22 in grandmother gamete induced a pairing error with a single X chromosome, or an extra, unpaired on a trivalent form, followed by non-homologous recombination giving rise to the translocation.

We propose that the chromosomal mosaicism detected in the grandmother gave rise to the different chromosome abnormalities present in the next two

generations of this family. This suggests that carriers of X-chromosome aneuploidy mosaicism may, in some cases, be related to segregation errors in the oogenesis. The recurrent miscarriages of the aunt would also corroborate this hypothesis.

Array-CGH results showed no genomic gains or losses in the translocation breakpoint regions or anywhere in the genome of the infertile patients and their family members. To this extent, on this resolution level, the translocation appears to be balanced. We suggest that the phenotype of male infertility occurred by disruption of spermatogenesis resulting from pairing and chromosome segregation error due to the translocation.

Another possible explanation for male infertility in our patients could be spreading of X chromosome inactivation

into the active chromatin at the translocated region of chromosome 22. Previous studies have shown that such autosomal translocation may lead to association with the sex body at pachytene of meiosis, leading to gradual heterochromatinization that could affect transcription of necessary genes for the meiotic process leading to cell death and male infertility [25]. It is possible that, in our patients, the translocated 22 chromosome fragment was silenced during meiosis. Future studies using techniques such late-replication analysis would be required to elucidate this hypothesis.

We also cannot totally exclude the possibility the translocations may have caused a position effect by disrupting regulatory regions of genes related to the phenotype. Our findings corroborate the literature where is verified no preference for the involvement of a specific chromosome in the X-autosomal translocations and shows that infertility is inevitable for male carriers regardless of the position of the X chromosome breakpoint [26].

Additionally, although the X-chromosome inactivation assay for both mother and sister revealed a nonrandom X inactivation, they showed different percentages. While the mother presented a percentage of 99.3 % of activity of the translocated X-chromosome, the sister presented 88.0 %. Classical studies demonstrated that the X-autosome balanced translocation remains active and approximately 99 % of the non-translocated chromosome X is inactive, probably due to a survival disadvantage [27]. Wolff et al. [28] studied the X inactivation pattern in individuals with structurally abnormal X chromosome and verified that patients without complete skewing of X inactivation (>97 %) presented different phenotypic abnormalities. The sister's proband had an inactivation of approximately 12 % of the translocated chromosome (X;22) and, consequently, the inactivation of this derivative X chromosome could be spreading to the translocated fragment of the chromosome 22 [29, 30]. Considering that mother and daughter presented no genomic gains or losses and were considered as carriers of truly balanced translocations, we could associate the differences between the X-chromosome inactivation patterns with the phenotypic expression.

Conclusions

This was the first report so far of a reciprocal translocation involving a sex chromosome that was probably originated by errors in oogenesis as well as a case of recurrent mosaicism in the same family. Also, we verified a possible correlation between the phenotype of infertility and the pattern of X-chromosome inactivation in a female carrier of X;22 translocation.

Consent

Written informed consent was obtained from the patients for publication of this Case report. A copy of the written

consent is available for review by the Editor-in-Chief of this journal.

Abbreviations

array-CGH: Microarray-based comparative genomic hybridisation; CNV: Copy number variation; FISH: Fluorescent in situ hybridization; QF-PCR: Quantitative fluorescence polymerase chain reaction; XCI: X-chromosome inactivation.

Acknowledgements

We acknowledge Professor Jeremy Squire and Dr. Juliana Meola Lovato for their thoughtful suggestions. The authors gratefully acknowledge the participation of the family members and the colleagues from the Medical Genetics Division of Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo. This work has been supported by the Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel (CAPES, Brazil) and the Foundation of Support to Teaching, Research and Assistance of Clinics Hospital, Ribeirao Preto Medical School, University of Sao Paulo (FAEPA-HCFMRP).

Authors' contributions

JDG performed the FISH technique and its analysis and the DNA extractions. She also participated in the array-CGH technique and its analyzes and was responsible for the manuscript drafting. CSP participated in the array-CGH execution and analysis and helped to draft the manuscript. CHPG and CPA contributed with the clinical evaluation of the patients and their relatives and the genetic counseling for the family. FGOG participated in the array-CGH execution and analysis. FBM, EMA and ESR were responsible for the execution and analyzes of X-chromosome inactivation assays and also helped in the draft of the manuscript. MY did the revision of the array-CGH analysis. LM was the study supervisor, and participated in its design and coordination and helped to draft the manuscript. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Author details

¹Genetics Department, Ribeirão Preto Medical School, University of Sao Paulo, Ribeirao Preto 14049-900, Brazil. ²Center of Biotechnology and Cellular Therapy, San Raphael Hospital, Salvador 41253-190, Brazil. ³Center of Biosciences and Biotechnology, Darcy Ribeiro State University of Northern of Rio de Janeiro, Campos dos Goytacazes 28013-600, Brazil. ⁴Department of Medical Genetics, Faculty of Medical and Dentistry, University of Alberta, Edmonton, Canada.

Received: 19 February 2016 Accepted: 29 April 2016

Published online: 15 June 2016

References

- De Braekeleer M, Dao TN. Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod*. 1991;6(2):245–50.
- Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, García F, Veiga A, Aran B, Barri PN, Vidal F, Egozcue J. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update*. 2000;6(1):93–105.
- Suzuki T, Tsurusaki Y, Nakashima M, Miyake N, Saito H, Takeda S, Matsumoto N. Precise detection of chromosomal translocation or inversion breakpoints by whole-genome sequencing. *J Hum Genet*. 2014;59(12):649–54.
- Gajicka M, Gentles AJ, Tsai A, Chitayat D, Mackay KL, Glotzbach CD, Lieber MR, Shaffer LG. Unexpected complexity at breakpoint junctions in phenotypically normal individuals and mechanisms involved in generating balanced translocations t(1;22)(p36;q13). *Genome Res*. 2008;18(11):1733–42.
- Martin RH. Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Reprod Update*. 2008;14(4):379–90.
- Dong Y, Du RC, Jiang YT, Wu J, Li LL, Liu RZ. Impact of chromosomal translocations on male infertility, semen quality, testicular volume and reproductive hormone levels. *J Int Med Res*. 2012;40(6):2274–83.
- Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I. Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod*. 1996;11(4):1–26.

8. Delhanty JDA. The origins of genetic variation between individual human oocytes and embryos: implications for infertility. *Hum Fertil (Camb)*. 2013; 16(4):241–5.
9. Turner JMA. Meiotic sex chromosome inactivation. *Development*. 2007; 134(10):1823–31.
10. Gardner RJM, Sutherland GR, Shaffer LG. Chromosome abnormalities and genetic counseling 4th ed. Oxford: Oxford University Press; 2011.
11. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nat Rev Genet*. 2015;16(3):172–83.
12. Machado FB, Faria MA, Lovatel VL, da Silva AF A, Radic CP, De Brasi CD, Rios AF, de Sousa Lopes SM, da Silveira LS, Ruiz-Miranda CR, et al. 5meCpG Epigenetic Marks Neighboring a Primate-Conserved Core Promoter Short Tandem Repeat Indicate X-Chromosome Inactivation. *PLoS One*. 2014;9(7):e103714.
13. Busque L, Paquette Y, Provost S, Roy DC, Levine RL, Mollica L, Gilliland DG. Skewing of X-inactivation ratios in blood cells of aging women is confirmed by independent methodologies. *Blood*. 2009;113(15):3472–4.
14. Kagami M, Kato F, Matsubara K, Sato T, Nishimura G, Ogata T. Relative frequency of underlying genetic causes for the development of UPD (14) pat-like phenotype. *Eur J Hum Genet*. 2012;20(9):928–32.
15. Kotzot D. Complex and segmental uniparental disomy (UPD): review and lessons from rare chromosomal complements. *J Med Genet*. 2001;38(8):497–507.
16. Shaffer LG, Agan N, Goldberg JD, Ledbetter DH, Longshore JW, Cassidy SB. American College of Medical Genetics statement of diagnostic testing for uniparental disomy. *Genet Med*. 2001;3(3):206–11.
17. Vetro A, Manolakos E, Petersen MB, Thomaidis L, Liehr T, Croci G, Franchi F, Marinelli M, Meneghelli E, Dal Bello B, et al. Unexpected results in the constitution of small supernumerary marker chromosomes. *Eur J Med Genet*. 2012;55(3):185–90.
18. Mantzouratou A, Delhanty JD. Aneuploidy in the human cleavage stage embryo. *Cytogenet Genome Res*. 2011;133(2–4):141–8.
19. Vanneste E, Voet T, Le Caignec C, Ampe M, Konings P, Melotte C, Debrock S, Amyere M, Vikkula M, Schuit F, et al. Chromosome instability is common in human cleavage-stage embryos. *Nat Med*. 2009;15(5):577–83.
20. Voet T, Vanneste E, Van der Aa N, Melotte C, Jackmaert S, Vandendael T, Declercq M, Debrock S, Fryns JP, Moreau Y, et al. Breakage-fusion-bridge cycles leading to inv dup del occur in human cleavage stage embryos. *Hum Mutat*. 2011;32(7):783–93.
21. Robberecht C, Voet T, Utine GE, Schinzel A, de Leeuw N, Fryns JP, Vermeesch J. Meiotic errors followed by two parallel postzygotic trisomy rescue events are a frequent cause of constitutional segmental mosaicism. *Mol Cytogenet*. 2012;5(19).
22. Hultén MA, Patel SD, Tankimanova M, Westgren M, Papadogiannakis N, Jonsson AM, Iwarsson E. On the origin of trisomy 21 Down syndrome. *Mol Cytogenet*. 2008;1(21).
23. Robles P, Roig I, Garcia R, Ortega A, Egozcue J, Cabero LL, Garcia M. Pairing and synapsis in oocytes from female fetuses with euploid and aneuploid chromosome complements. *Reproduction*. 2007;133(5):899–907.
24. Hall HE, Surti U, Hoffner L, Shirley S, Feingold E, Hassold T. The origin of trisomy 22: evidence for acrocentric chromosome-specific patterns of nondisjunction. *Am J Med Genet A*. 2007;143A(19):2249–55.
25. Oliver-Bonet M, Ko E, Martin RH. Male infertility in reciprocal translocation carriers: the sex body affair. *Cytogenet Genome Res*. 2005;111(3–4):343–6.
26. Ma S, Yuen BH, Penaherrera M, Koehn D, Ness L, Robinson W. ICSI and the transmission of X-autosomal translocation: a three-generation evaluation of X;20 translocation: case report. *Hum Reprod*. 2003;18(7):1377–82.
27. Mattei MG, Mattei JF, Ayme S, Giraud F. X-autosome translocations: cytogenetic characteristics and their consequences. *Hum Genet*. 1982;61(4):295–309.
28. Wolff DJ, Schwartz S, Carrel L. Molecular determination of X inactivation pattern correlates with phenotype in women with a structurally abnormal X chromosome. *Genet Med*. 2000;2(2):136–41.
29. Distèche CM. Dosage Compensation of the Sex Chromosomes. *Annu Rev Genet*. 2012;46:537–60.
30. Sharp AJ, Spotswood HT, Robinson DO, Turner BM, Jacobs PA. Molecular and cytogenetic analysis of the spreading of X inactivation in X; autosome translocations. *Hum Mol Genet*. 2002;11(25):3145–56.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit



Anexo

ANEXO 1



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 (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 466/12 CNS/MS.

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

Atenciosamente.

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

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

ANEXO 2

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