CAMILA SOMMERAUER FRANCHIM

Detecção de microdeleções do cromossomo Y em pacientes inférteis, comparando os resultados obtidos pelas técnicas de PCR e MLPA

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Prof. Dr. Edmund Chada Baracat
Coorientadora: Profa. Dra. Leslie Domenici Kulikowski

São Paulo

2018

CAMILA SOMMERAUER FRANCHIM

Detecção de microdeleções do cromossomo Y em pacientes inférteis, comparando os resultados obtidos pelas técnicas de PCR e MLPA

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do Título de Doutor em Ciências

Programa de Obstetrícia e Ginecologia
Orientador: Prof. Dr. Edmund Chada Baracat
Coorientadora: Profa. Dra. Leslie Domenici Kulikowski

São Paulo

2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Franchim, Camila Sommerauer
Detecção de microdeleções do cromossomo Y em pacientes inférteis, comparando os resultados obtidos pelas técnicas de PCR e MLPA / Camila Sommerauer Franchim. -- São Paulo, 2018.
Tese(doutorado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.
Programa de Obstetrícia e Ginecologia.
Orientador: Edmund Chada Baracat.
Coorientadora: Leslie Domenici Kulikowski.

Descritores: 1.Deleção cromossômica 2.Infertilidade masculina 3.Reação em cadeia da polimerase 4.Variações do número de cópias de DNA 5.Cromossomo Y 6.Azoospermia

USP/FM/DBD-322/18

Responsável: Eidi Raquel Franco Abdalla - CRB-8/4901

Dedicatória

Aos meus amados pais, **Marise e Pedro;** exemplos de força e superação, pelo amor irrestrito e incondicional, e por serem responsáveis por tudo que construí honesta e dignamente ao longo de minha jornada; pelo incentivo e reconhecimento a cada objetivo traçado e alcançado... Minha eterna gratidão!

Ao meu marido **Cid**; meu grande amor e companheiro de todas as jornadas, pela cumplicidade e apoio incondicional em todos os momentos, principalmente nos de incerteza...

À minha irmã **Andreza,** pelo incentivo e cumplicidade ao longo de todos esses anos...

A toda minha família, principalmente minhas avós **Iza** e **Elza**; pelo carinho e dedicação em todos os momentos...

Sem vocês, nenhuma conquista valeria a pena...

Agradecimentos

Ao Prof. Dr. Edmund Chada Baracat, meu orientador, eternamente grata pela honra de ter me aceitado como aluna, pela confiança, apoio e contribuição com meu crescimento profissional e pessoal. Minha grande admiração por sua exímia dedicação profissional.

À Profa. Dra. Leslie Domenici Kulikowski, minha coorientadora, por ter contribuído imensamente com meu conhecimento e crescimento, pelo grande auxílio em grande parte deste trabalho, pela amizade, carinho, e, sobretudo por ter me incentivado a prosseguir...

Ao Prof. Dr. Paulo Serafini, pela honra de ter colaborado em diversas etapas deste trabalho, pelas oportunidades e conhecimento transmitido, e por ter sempre acreditado em mim e incentivado meu trabalho.

Ao Dr. Pedro Monteleone, pela colaboração e incentivo, por acreditar em meu potencial para prosseguir, e por me permitir fazer parte de sua equipe.

Ao Dr. Walter Pinheiro, por ter confiado em meu trabalho e ter me possibilitado e incentivado a seguir adiante. Obrigada!

Ao Dr. Marcello Cocuzza e toda a equipe da Urologia, por ter me auxiliado em diversos passos deste trabalho, pela amizade e conhecimento transmitido.

Aos Drs. **Bruno Tiseo** e **Guilherme Wood**, pela ajuda na seleção dos pacientes, e principalmente pela amizade. Obrigada!

A Eunice Del Gaudio Machado, amiga querida com quem tenho o privilégio de trabalhar, pelo incentivo, grande ajuda e apoio em todos os momentos, principalmente nos mais difíceis. Obrigada!

À Silvia Mancini, amiga querida, pela confiança! Você sempre me ajudou, me ouviu, e colaborou para que eu pudesse avançar... Obrigada!

À Cristiane Amaral, agradeço pela amizade, grande carinho, e por me ajudar e apoiar desde o início.

À Lucinda Pereira, secretária da Pós-Graduação do Depto. de Obstetrícia e Ginecologia, pela amizade e por toda a ajuda na organização de todos os passos do trabalho.

Aos amigos e colegas de trabalho do Centro de Reprodução Humana Governador Mário Covas da Divisão de Ginecologia do HCFMUSP, Ana Bernardes, Henrique Fazão, Meire Rodrigues, Julia Scoriza, Hamilton de Martim, Francisca Amélia, Rosangela Rodrigues, Adriana Mara, Glaucia Anjos, Dayana Oliveira, pelo apoio e incentivo de sempre...

Ao pessoal da Enfermagem do Centro de Reprodução Humana Governador Mário Covas da Divisão de Ginecologia do HCFMUSP, principalmente Regina Ferreira, Maira Cei, Simone Souza, Áurea Gonçalves, Jozy, Celina, Marta Barbosa, pela amizade e grande auxílio nas coletas de sangue dos pacientes do estudo. Obrigada, meninas!

Aos amigos citogenômicos, principalmente Evelin Zanardo, Fabrícia Madia, Alexandre Torchio, Samar Nasser, Marília Montenegro, Yanca Gasparini, Roberta Dutra, Gil Monteiro, Amon Mendes, por toda a ajuda e conhecimento transmitidos, além do apoio e incentivo nos momentos mais difíceis... Sem vocês, nada seria possível!

Aos colegas e amigos do Departamento de Ginecologia do HCFMUSP, por todo o apoio ao longo desta jornada.

Aos participantes do estudo, pela colaboração e disponibilidade em nos auxiliar na busca de conhecimento.

A Deus, por ter me permitido mais esta conquista.

Epígrafe

"O cientista não é o homem que fornece as verdadeiras respostas;

é quem faz as verdadeiras perguntas."

Claude Lévi-Strauss

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas

A	adenina
AZF	fator de azoospermia (*Azoospermic Factor*)
BPY2	*Basic Protein Y-linked 2*
C	citosina
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CDY	*Chromodomain Protein, Y Chromosome*
CNV	Variação do número de cópias de um gene *(Copy Number Variation)*
DAPI	4,6 diamidino-2-fenilindol diclorohidrato
DAZ	*Deleted in Azoospermia*
DDX3X	*DEAD-Box Helicase 3, X-Linked*
DDX3Y	*DEAD-Box Helicase 3, Y-Linked*
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	ácido etilenodiaminotetra-acético
EIF1AY	*Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A, Y-Linked*
FISH	Hibridização *in situ* fluorescente (*Fluorescent in situ hibridization*)
FITC	Isotiocianato de fluoresceína (*Fluorescein IsoThioCyanate*)
FIV	Fertilização *in vitro* (*In vitro fertilization*)
G	guanina
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
hg18	NCBI Build 36.1
HSFY	*Heat Shock Transcription Factor, Y-Linked*
ICSI	Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide (*IntraCytoplasmic Sperm Injection*)
KDM5D	*Lysine-specific Demethylase 5D*
MLPA	Amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação *(Multiplex Ligand Probe Dependent Amplification)*
NAHR	Recombinação Homóloga Não-Alélica (do inglês *NonAllelic Homologous Recombination*
nt	nucleotídeos
OMS	Organização Mundial da Saúde
p	braço curto do cromossomo (*petit*)
PAR	Região Pseudoautossômica (*PseudoAutossomic Region*)
pb	pares de bases
PCR	Reação de Polimerização em Cadeia (*Polymerase Chain Reaction*)
q	braço longo do cromossomo (letra subsequente a “p”, de petit)
RBMY	*RNA binding motif protein, Y chromosome*
RNA	ácido ribonucléico

rpm	rotações por minuto
RPS4Y	*Ribosomal Protein S4, Y-Linked*
SCO	Síndrome de Células de Sertoli (*Sertoly Cell Only Syndrome*)
SRY	*Sex-determining region Y*
STS	Sítios de Sequências Rotuladas (*Sequence Tagged Site)*
T	timina
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TESE	Extração de Espermatozoides no Testículo
TRA	Técnicas de Reprodução Assistida
TSPY	*Testis-specific protein, Y-Linked*
USP9Y	*Ubiquitin Specific Peptidase 9, Y-Linked*
UTY	*Ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat containing, Y-linked*
UV	ultravioleta
ZFX	*Zinc Finger Protein, X-Linked*
ZFY	*Zinc Finger Protein, Y-Linked*

Lista de Figuras

Figura 1: Espermatogênese Humana ____ 5

Figura 2: Diagrama do cromossomo Y ____ 8

Figura 3: Representação esquemática do cromossomo Y humano, indicando a localização de seus principais genes ____ 18

Figura 4: Mapa da distribuição das frequências de deleções nas regiões AZF ao redor do mundo ____ 21

Figura 5: Tamanho amostral em função do poder estatístico do teste ____ 30

Figura 6: Eletroforese em gel de agarose a 2% das regiões do cromossomo Y analisadas de um paciente sem microdeleção ____ 34

Figura 7: Eletroforese em gel de agarose a 2% de um paciente com microdeleção nas regiões SY84 e SY86 ____ 34

Figura 8: Eletroforese em gel de agarose a 2% de um paciente com microdeleção nas regiões SY127, SY 134, SY 254 e SY255 ____ 35

Figura 9: Representação esquemática da técnica de MLPA ____ 37

Figura 10: Representação esquemática da constituição das sondas de MLPA ____ 37

Figura 11: Exemplo de resultado de MLPA ____ 45

Figura 12: Representação esquemática dos resultados encontrados de Microdeleções do Cromossomo Y pela técnica de STS-PCR ____ 51

Figura 13: Representação esquemática dos resultados encontrados de microdeleções do cromossomo Y pela técnica de MLPA ____ 54

Figura 14: Representação esquemática do cromossomo Y* contemplando as sondas de MLPA ____ 58

Figura 15: Análise dos dados de MLPA do paciente M37, indicando a presença de uma cópia a mais do cromossomo controle X, evidenciando Síndrome de Klinefelter ____ 58

Figura 16: Resultado do cariótipo por bandamento G do paciente M43 ____ 59

Figura 17: Imagem dos dados obtidos por MLPA do paciente M43, após normatização, sugerindo a presença de mosaicismo para o cromossomo Y ____ 60

Figura 18: Resultado de FISH do paciente M43, evidenciando o mosaicismo ____ 60

Lista de Tabelas

Tabela 1: Valores de referência limite para as características seminais _____ 3

Tabela 2: Distribuição de valores, limites inferiores de referência (com 95% de intervalo de confiança - IC) para parâmetros seminais obtidos de homens férteis cujas parceiras engravidaram no período de 12 meses ou menos _____ 3

Tabela 3: STSs utilizados para a análise molecular do cromossomo Y _____ 33

Tabela 4: Sondas de MLPA (kit P360-B1, MRC-Holland) e STSs utilizados na PCR, em relação à sua posição cromossômica, no HG18 _____ 39

Tabela 5: Sondas Controle localizadas em outros cromossomos para confirmação da reação do kit P360-B1 (MRC-Holland) _____ 40

Tabela 6: Parâmetros de corrida necessários para analisar fragmentos no equipamento de eletroforese capilar ABI 3500 _____ 43

Tabela 7: Resultados das STS-PCRs e características dos pacientes inférteis _____ 52

Tabela 8: Resultados das STS-PCRs e características dos controles _____ 53

Tabela 9 : Resultados da MLPA do grupo de estudo, evidenciando deleções (em vermelho e laranja) e duplicações (em azul e verde) _____ 55

Tabela 10: Resultados da MLPA do grupo controle, evidenciando deleções (em vermelho e laranja) e duplicações (em azul e verde) _____ 56

Resumo

Franchim CS. *Detecção de microdeleções do cromossomo Y em pacientes inférteis, comparando os resultados obtidos pelas técnicas de PCR e MLPA* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo: 2018.

INTRODUÇÃO: O cromossomo Y contém genes primordiais para o desenvolvimento testicular e a espermatogênese. Sua conformação repetitiva predispõe à ocorrência de deleções e duplicações, que tem impacto clínico. As microdeleções nas regiões AZF afetam *loci* responsáveis pela espermatogênese e são uma das causas mais frequentes de azoospermia e oligozoospermia. Seu diagnóstico tem valor preditivo para o sucesso na recuperação cirúrgica de espermatozoides testiculares em homens azoospérmicos. A técnica utilizada para detectá-las é a reação de polimerização em cadeia (PCR), porém os protocolos divergem entre si, havendo muita variabilidade na incidência destas deleções. À vista disso, sugerimos utilizar a técnica de Amplificação de Múltiplas Sondas dependente de Ligação (MLPA). OBJETIVO: Comparar os resultados obtidos com as técnicas de PCR e MLPA na detecção de microdeleções do cromossomo Y em homens inférteis. RESULTADOS: Analisamos 43 pacientes inférteis (azoospérmicos e oligozoospérmicos) e 40 homens férteis (controle) pelas técnicas de PCR e MLPA. Encontramos 7 deleções por PCR (16,2%) e 9 por MLPA (21%), além de 5 duplicações e um mosaico. DISCUSSÂO: Além das deleções, as duplicações também podem gerar instabilidades nos genes do cromossomo, podendo levar a infertilidade. CONCLUSÕES: Os resultados obtidos por ambas as técnicas revela que a MLPA é uma técnica mais sensível que a técnica de PCR para detectar microdeleções do cromossomo Y.

Descritores: deleção cromossômica; infertilidade masculina; reação em cadeia da polimerase; variações do número de cópias de DNA; cromossomo Y; azoospermia.

Abstract

Franchim CS.*Detection of Y chromosome microdeletions in infertile patients, comparing the results obtained by PCR and MLPA techniques* [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”: 2018.

INTRODUCTION: The Y chromosome contains several genes responsible for testicular development and spermatogenesis. Its repetitive conformation predisposes this chromosome to deletions and duplications that have clinical impact. Microdeletions in the AZF regions affect loci responsible for spermatogenesis and are one of the most frequent causes of azoospermia and oligozoospermia. This diagnosis may have a predictive value for success in the surgical recovery of testicular spermatozoa in azoospermic men. The gold standard method for this detection is polymerase chain reaction (PCR), but protocols diverge among them, generating a great variability in the incidence of these deletions. PURPOSE: We evaluated another molecular diagnostic method, Multiplex Ligand Probe Dependent Amplification (MLPA), which generates more genomic data (such as duplications and rearrangements) in a single reaction, leading to a better understanding of these patients phenotype. OBJECTIVE: To compare the results obtained with PCR and MLPA techniques in the detection of Y chromosome microdeletions in infertile men. RESULTS: We analyzed 43 infertile patients (azoospermic and oligozoospermic) and 40 fertile men (control) by PCR and MLPA techniques. We found 7 deletions by PCR (16.2%) and 9 by MLPA (21%), in addition to 5 duplications and one mosaic. DISCUSSION: Besides deletions, duplications can also generate instability in the chromosome genes, which may lead to infertility, and it is important being capable to diagnose these alterations with a faster and more effectively method. CONCLUSIONS: The results obtained by both techniques reveal that MLPA is more sensitive than PCR to detect microdeletions of the Y chromosome.

Descriptors: chromosomic deletion; male infertility; polymerase chain reaction; DNA copy number variations; Y chromosome; azoospermia.

.

NORMALIZAÇÃO ADOTADA

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Sumário

Lista de Abreviaturas, Símbolos e Siglas viii
Lista de Figuras x
Lista de Tabelas xi
Resumo xii
Abstract xiii
1 Introdução 1
1.1 Infertilidade Masculina 1
1.2 O Cromossomo Y 6
1.2.1 Regiões AZF (Fator de Azoospermia) do Cromossomo Y 9
1.2.2 Principais genes localizados no cromossomo Y 11
1.3 Microdeleções do cromossomo Y 19
1.4 Métodos utilizados para a detecção de Microdeleções do Y 22
1.4.1 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR) 22
1.4.2 Amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação (MLPA) 23
1.4.3 Hibridação in situ Fluorescente (FISH) 25
2 Objetivos 27
2.1 Geral 27
2.2 Específicos 27
3 Métodos 28
3.1 Casuística 28
3.2 Cálculo do Tamanho Amostral 29
3.3 Coleta de sangue periférico 31
3.3.1 Extração de DNA 31
3.4 STS-PCR 32
3.4.1 Protocolo de STS-PCR 32
3.5 Reações de MLPA 35
3.5.1 Protocolo de MLPA 41
3.5.2 Análise dos resultados de MLPA 43
3.6 Cultura de Linfócitos de Sangue Periférico 45
3.6.1 Protocolo de cultura de Linfócitos 46
3.7 FISH 47
3.7.1 Protocolo de FISH 47
4 Resultados 49
4.1 Resultados de STS-PCR 50
4.2 Resultados de MLPA 54
4.2.1 Resultado de Cariótipo 59
4.2.2 Resultado de FISH 59

4.3 Análise Estatística: 61
5 Discussão 63
6 Conclusões 72
7 Anexos 73
8 Referências 84

1 Introdução

A infertilidade conjugal é definida como a incapacidade de um casal engravidar espontaneamente no período de um ano, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2010). Aproximadamente 15% dos casais apresentam esta dificuldade, sendo que a causa masculina compreende aproximadamente 50% dos casos (Krausz & Casamonti, 2017).

O estudo da infertilidade tem avançado bastante, e graças a fertilização *in vitro* (FIV), e principalmente a técnica de injeção intra-citoplasmática de espermatozoides (ICSI), na qual um único espermatozoide é injetado no interior do oócito para atingir a fertilização, muitos homens com alto grau de infertilidade puderam alcançar a paternidade (Kim et al., 1998). Porém com os avanços nas Técnicas de Reprodução Assistida (TRA), com as quais algumas barreiras naturais de fertilização e implantação (seleção natural) são manualmente removidas, deve-se ter um cuidado ainda maior com a possível transmissibilidade de alterações genéticas subdiagnosticadas, que podem trazer implicações aos conceptos (Krausz et al., 2015).

1.1 Infertilidade Masculina

A infertilidade masculina é uma condição patológica multifatorial com apresentações fenotípicas bastante heterogêneas (Krausz et al., 2015),

sendo a forma inicial e mais eficaz de iniciar sua investigação é através da análise seminal, que permite avaliar a produção e a qualidade espermática, assim como o funcionamento das glândulas acessórias do trato genital. A OMS preconiza que devem ser colhidas, ao menos, duas amostras com intervalo de 3 a 4 semanas, devido à possível variação amostral em um mesmo indivíduo (WHO, 2010; Centola, 2014).

Os parâmetros de normalidade atuais de referência seminal estão descritos na Tabela 1. Estes valores foram publicados pela OMS em 2010 e baseiam-se em estudo realizado em 1953 homens férteis em sete países. Os valores obtidos foram utilizados para definir o percentil 5 com intervalo de confiança de 95%, como valor de referência limite para cada parâmetro, de acordo com a distribuição normal (Tabela 2) (Cooper et al., 2010; WHO, 2010).

As alterações espermáticas mais comuns são a oligozoospermia (concentração menor de 15 milhões de espermatozoides/mL) e a azoospermia (ausência de espermatozoides), além de outras anormalidades como a astenozoospermia (motilidade progressiva menor de 32%) e a teratozoospermia (morfologia menor de 4% de formas ovais normais) (WHO, 2010).

Tabela 1: Valores de referência limite para as características seminais

Parâmetros	Valores de Referência
Volume	1,5 mL (1,4 – 1,7)
Concentração espermática	15 milhões de espermatozoides/mL
Número total de espermatozoides	39 milhões de espermatozoides/ejaculado
Motilidade Total (progressiva e não progressiva)	40%
Motilidade Progressiva	32%
Morfologia	4% normais
Vitalidade	58% vivos

Adaptado de (WHO, 2010)

Tabela 2: Distribuição de valores, limites inferiores de referência (com 95% de intervalo de confiança - IC) para parâmetros seminais obtidos de homens férteis cujas parceiras engravidaram no período de 12 meses ou menos

		Centis				
	N	**5 (95% IC)**	**25**	**50**	**75**	**95**
Volume Seminal (mL)	1941	**1,5** (1,4-1,7)	2,7	3,7	4,8	6,8
Concentração Espermática (10^6/mL)	1859	**15** (12-16)	41	73	116	213
Número total (10^6/Ejaculado)	1859	**39** (33-46)	142	255	422	802
Motilidade Total (%)	1781	**40** (38-42)	53	61	69	78
Motilidade Progressiva (%)	1780	**32** (31-34)	47	55	62	72
Formas Normais (%)	1851	**4,0** (3,0-4,0)	9	15	24,5	44
Vitalidade (%)	428	**58** (55-63)	72	79	84	91

Adaptado de (Cooper et al., 2010).

Os casos de azoospermia podem ser divididos em dois tipos: obstrutiva e não obstrutiva. As azoospermias não obstrutivas caracterizam-se pela ausência de produção de espermatozoides, ou uma produção mínima, incapaz de ser eliminada pelo ejaculado (Stahl & Schlegel, 2012). Já as azoospermias obstrutivas estão relacionadas à condução dos espermatozoides, possivelmente por obstrução no ducto deferente. As causas deste tipo de azoospermia são, no

geral, infecções genitais (a reação inflamatória obstrui os canais condutores de sêmen), fibrose cística (patologia de herança genética, que leva à ausência dos canais deferentes em seus portadores), e a vasectomia, reversível cirurgicamente (Stahl & Schlegel, 2012).

A nomenclatura oficial da OMS preconiza o critério oligozoospermia como concentração abaixo de 15 milhões de espermatozoides/mL (WHO, 2010), porém apenas para efeito de tratamento, alguns autores a subdividiram de acordo com sua gravidade. Não há uma conformidade nos valores de corte, contudo a literatura considera oligozoospermia grave quando a concentração espermática está abaixo de cinco milhões de espermatozoides/mL (Massart et al., 2012; McLachlan, 2013; Miyamoto et al., 2015; Song et al., 2016).

Ao longo dos anos, a média da concentração espermática da população em geral apresentou um declínio considerável (Carlsen et al., 1992; Centola et al., 2016), porém, a oligozoospermia por si só não é considerada como causa de infertilidade, uma vez que 5% dos homens férteis são oligozoospérmicos (McLachlan, 2013).

A espermatogênese é composta por uma intrincada cadeia de eventos e é dividida basicamente em três fases: mitótica, meiótica e espermiogênica (Figura 1). Na primeira fase, as espermatogônias (células germinativas, diploides) sofrem divisões mitóticas, originando os espermatócitos primários, que na segunda fase (meiótica) serão divididos originando células haplóides (espermatócitos secundários). Então, na fase proliferativa, ocorre a maturação dos espermatócitos secundários em espermátides, células estas que perdem boa

quantidade de citoplasma (fagocitado pelas células de Sertoli), para que em seguida se diferenciem em espermatozoides, contemplando o aparecimento da cabeça (com a região acrossômica, derivada do complexo de Golgi), a peça intermediária e o flagelo (os microtúbulos se formam a partir do centríolo) (Allais-Bonnet & Pailhoux, 2014).

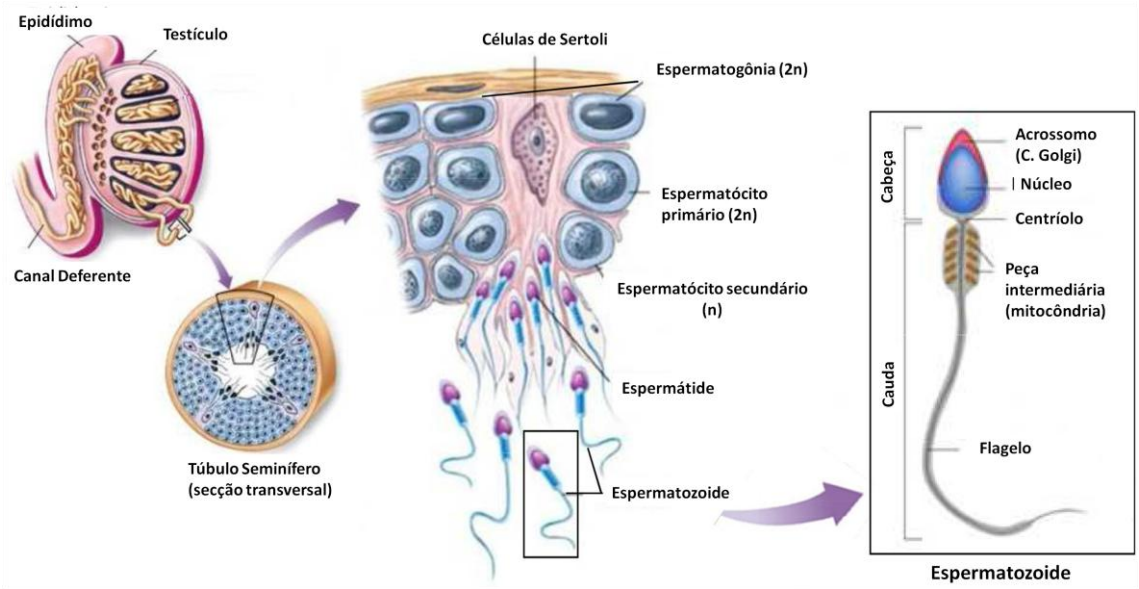


Figura 1: Espermatogênese Humana
A espermatogênese ocorre nos túbulos seminíferos dos testículos. As espermatogônias (células germinativas primordiais, diplóides) próximas à lâmina basal dos túbulos seminíferos começam a se dividir mitoticamente para produzir mais espermatogônias e espermatócitos primários (diplóides). Os espermatócitos primários passam pela meiose I para formar espermatócitos secundários (haploides) que migram para o lúmen tubular, onde se dividem por meiose II, produzindo as espermátides (haplóides). Na fase final (espermiogênese), as espermátides amadurecem e geram espermatozoides.
Ao longo da espermatogênese, as células germinativas são posicionadas próximas às células de Sertoli, que fornecem nutrientes e fatores de crescimento necessários para seu desenvolvimento. Depois de formada a estrutura final, os espermatozoides são liberados no lúmen testicular.
Adaptado de (Allais-Bonnet & Pailhoux, 2014).

Esse mecanismo da espermatogênese é controlado geneticamente e qualquer alteração nestes controles pode levar à falha da produção e/ou maturação dos espermatozoides (Singh & Jaiswal, 2011).

A infertilidade masculina por causas genéticas acomete, aproximadamente, 15% dos casos de infertilidade. Pode envolver alterações cromossômicas numéricas e estruturais, ou apenas em um único gene (Foresta et al., 2001a; Massart et al., 2012; Krausz et al., 2015).

Existem basicamente três fatores genéticos mais comumente associados à infertilidade masculina: mutações no gene da fibrose cística (levando a agenesia dos vasos deferentes, e azoospermia); alterações cariotípicas (como a Síndrome de Klinefelter, e a disgenesia gonadal), e as microdeleções do cromossomo Y (geram falhas espermatogênicas, levando a oligozoospermia e até azoospermia (Kim et al., 1998).

A Síndrome de Klinefelter é a mais frequente, seguida das microdeleções do cromossomo Y. No entanto, além destas causas, cerca de 40% das falhas testiculares primárias ainda permanecem sem etiologia definida (Krausz et al., 2014; Krausz & Casamonti, 2017).

1.2 **O Cromossomo Y**

O cromossomo Y pertence ao grupo G de bandamento, é classificado como acrocêntrico, sendo o menor cromossomo humano (60 Mb). É responsável pela determinação sexual masculina e pela formação e manutenção das células germinativas. A maioria dos genes localizados no braço curto (p) estão ligados ao desenvolvimento testicular, e os do braço longo (q), à espermatogênese (Kamp et al., 2000; Quintana-Murci et al., 2001; Krausz & Degl’Innocenti, 2006).

Em comparação aos cromossomos autossômicos, o cromossomo Y tem o menor número de genes, mas o maior número de sequências repetitivas (Rozen et al., 2003; Krausz & Casamonti, 2017).

Este cromossomo é composto pelas regiões pseudoautossômica (PAR), eucromática e heterocromática (Figura 2). As regiões pseudoautossômicas se localizam nas duas extremidades do cromossomo, e são denominadas PAR1 (com tamanho de 2,6 Mb) e PAR2 (com 320 pb de tamanho). As PAR do cromossomo Y se recombinam durante a meiose pareando com o cromossomo X, por terem suas terminações homólogas (Rozen et al., 2003; Vogt, 2004b; Mangs & Morris, 2007; Galletto et al., 2008). Deleções na região PAR podem levar a falhas na divisão meiótica (Kamp et al., 2000).

A PAR1 está diretamente envolvida no pareamento dos cromossomos X e Y durante a meiose (Mangs & Morris, 2007; Kauppi et al., 2011), e a PAR2 possui uma frequência muito menor de pareamento e recombinação do que a PAR1, não tendo tanta relevância na fertilidade (Mangs & Morris, 2007).

As regiões eucromáticas (Figura 2) totalizam aproximadamente 23 Mb; são as regiões de cromatina menos condensadas, onde se localizam os genes que serão transcritos (Li et al., 2008). Esta região é rica em sequências palindrômicas e duplicadas, o que protege a preservação da sua integridade estrutural (Kirsch et al., 2005).

A região heterocromática (Figura 2) é a região onde a cromatina acha-se mais condensada, classificada como geneticamente inerte, na qual normalmente os genes estão inativos, ou seja, não transcrevem proteína como

produto final ou podem estar metilados e também não haver transcrição (Kirsch et al., 2005; Li et al., 2008).

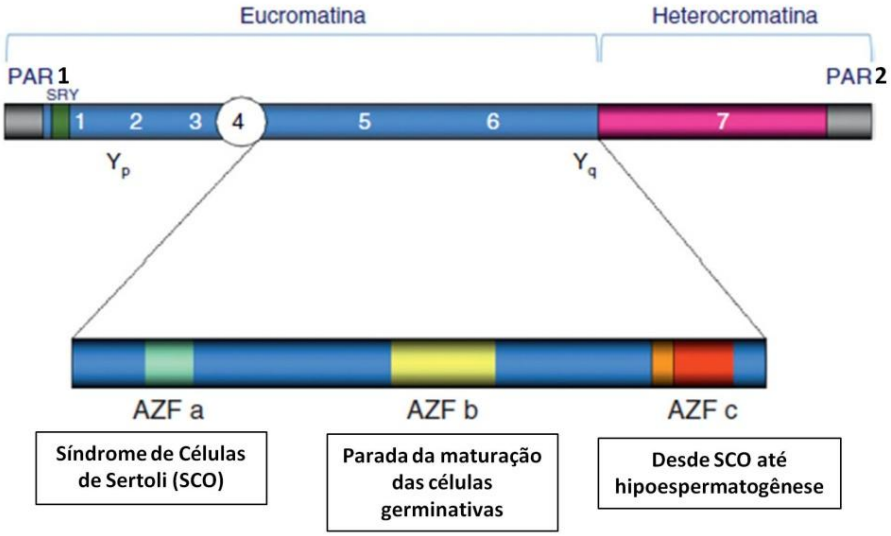


Figura 2: Diagrama do cromossomo Y

Diagrama do cromossomo Y incluindo a representação das regiões Pseudoautossômicas (PAR) no braço curto (Yp) e longo (Yq) do cromossomo, a região SRY e as regiões AZF. Abaixo das sub-regiões AZF estão indicados os fenótipos histológicos testiculares.

Adaptado de (Hernández-Vargas et al., 2016)

O cromossomo Y sempre foi estudado buscando respostas para a infertilidade, porém recentes estudos mostram sua influência na saúde do homem como um todo, evidenciando sua influência em respostas imunes e inflamatórias, ressaltando um aumento de risco na Hipertensão Arterial e Doenças Coronarianas (Maan et al., 2017).

1.2.1 **Regiões AZF (Fator de Azoospermia) do Cromossomo Y**

A nomenclatura AZF surgiu em meados de 1970, quando o cromossomo Y foi descrito por estudos citogenéticos realizados por Tiepolo e Zufardi (1976). Os pesquisadores identificaram em homens inférteis (com espermatogênese comprometida por análise do tecido testicular) deleções *de novo* (não herdadas, ausentes nos pais). Sugeriram haver um fator de azoospermia geneticamente funcional, que foi denominado de AZF, ou "fator de azoospermia" (AZF, do inglês *Azoospermia Factor*) (Li et al., 2008).

De acordo com as deleções encontradas nos pacientes inférteis, a região AZF foi subdivida em três regiões: AZFa, AZFb e AZFc, como ilustrado na Figura 2 (Esteves & Agarwal, 2011; Stahl & Schlegel, 2012). Estudos demonstraram haver também microdeleções em outra região, denominada AZFd (localizada entre AZFb e AZFc), que estaria ligada à oligozoospermia e anormalidades na morfologia dos espermatozoides de homens com concentração normal, porém sem genes candidatos. Esta região foi pouco estudada (Kent-First et al., 1999; Poongothai et al., 2009; Esteves & Agarwal, 2011).

A conformação peculiar da região AZF é a presença de sequências homólogas repetitivas, e por esta razão estão predispostas a deleções e/ou duplicações devido a um mecanismo denominado Recombinação Homóloga Não-Alélica (NAHR, do inglês *Nonallelic Homologous Recombination*) (Krausz & Casamonti, 2017).

Deleções na região AZFa ocasionam depleção das células germinativas, sendo que nos túbulos seminíferos são apenas visualizadas

células de Sertoli. Estes casos são denominados de Síndrome de Células de Sertoli (SCO, do inglês *Sertoli Cell Ony Syndrome*), e não foram descritos episódios de sucesso de recuperação cirúrgica de espermatozoides (Foresta et al., 2001b; Ferrás et al., 2004).

Quando o locus AZFb está deletado, não são detectadas células pós-meióticas nos túbulos seminíferos, embora a coorte de espermatogônias e espermatócitos esteja normal. Estas deleções resultam na interrupção da meiose I e o prognóstico clínico acreditava-se ser semelhante ao das deleções em AZFa (Bosch & Jobling, 2003; Ferrás et al., 2004; Krausz et al., 2014), porém recentemente foram descritos episódios de pacientes com deleções totais e parciais nesta região que eram oligozoospérmicos, além de recuperação cirúrgica de espermatozoides bem sucedida (Kleiman et al., 2011; Liu et al., 2017a; Stouffs et al., 2017; Zhang et al., 2017). Estes autores sugerem novos estudos nesta área, uma vez que era descrito a chance quase nula de se encontrar espermatozoides nestes pacientes.

A região AZFc é formada quase inteiramente por blocos de sequência repetitiva (denominados “amplicons”), que estão dispostos em estruturas palindrômicas, mostrando sequências quase idênticas (Kuroda-kawaguchi et al., 2001; Skaletsky et al., 2003). Esta conformação repetitiva leva a uma maior suscetibilidade a recombinações intracromossomais homólogas, que podem gerar deleções (Giachini et al., 2008). Sendo assim, AZFc é a região mais propensa a ocorrência de microdeleções, como comprovam estudos na população geral (Krausz et al., 2014; Bansal et al., 2016). Nesta região, as deleções podem levar à hipoespermatogênese em diferentes graus, gerando

um quadro evolutivo de azoospermia, porém existem chances de recuperação cirúrgica de espermatozoides em aproximadamente 70% dos casos (Esteves & Agarwal, 2011; Bunyan et al., 2012; Bansal et al., 2016).

Algumas deleções parciais dentro da região AZFc foram descritas recentemente. Rozen et al. (2012) evidenciou a presença de quatro delas (*gr/gr*, *b2/b3, b1/b3*, e *b2/b4*) em cinco populações, mostrando que estas são mais comuns nos homens com falha espermatogênica grave comparados aos controles, porém é importante ressaltar que quase todas elas estão presentes em homens férteis utilizados como controles nos estudos (Machev et al., 2004; Hucklenbroich et al., 2005), mostrando que estas deleções parciais por si só não são critérios de falha espermatogênica.

1.2.2 **Principais genes localizados no cromossomo Y**

O cromossomo Y tem sido alvo de pesquisas devido ao seu pequeno tamanho, baixo número de genes e alta quantidade de sequências repetitivas (Jobling & Tyler-Smith, 2003; Krausz & Casamonti, 2017).

1.2.2.1 Genes do braço curto do cromssomo Y (Yp)

No braço curto do cromossomo Y estão localizados genes de grande importância: *SRY*, *ZFY* e *TSPY (*Figura 3*)*.

SRY – O gene *SRY* (do inglês, *Sex determining Region of Y*) consiste de um único éxon e é específico do cromossomo Y. Codifica uma proteína que age na regulação da transcrição, acionando a diferenciação das células de Sertoli, sendo essencial para a formação dos testículos. Sua ausência faz com que as gônadas primordiais se diferenciem em ovários. Mutações neste gene podem levar a falhas no desenvolvimento testicular, propiciando afecções como a disgenesia gonadal completa ou parcial (Erdal & Barlas, 2000; Mello et al., 2005; Shojaei et al., 2017).

ZFY- O gene *ZFY* (do inglês, *Zinc Finger Protein,Y-Linked*) foi o primeiro gene identificado no cromossomo Y humano (Page et al., 1987). É considerado um fator de transcrição porque codifica proteínas que possuem domínios dedo de zinco, que ativam a transcrição. Recentemente, estudos mostraram que este gene desempenha papel importante na espermatogênese, na divisão meiótica e na formação do espermatozoide (Nakasuji et al., 2017). Possui um homólogo no cromossomo X, o *ZFX* (Kido & Lau, 2015).

TSPY- O gene *TSPY* (do inglês*, Testis-specific protein Y-linked*) codifica proteínas que agem como supressoras de tumor, além de regularem o ciclo celular (Li et al., 2017). É um gene amplamente expresso nos estágios iniciais da tumorigênese no gonadoblastoma, e algumas variantes de *TSPY* estão associadas à espermatogênese (Delbridge et al., 2004; Krausz et al., 2010), embora um estudo recente refute esta hipótese (Yang et al., 2018).

1.2.2.2 Genes do braço longo (Yq) do cromossomo Y

Os genes das regiões AZFa e AZFb, se deletados, levam à falha espermatogênica, sendo pois de extrema importância neste processo. Já se houver genes deletados em AZFc, as mutações não são tão graves. Acredita-se, portanto, que as regiões AZFa e AZFb são responsáveis por iniciar o processo de espermatogênese, e a AZFc pela finalização e maturação (Krausz & Casamonti, 2017).

1.2.2.2.1 *Genes em AZFa*

Estruturalmente, a região AZFa é não-repetititva, e nela existem basicamente dois genes de maior importância: *USP9Y* e *DDX3Y* (Figura 3).

USP9Y- O gene *USP9Y* (do inglês, *Ubiquitin specific peptidase 9, Y-linked*) codifica uma proteína regulatória que previne a degradação proteica removendo a marcação da ubiquitina em conjugados proteína-ubiquitina. A ubiquitina é uma proteína que regula outras proteínas, marcando-as quando estão mal-formadas para que sejam destruídas por um complexo chamado proteassoma. Em humanos, a deleção isolada deste gene, mesmo que total, está associada a diversos padrões fenotípicos (de azoospermia com hipoespermatogênese até normozoospermia), indicando seu papel predominante na sintonia mais fina, melhorando apenas a eficiência da espermatogênese (Sun et al., 1999; Krausz et al., 2006; Luddi et al., 2009; Krausz & Casamonti, 2017).

DDX3Y- O gene *DDX3Y* (do inglês, *Dead-box Y RNA helicase*) anteriormente denominado *DBY*, é o maior gene da região, e codifica uma helicase (enzima que promove a abertura da hélice de DNA, separando-o em duas fitas simples) RNA dependente. Mutações neste gene resultam em redução do número de células germinativas e podem levar à SCO (Ditton et al., 2004). Foresta e cols (2000), constataram que o gene DBY é o mais frequentemente deletado em homens com deleção na região AZFa, reforçando seu papel na espermatogênese.

Os genes *USP9Y* e *DDX3Y* possuem homólogos no cromossomo X (*USP9X* e *DDX3X*) (Ditton et al., 2004; Liu et al., 2017b).

1.2.2.2.2 *Genes em AZFb*

Na região AZFb existem três genes de cópia única: *EIF1AY*, *RPS4Y2* e *KDM5D (*Figura 3) (Krausz & Casamonti, 2017).

EIF1AY- O gene *EIF1AY* (do inglês, *Eukaryotic Translation Initiation Factor 1A, Y-linked*) pertence à família EIF-1A, e desempenha funções regulatórias para o início da transcrição. Esta família aumenta a dissociação ribossômica em sub-unidades e estabiliza a ligação do complexo 43S ao final do RNA durante a biossíntese proteica. Especificamente o gene *EIF1AY* codifica uma proteína essencial para iniciar a transcrição durante a espermatogênese (Kleiman et al., 2007).

RPS4Y2 - O gene *RPS4Y2* (do inglês, *Ribossomal protein S4, Y-linked*) codifica uma subunidade da proteína ribossomal que está envolvida no processo de ligação do RNAm ao ribossomo, tendo seu papel essencial na regulação pós-transcricional do processo espermatogênico. É expresso nos testículos e próstata, e é altamente expresso durante a espermatogênese. Possui uma cópia homóloga no cromssomo X (*RPS4X*) (Andrés et al., 2008; Lopes et al., 2010; Colaco & Modi, 2018).

KDM5D- O gene *KDM5D* (do inglês, *Lysine (K) Specific Demethylase 5D*) possui vários nomes (JARID1D, HYA), e tem papel crucial na remodelação da cromatina nas células germinativas, e na condensação cromossômica durante a meiose. Ele forma um complexo proteico com o fator reparador de DNA “MSH5” durante a espermatogênese. No estágio de leptóteno/zigóteno da prófase meiótica, ocorre uma remodelação na cromatina das células germinativas masculinas, Este complexo estaria envolvido nesse processo (Akimoto et al., 2008; Krausz & Casamonti, 2017). Este gene também foi recentemente descrito como supressor de tumor em câncer de próstata (Li et al., 2016), e foi também relacionado à sensibilidade ao docetaxel, medicamento utilizado no tratamento do câncer de próstata (Redon et al., 2006; Komura et al., 2016).

RBMY1- O gene *RBMY1* (do inglês, *RNA-Binding Motif, Y-linked*) é expresso em espermatócitos e espermatogônias (Vogt, 2004b), e é um dos mais relevantes da região AZFb, com várias cópias nesta região. A maioria das cópias são pseudogenes, embora seis delas sejam consideradas funcionais. O gene *RBMY* é expresso em células germinativas testiculares e adultas, e participa na

co-regulação do *splicing alternativo* de espermatócitos (Dreumont et al., 2010). O *splicing* é um processo que remove os introns e junta os exons após a transcrição do RNA, formando um RNAm maduro. Quando ocorrem escolhas alternativas de éxons ou íntrons retidos, pode haver a formação de proteínas diferentes como produto final, ou seja; um "*Splicing Alternativo*" (Park et al., 2018).

HSFY - O gene *HSFY (*do inglês, *Heat Shock transcription factor, Y-linked*) produz (por *splicing alternativo*) dois transcritos diferentes que codificam duas proteínas (HSFY1 e HSFY2). Ele é expresso nos testículos e rins e não tem homólogos no cromossomo X. Autores afirmam que se não houver outros fatores de risco, a ausência da expressão deste gene por si só não prejudica a fertilidade masculina, no entanto, a sua perda pode influenciar a expressão fenotípica de variantes alélicas de alguns genes envolvidos na formação flagelar (Kichine et al., 2012; Colaco & Modi, 2018).

CDY - O gene *CDY (*do inglês, *Chromodomain Protein Y-linked*) tem duas cópias idênticas na região AZFc (*CDY1A* e *CDY1B*), e duas em AZFb (*CDY2A* e *CDY2B*) (Colaco & Modi, 2018). O gene *CDY1* codifica uma proteína contendo um domínio catalítico que age na regulação da expressão gênica e remodelamento da cromatina. Esta proteína está localizada no núcleo das espermátides tardias, e se houver uma redução significativa na concentração da proteína total de *CDY*, pode interferir na transição de histona para protamina durante a espermiogênese (formação de espermatozoides maduros), o que pode contribuir para a falha deste processo (Lahn et al., 2002; Heydarian et al., 2016).

1.2.2.2.3 *Genes em AZFc*

A região AZFc possui basicamente dois genes de extrema importância: BPY2 e DAZ (Figura 3).

BPY2- O gene *BPY2* (do inglês, *Basic Protein Y-linked 2*) apresenta três cópias (*BPY2A*, *BPY2B* e *BPY2C*), e é expresso apenas no testículo, codificando uma proteína que está envolvida na regulação do citoesqueleto das células germinativas. Duas de suas cópias estão localizadas perto da região de deleção parcial *gr/gr* (Colaco & Modi, 2018).

DAZ – A família de genes *DAZ (*do inglês, *Deleted in Azoospermia)* tem um papel ativo na regulação da espermatogênese, através da mediação de transporte, armazenamento e iniciação da tradução das proteínas (Navarro-Costa et al., 2010). A alta incidência de deleções DAZ em homens inférteis fez com que esta família de genes fosse candidata a ser a principal em AZFc.

É uma família de genes altamente conservada ao longo da evolução (Fu et al., 2015), que codificam proteínas específicas do testículo, e estão ausentes em 10 a 15% dos homens cromossomicamente normais com azoospermia não-obstrutiva e oligozoospermia (Pina-Neto et al., 2006). Posteriormente foi descrito que esta região contém duplicações palindrômicas, divididas em dois *clusteres* de quatro genes, *DAZ1, DAZ2, DAZ3* e *DAZ4* (Saxena et al., 2000; Vogt et al., 2003; Kim et al., 2009). As quatro cópias de *DAZ* estão expressas nas espermatogônias, e são responsáveis por codificar proteínas de ligação importantes na espermatogênese (Colaco & Modi, 2018).

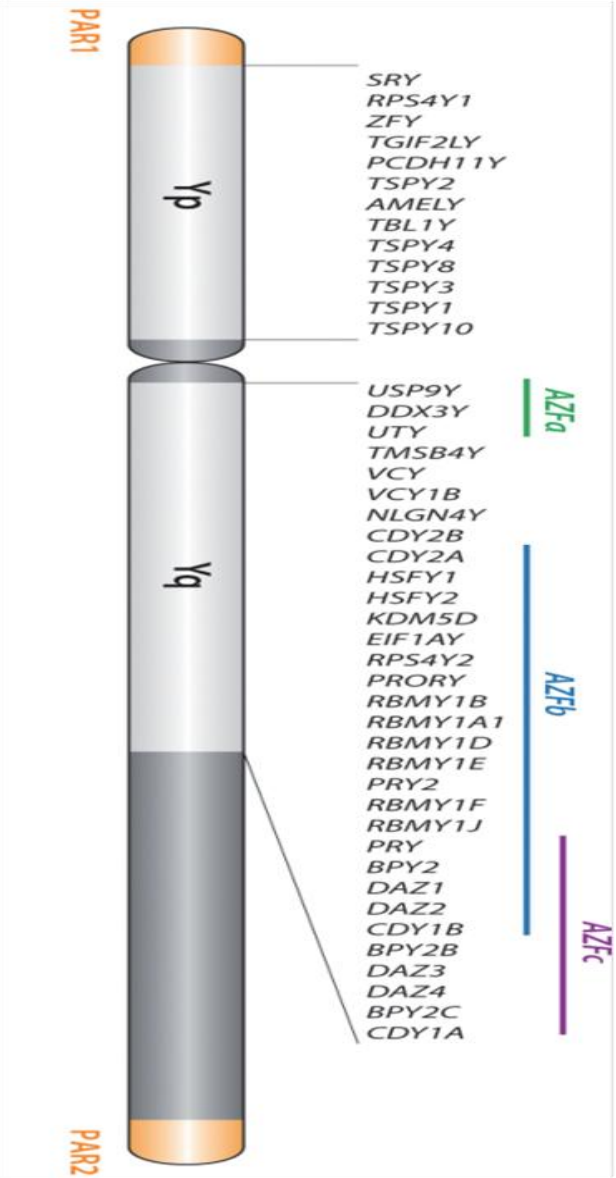


Figura 3: Representação esquemática do cromossomo Y humano, indicando a localização de seus principais genes
Fonte: (Kido & Lau, 2015)

1.3 **Microdeleções do cromossomo Y**

As microdeleções do cromossomo Y são a segunda causa genética mais freqüente de falha espermatogênica em homens inférteis após a síndrome de Klinefelter (Foresta et al., 2001b), e sua identificação é de grande importância para definir a etiologia de falhas na espermatogênese em pacientes com cariótipo normal (Pandey et al., 2010).

A infertilidade ligada ao cromossomo Y é clinicamente caracterizada por azoospermia ou oligozoospermia, sendo geralmente assintomática (Esteves & Agarwal, 2011), e estas características dependerão do tamanho do fragmento deletado e da quantidade de material genético perdido (Kim et al., 2012).

No processo evolutivo, a recombinação homóloga entre sequências de DNA repetitivas do braço longo do cromossomo Y durante a meiose paterna é responsável pelo aparecimento aleatório *de novo* destas microdeleções (Foresta et al., 2001a; Repping et al., 2002; Esteves & Agarwal 2011).

É importante ressaltar que com o advento das TRA, os homens que possuem estas microdeleções, dependendo da região deletada, puderam constituir sua prole, porém devido à transmissão vertical do cromossomo Y, todos os descendentes do sexo masculino poderão herdar estas microdeleções (Kamischke et al., 1999; Kühnert et al., 2004; Vogt, 2004b; Mateu et al., 2010).

Existem algumas linhas de investigação sobre a origem das microdeleções. Mamoulakis e colaboradores (2013) investigaram o DNA de 180 meninos com criptorquidia por PCR, e não encontraram relação entre as microdeleções do cromossomo Y e a falha na descida do testículo para a bolsa

escrotal. Outra linha de investigação que vem sendo estudada é da associação entre microdeleções do Y e alterações nos cromossomos sexuais. As microdeleções do Y podem ser deletérias (pois levam à perda desse cromossomo na divisão celular), gerando um quadro de mosaicismo. A instabilidade cromossômica causada por essa alteração pode levar ao surgimento de uma linhagem celular 45,X (Siffroi et al., 2000). Patsalis e colaboradores (2005) realizaram um estudo incluindo 17 pacientes com linhagem celular 45,X e outra com cromossomo Y estruturalmente anômalo, encontrando alta frequência de deleções na região AZF mesmo em cromossomos normais por cariótipo, o que mostra que a instabilidade destes cromossomos na mitose pode ser decorrente das deleções.

Quando se avalia a qualidade dos embriões formados a partir de pais portadores da microdeleleção do Y, os resultados têm sido controversos. Alguns pesquisadores consideram que não há efeitos prejudiciais (Hopps et al., 2003; Kihaile et al., 2004; Liu et al., 2017a); outros acreditam ser a fertilização e a qualidade embrionárias significativamente mais baixa, porém estes utilizaram espermatozoides do ejaculado (Van Golde et al., 2001). Outros grupos de pesquisadores encontraram reduções nas taxas de fertilização e gestação nos portadores de microdeleção do cromossomo Y quando utilizaram espermatozoides testiculares versus ejaculados, especulando que esta diferença possa estar relacionada a origem do espermatozoide, e não à presença das microdeleções do Y (Oates et al., 2002; Stouffs et al., 2005).

Atualmente, há um estudo grandioso em andamento que avalia a ocorrência de aneuploidias em embriões cujos pais são portadores destas microdeleções (Hernández et al., 2018).

A prevalência de microdeleções no cromossomo Y na população geral é de 1 a cada 4000 homens (Krausz et al., 2014), mas entre os homens inférteis é ainda maior, variando entre 5 a 10% (Krausz et al., 2014; Yu et al., 2015).

Na Figura 4 estão representadas as frequências de microdeleções nas regiões AZF do cromossomo Y mundialmente, ressaltando que Suécia, Alemanha e Áustria são os países com menor incidência, sendo que no Brasil se mostra ao redor de 7,7% (Krausz et al., 2014).

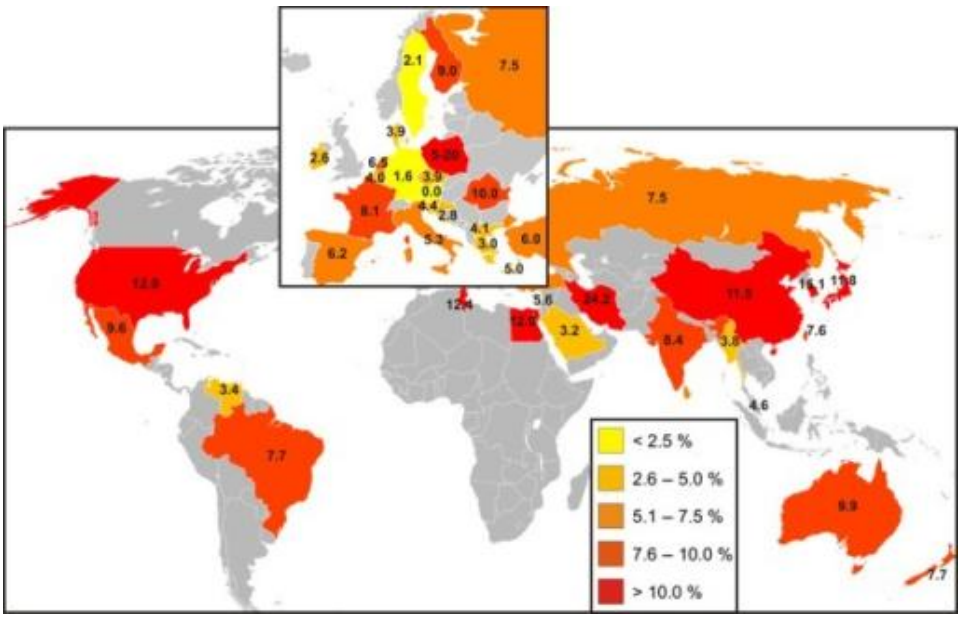


Figura 4: Mapa da distribuição das frequências de deleções nas regiões AZF ao redor do mundo
FONTE: (Krausz et al., 2014).

Na população brasileira, a prevalência pode variar de 5 a 10% (São Pedro et al., 2003; Pina-Neto et al., 2006; Krausz et al., 2014).

1.4 Métodos utilizados para a detecção de Microdeleções do Y

Por serem submicroscópicas, as microdeleções do cromossomo Y não são podem ser detectadas com cariótipo convencional (tamanho aproximado de 0,8 a 7,7 Mb), mas podem ser identificadas pelas técnicas de biologia molecular (Stahl & Schlegel 2012).

Quando iniciaram as análises para diagnósticos de microdeleções do cromossomo Y, os protocolos eram muito discrepantes uns dos outros, o que gerou muitos resultados falso positivos. Por esta razão, foi descrito o primeiro guia (Simoni et al., 2004), posteriormente atualizado (Krausz et al., 2014), que é recomendado para uso nos diagnósticos de rotina (Stouffs et al., 2017).

1.4.1 Reação de Polimerização em Cadeia (PCR)

A PCR é um método que permite que um fragmento específico de DNA seja amplificado milhares de vezes em algumas horas. Foi idealizada em 1983, por Kary Mullis e revolucionou as pesquisas em biologia molecular. A reação depende de uma enzima denominada *Taq polimerase*, termoestável, que foi extraída da bactéria *Thermus aquaticus*, e tem como característica sobreviver a diversas temperaturas. Esta reação permite a amplificação de qualquer sequência do DNA coletada de materiais biológicos diversos desde que se conheça a sequência-alvo. A partir daí, são necessários dois *primers* (iniciadores) que se hibridizam no início e no final da sequência alvo, e ao reconhecer o *primer*, a polimerase sintetiza uma cópia complementar ao fragmento de interesse (Saiki et al., 1988).

Com o advento da PCR, foi possível mapear a extensão das microdeleções usando-se de sítios de sequências rotuladas (STS, do inglês *Sequence Tagged Sites*). Os STSs são sequências de DNA de 200 a 500 pares de bases (pb) que têm ocorrência única e específica no genoma e sua localização e sequência são conhecidas (Olson et al., 1989).

Atualmente, a técnica de detecção padrão laboratorial de microdeleções do cromossomo Y é a STS-PCR (Simoni et al., 2004; Yu et al., 2015). No entanto, a investigação médica realizada rotineiramente não abrange todo o cromossomo, uma vez que uma avaliação mais detalhada requereria mais de 120 STSs (Siffroi et al., 2000; Pandey et al., 2010). A análise básica descrita no guia inclui o uso dos marcadores sY84 e sY86 em AZFa, sY127 e sY134 em AZFb, e sY254 e sY255 em AZFc, juntamente com um STS na região do gene SRY e um marcador localizado no gene ZFX/ZFY como controle (Stouffs et al., 2017).

1.4.2 **Amplificação de múltiplas sondas dependente de ligação (MLPA)**

A técnica de MLPA (do inglês, *Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), descrita em 2002, permite a identificação de deleções e duplicações de sequências específicas. É considerada uma alternativa economicamente mais viável e mais rápida em comparação com outras técnicas moleculares. Permite a triagem genômica quantitativa de sequências específicas, baseada na hibridação e amplificação por PCR de

aproximadamente 45 regiões em uma única reação (Schouten et al., 2002).

A técnica de MLPA tem uma característica típica que é a amplificação das sondas que se ligaram ao DNA, e não das sequências genômicas. Para cada alvo, é utilizado um par de sondas específico, sendo que cada uma delas é formada por uma sequência complementar à região de interesse e outra de *primer* universal (Schouten et al., 2002).

Basicamente a técnica de MLPA avalia a variação no número de cópias (CNV, do inglês *Copy Number Variation*) dos genes localizados nos cromossomos.As CNVs são definidas como segmentos de DNA de tamanhos distintos (50 pb a 1kb) presentes em número variado de cópias no genoma. São geralmente herdadas (Sebat, 2007), e recentemente têm sido bastante estudadas devido a sua influência na expressão dos genes por disrupção e alteração da dosagem gênica. Em algumas vezes, por efeito de posição, podem predispor à ocorrência de alterações deletérias. Por isso, estão sendo bastante estudadas na busca das causas de diversas patologias (Castellani et al., 2014).

O estudo das CNVs é bastante desafiador na correlação de sua presença com o fenótipo dos pacientes. Para auxiliar nesta interpretação, foram criados diversos bancos de dados disponíveis para consulta, como o **DGV** (*Database of Genomic Variants* - http://dgv.tcag.ca/), que reúne informações sobre as CNVs sabidamente benignas; o **DECIPHER** (*DatabasE of Chromosomal Imbalance and Phenotype in Humans using Ensembl Resources* – http://decipher.sanger.ac.uk/), e o **Genome Browser** (*UCSC Genome Browser* - http://genome.ucsc.edu). A pesquisa nestes bancos de

dados permite a classificação das CNVs em benignas, patogênicas ou de efeito desconhecido (VOUS, do inglês *Variants Of Uncertain Significance*).

A MLPA pode ser utilizada para a detecção de microdeleções no cromossomo Y atualmente apenas em pesquisa. Ela detecta além das deleções, as duplicações e rearranjos complexos (Saito et al., 2015). Porém até o momento os resultados de duplicações ainda são controversos (Lin et al., 2007; Giachini et al., 2008), o que mostra a necessidade de mais estudos.

1.4.3 **Hibridação *in situ* Fluorescente (FISH)**

A técnica de FISH pode ser utilizada para detectar e localizar a presença ou ausência de determinadas sequências de DNA. Foi desenvolvida nos anos 1980, e consiste no emparelhamento de sondas *locus*-específicas (marcadas por fluorescência) com suas sequências complementares no genoma, o que permite a detecção de inúmeras síndromes causadas por deleções e microdeleções (Kurtovic-kozaric et al., 2016).

É possível desenvolver sondas de regiões específicas da microdeleção para que esta técnica possa detectá-la, contudo tem custo elevado por requerer fluorescência e não é um bom método para a detecção de microdeleções do cromossomo Y. Ademais, seriam necessárias inúmeras sondas para englobar as áreas mais comuns de microdeleções, e também poderia gerar resultados incompletos, por não englobar todas as regiões (Pinkel et al., 1986).

Desta forma, analisamos pacientes com critérios para serem portadores de alguma microdeleção do cromossomo Y para investigar a prevalência desta patologia em nossa população utilizando duas técnicas (PCR e MLPA) procurando obter mais informações acerca do genoma destes pacientes, aprofundando assim seu diagnóstico.

2 Objetivos

2.1 Geral

- Avaliar a presença de microdeleções do cromossomo Y em pacientes inférteis (oligozoospérmicos e azoospérmicos) utilizando as técnicas de PCR e MLPA.

2.2 Específicos

- Avaliar a prevalência de microdeleções do cromossomo Y nos indivíduos do sexo masculino atendidos no Centro de Reprodução Humana Governador Mário Covas da Divisão de Clínica Ginecológica do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP);
- Analisar os resultados obtidos pelas técnicas de PCR e MLPA;
- Estimar a especificidade e sensibilidade dessas técnicas na investigação de microdeleções do cromossomo Y.

3 Métodos

3.1 Casuística

Foram selecionados, para este estudo, 43 pacientes do sexo masculino inférteis com diagnóstico de azoospermia ou oligozoospermia; 40 homens férteis e uma mulher como controle.

Após a seleção, os indivíduos que aceitaram participar do estudo preencheram e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (Anexos A e B). Este estudo foi submetido e aprovado pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP), sob o número de parecer 535.321 (Anexo C).

Critérios de Inclusão

Grupo de estudo: pacientes do sexo masculino, com idade de 18 a 50 anos, atendidos no Centro de Reprodução Humana Governador Mario Covas da Divisão de Clínica Ginecológica do HCFMUSP com diagnóstico de infertilidade, que apresentavam azoospermia ou oligozoospermia, selecionados por análise seminal anterior. A análise seminal foi realizada segundo as recomendações e critérios da OMS (WHO, 2010). Se

o líquido seminal não apresentasse espermatozoides, a amostra era centrifugada a 1600 rpm por 10 minutos, e o sedimento era reexaminado.

Grupo Controle: pacientes do sexo masculino, com idade de 25 a 55 anos, que já tenham prole constituída, com desejo de esterilização voluntária, atendidos no Ambulatório de Vasectomia da Divisão de Urologia do HCFMUSP;

Controle Feminino: uma mulher com cariótipo normal, utilizada para controle negativo, para garantir o correto desempenho das técnicas aplicadas.

Este estudo tem caráter transversal, compreendendo pacientes que foram atendidos no período de dezembro de 2014 a dezembro de 2017, e os 43 pacientes e 41 controles (40 homens e 1 mulher) foram avaliados pelas técnicas de PCR e MLPA na pesquisa de microdeleções do cromossomo Y.

3.2 Cálculo do Tamanho Amostral

O cálculo do tamanho amostral foi realizado utilizando o software GPower 3.1 (Faul et al., 2009). O nível de significância adotado foi de 0,05; o poder estatístico foi de 90% e o tamanho do efeito foi calculado com base em dados da literatura que identificaram a prevalência de microdeleções do Y em homens inférteis variando de 5,0 a 7,5%. De acordo com os parâmetros fornecidos, foi

possível obter o gráfico (Figura 5), que mostra o tamanho amostral em função do poder estatístico.

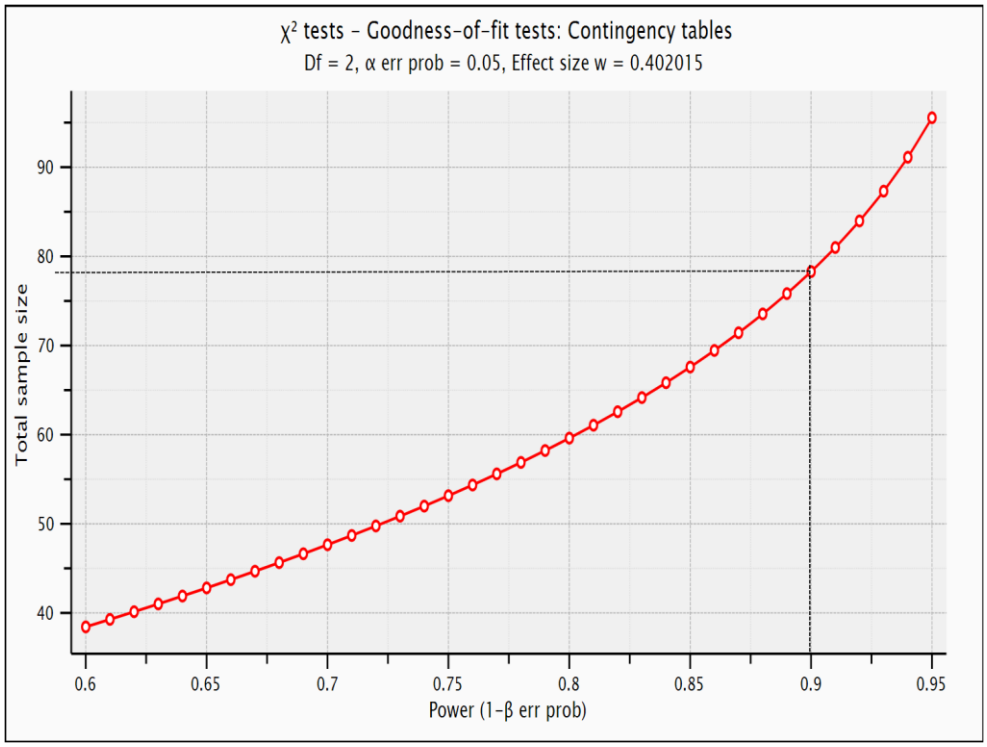


Figura 5: Tamanho amostral em função do poder estatístico do teste

Para a circunstância da prevalência de microdeleções em homens inférteis (aproximadamente 5%) e na população em geral (estimado em 1%, apenas para permitir comparação) que corresponde a um tamanho de efeito (w) de 0,402015, foi possível observar que para um poder de 90%, seriam necessários no mínimo 76 indivíduos no total, sendo distribuídos igualmente entre os grupos (38 casos e 38 controles).

3.3 **Coleta de sangue periférico**

Foram coletados de cada indivíduo participante do estudo 5 mL de sangue periférico em tubo contendo o anticoagulante ácido etilenodiaminotetra-acético (EDTA), para a extração de DNA genômico

3.3.1 **Extração de DNA**

A extração do DNA genômico foi realizada por kit comercial (*QIAamp DNA Blood Mini Kit* – Qiagen®), seguindo a metodologia descrita pelo fabricante. Em um tubo cônico foram adicionados a Protease e o sangue periférico total. Após homogeneização, foi adicionado o *Buffer AL* e o tubo incubado a 70°C. A seguir foi adicionado o Etanol Absoluto (*Merck*®), e a solução foi transferida para a coluna de extração e centrifugada. Ao término, a coluna foi removida, o filtrado descartado e a coluna recolocada no tubo. O *Buffer AW1* foi adicionado e o tubo centrifugado. A seguir, o *Buffer AW2* foi adicionado, e o tubo novamente centrifugado. A coluna foi retirada do tubo, colocadada em novo tubo estéril, e o *Buffer AE* pipetado na membrana da coluna. A amostra foi incubada em termperatura ambiente, para posterior centrifugação. Ao final, a solução foi transferida para microtubo e a análise da qualidade e pureza determinada pela absorbância lida por espectrofotômetro *Nanodrop ND-2000* (Thermo Fisher®). A concentração final do DNA foi ajustada para 100 ng/µL e a pureza do DNA foi confirmada pelas razões A_{260nm}/A_{280nm} e A_{260nm}/A_{230nm}, considerando-se aceitáveis valores de 1.8 e 2.0-2.2; respectivamente.

3.4 **STS-PCR**

A pesquisa das microdeleções nas regiões AZFa, AZFb e AZFc foi realizada por PCR utilizando os STSs mais comumente deletados (Tabela 3), descritos como padrão (Simoni et al., 2004). Os marcadores SRY e ZFY de Yp foram utilizados como controles positivos internos da reação. Para cada reação de PCR foi utilizado, como controle positivo, um homem fértil e como controle negativo uma mulher.

3.4.1 **Protocolo de STS-PCR**

As amplificações foram obtidas em condições padrões para PCR *Master Mix (Promega Corp* ®), seguindo as instruções do fabricante. Para cada região alvo de cada paciente foi confeccionado um microtubo contendo Master Mix, água ultrapura (*Nuclease Free Water, Promega*®), o *primer* específico e o DNA.

As condições de PCR foram: desnaturação inicial a 94°C (5 minutos), seguidos de 28 ciclos de desnaturação a 94°C (1 minuto), anelamento dos *primers* à temperatura específica para cada um (Tabela 3) (1 minuto), e extensão a 72°C (1 minuto). A extensão final foi a 72°C (5 minutos) (Simoni et al., 2004).

Tabela 3: STSs utilizados para a análise molecular do cromossomo Y

STSs/ Locus	Posição Cromossômica	Região	Primers	Amplicon (pb)	Temp. Anelamento dos primers
sY84 DYS273	Yq11.21	AZFa	AGA AGG GTC TGA AAG CAG GT GCC TAC TAC CTG GAG GCT TC	326	58°C
sY86 DYS148	Yq11.21		GTG ACA CAC AGA CTA TGC TTC ACA CAC AGA GGG ACA ACC CT	320	58°C
sY127 DYS218	Yq11.223	AZFb	GGC TCA CAA ACG AAA AGA AA CTG CAG GCA GTA ATA AGG GA	274	57°C
sY134 DYS224	Yq11.223		GTC TGC CTC ACC ATA AAA CG ACC ACT GCC AAA ACT TTC AA	301	57°C
sY254 DAZ	Yq11.223	AZFc	GGG TGT TAC CAG AAG GCA AA GAA CCG TAT CTA CCA AAG CAG C	380	56°C
sY255 DAZ	Yq11.223		GTT ACA GGA TTC GGC GTG AT CTC GTC ATG TGC AGC CAC	126	56°C
ZFY	Yp11.31	Yp	ACC ACT GTA CTG ACT GTG ATT ACA C GCA CTT CTT TGG TAT CTG AGA AAG T	495	55°C
sY14 **SRY**	Yp11.31	Yp	GAA TAT TCC CGC TCT CCG GA GCT GGT GCT CCA TTC TTG AG	472	55°C

STS: *sequence tagged site* (marcadores monomórficos moleculares específicos); pb: pares de bases. Adaptado de (Simoni et al., 2004; Krausz et al., 2014).

Os produtos de PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 2,0% corado com corante intercalante de DNA, o Gel Red® (Biotium, CA, EUA), a aproximadamente 100V. Para análise dos resultados foi utilizado o sistema de fotodocumentação com captura ultra-violeta (UV) MiniBis 20 Pro (DNS Bio-Imaging Systems Ltd., Israel).

A presença das bandas correspondentes às sub-regiões analisadas indica que os pacientes não apresentam deleção (Figura 6). A ausência destas bandas indica a ocorrência de microdeleções nestas áreas (Figura 7 e Figura 8).

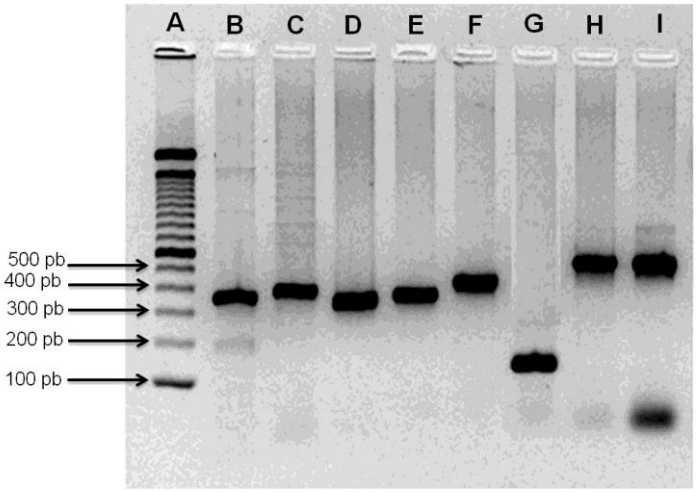


Figura 6: Eletroforese em gel de agarose a 2% das regiões do cromossomo Y analisadas de um paciente sem microdeleção

Legendas: A- Padrão de peso molecular de 100 pb; B- Região SY84 (326pb) presente; C- Região SY86 (320 pb) presente; D-Região SY127 (274 pb) presente; E- Região SY134 (301 pb) presente; F- Região SY254 (380 pb) presente; G- Região SY255 (126 pb) presente; H- Região SRY (472 pb) presente; I-Região ZFY (495 pb) presente.

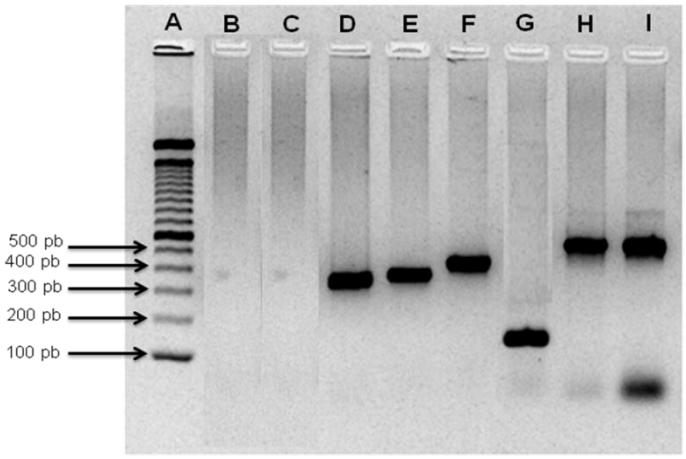


Figura 7: Eletroforese em gel de agarose a 2% de um paciente com microdeleção nas regiões SY84 e SY86

Legendas: A- Padrão de peso molecular de 100 pb; B- Região SY84 (326pb) *ausente*; C- Região SY86 (320 pb) *ausente*; D-Região SY127 (274 pb) presente; E- Região SY134 (301 pb) presente; F- Região SY254 (380 pb) presente; G- Região SY255 (126 pb) presente; H- Região SRY (472 pb) presente; I-Região ZFY (495 pb) presente.

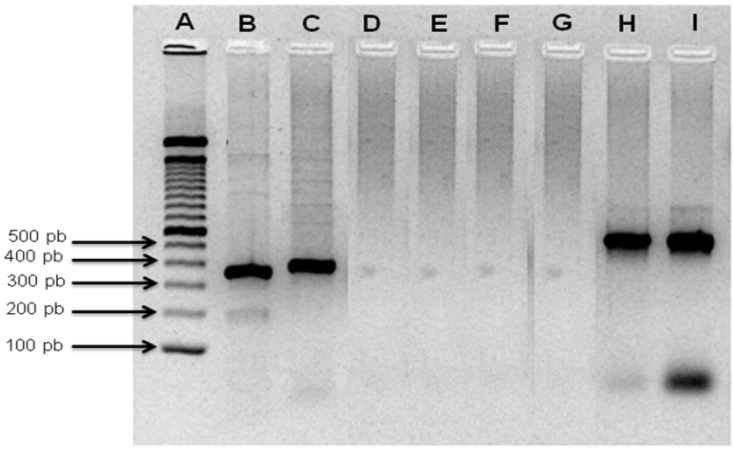


Figura 8: Eletroforese em gel de agarose a 2% de um paciente com microdeleção nas regiões SY127, SY 134, SY 254 e SY255
Legendas: A- Padrão de peso molecular de 100 pb; B- Região SY84 (326pb) presente; C- Região SY86 (320 pb) presente; D-Região SY127 (274 pb) *ausente*; E- Região SY134 (301 pb) *ausente*; F- Região SY254 (380 pb) *ausente*; G- Região SY255 (126 pb) *ausente*; H- Região SRY (472 pb) presente; I-Região ZFY (495 pb) presente.

3.5 **Reações de MLPA**

A técnica de MLPA analisa o número de cópias de até 45 sequências genômicas em um único experimento, detectando deleções e duplicações em vários genes (Schouten et al., 2002). Ela é realizada basicamente em quatro etapas: 1) Denaturação do DNA e das sondas de MLPA e hibridação de ambos; 2) Reação de Ligação entre as duas partes da sonda; 3) Reação de PCR; 4) Separação dos produtos amplificados por eletroforese capilar. Em seguida é realizada a análise dos dados por *software* específico (Figura 9).

A MLPA tem uma característica diferencial que é a amplificação das sondas que se ligaram ao DNA, e não das sequências genômicas. Estas sondas são compostas por duas partes, sendo a primeira “curta” (composta por nucleotídeos sintéticos) e a segunda “longa” (derivada de um bacteriófago M13). Cada sonda

curta tem uma sequência alvo específica de 21 a 30 nucleotídeos (nt) na extremidade 3´ e uma sequência comum de 19 nt idêntica ao *primer* na extremidade 5´(Figura 10).

As sondas longas tem um tamanho de 80 a 420 nt no total, e são compostas por uma sequência alvo específica (25 a 43 nt) no final 5´, uma sequência complementar ao *primer* não marcado comum para todas as sondas longas (36 nt), e entre estas duas, uma sequência *Stuffer* de tamanho variado (19-370 nt), que por esta diferença de tamanho, permite-nos diferenciar uma sonda de outra (Figura 10) (Schouten et al., 2002; Sørensen et al., 2008).

Estas sondas hibridam em locais adjacentes no DNA e são unidas entre si por uma enzima denominada ligase, formando uma molécula única (que será amplificada por PCR). Uma vez que esta molécula única possui 2 sequências de *primer* universal em suas extremidades, a reação de amplificação das sondas ocorre simultaneamente e a quantidade relativa destas moléculas corresponde ao número de cópias das sequências de interesse dentro da amostra (Schouten et al., 2002; Vorstman et al., 2006; Sørensen et al., 2008).

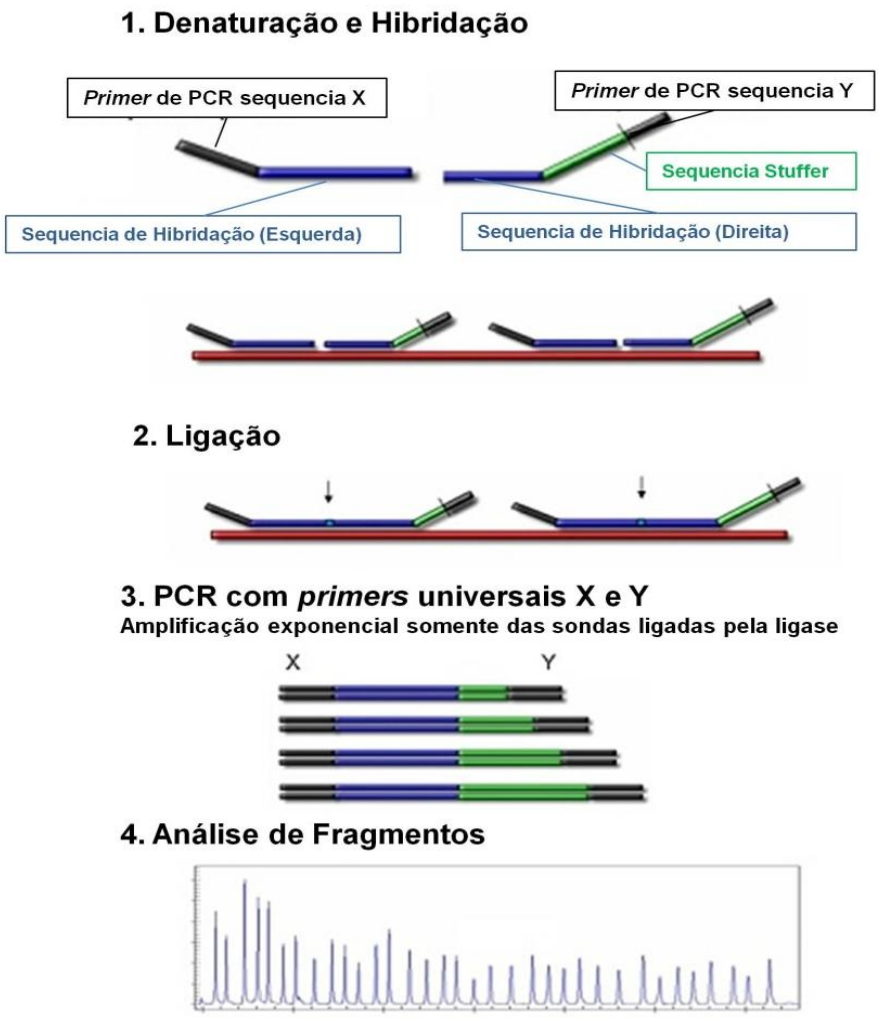


Figura 9: Representação esquemática da técnica de MLPA
Etapa 1-Denaturação e Hibridização; Etapa 2- Ligação; Etapa 3- PCR com primer X e Y universais; Etapa 4- Análise dos fragmentos gerados.
Adaptado de (Schouten et al., 2002).

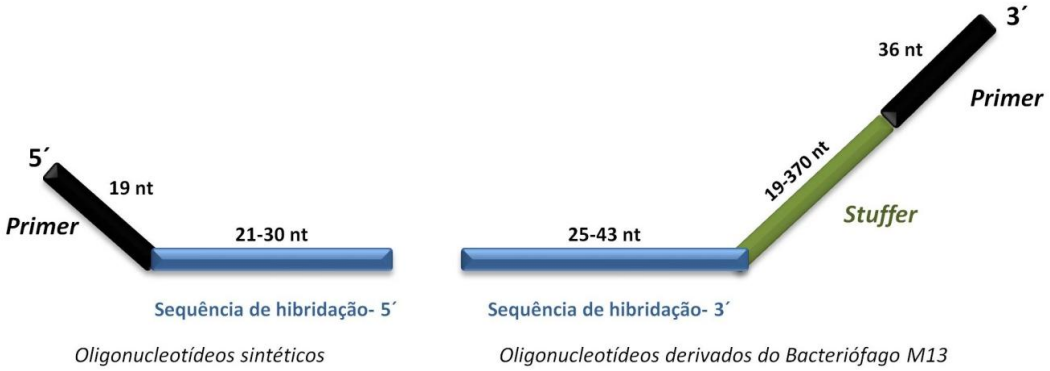


Figura 10: Representação esquemática da constituição das sondas de MLPA
Sequências específicas para hibridação (azul), *Primers* universais (preto), Sequência Stuffer (verde).
Nota: a sequência *Stuffer* e os *primers* não se ligam ao DNA.
Modificado de *www.mlpa.com*

Para que seja possível diferenciar uma sonda de outra em um mesmo experimento, cada uma delas possui uma sequência (*Stuffer*) de tamanho único, e sendo assim, cada produto amplificado (*amplicon*) terá um tamanho diferente, variando entre 130 a 480 pb. Ao término da reação, estes produtos de amplificação serão separados por eletroforese capilar (Schouten et al., 2002).

Foi utilizado o kit comercial P360 versão B1 *(SALSA MLPA probemix P360- Y Chromosome Microdeletions, MRC Holland MLPA®*) nas reações, que possibilitou a detecção de microdeleções no cromossomo Y (Tabela 4). Este kit avalia 16 sondas para a região AZFa, 15 sondas para AZFb e 12 sondas para AZFc (com produtos de amplificação variando de 130 a 507 nt), sendo que com a técnica de STS-PCR avaliamos duas regiões para AZFa, duas regiões para AZFb e duas regiões para AZFc.

As reações também continham nove fragmentos de controle, gerando produtos menores de 120 nt, sendo que quatro fragmentos controlam quantidade de DNA (*Q-fragments,* que somente são visíveis quando a amostra tiver menos que 100 ng de DNA; de tamanhos 64, 70, 76 e 82 nt); três fragmentos que avaliam a denaturação do DNA (*D-fragments*, sinais abaixo de 88 ou 96 nt indicam denaturação incompleta); além de um fragmento específico de X (de 100 nt) e um de Y (105 nt). Além destes fragmentos de controle de reação, havia ainda mais 12 sondas controle, localizadas em cromossomos autossômicos distintos (Tabela 5).

Tabela 4: Sondas de MLPA (kit P360-B1, MRC-Holland) e STSs utilizados na PCR, em relação à sua posição cromossômica, no HG18

Região	*Sonda MLPA*	*Genes / STS*	*Código da Sonda MLPA*	*Posição Cromossômica*	*Início**	*Final**	*Tamanho Fragmento MLPA (nt)*
					(NCBI36.1/hg18)		
Yp		**SRY (PCR)**		**Yp11.31**	**2 715 096**	**2 715 586**	_
	1	SRY	01023-L28750	Yp11.31	2 715 484	2 715 561	279
		ZFY (PCR)		**Yp11.31**	**2 907 453**	**2 907 948**	_
AZFa	2	RPS24P1	20393-L28553	Yq11.21	12 836 971	12 837 051	315
	3	RPS24P1	15239-L18627	Yq11.21	12 865 189	12 865 256	227
	4	ARSEP	11818-L28545	Yq11.21	12 992 866	12 992 931	250
		SY86 (PCR)	_	***Yq11.21***	***13 117 483***	***13 117 972***	_
	5	USP9Y	15244-L28758	Yq11.21	13 138 483	13 138 546	372
	6	USP9Y	11826-L28756	Yq11.21	13 276 711	13 276 793	336
		SY84 (PCR)	_	***Yq11.21***	***13 299 419***	***13 299 764***	_
	7	USP9Y	11821-L12616	Yq11.21	13 407 569	13 407 644	256
	8	DDX3Y	11816-L12611	Yq11.21	13 536 308	13 536 387	234
	9	DDX3Y	13061-L28753	Yq11.21	13 538 364	13 538 442	308
	10	UTY	11828-L19232	Yq11.221	13 869 448	13 869 523	350
	11	UTY	20392-L28932	Yq11.221	13 924 163	13 924 248	328
	12	UTY	11812-L13342	Yq11.221	14 225 643	14 225 712	215
	13	BPY1	15243-L28903	Yq11.221	14 384 639	14 384 715	342
	14	VCY1B	15238-L17485	Yq11.221	14 546 054	14 546 132	184
	15	VCY1B	11852-L18631	Yq11.221	14 699 793	14 699 865	405
	16	VCY1B	20394-L18629	Yq11.221	14 858 748	14 858 817	356
	17	NLGN4Y	11853-L12650	Yq11.221	15 068 284	15 068 356	463
AZFb	18	CDY2B	15236-L17486	Yq11.221	18 076 016	18 076 088	160
	19	CDY2A	20673-L18625	Yq11.222	18 573 809	18 573 884	220
	20	CDY2A	15245-L28543	Yq11.222	18 573 938	18 574 020	240
	21	CDY2B	11759-L28751	Yq11.221	19 067 387	19 067 457	291
	22	HSFY1	15247-L18630	Yq11.222	19 164 461	19 164 536	400
	23	HSFY1	12740-L18632	Yq11.222	19 248 882	19 248 954	436
	24	HSFY1	11772-L12555	Yq11.222	19 269 977	19 270 049	411
	25	KDM5D	11754-L28544	Yq11.222	19 953 712	19 953 798	245
	26	KDM5D	11776-L12559	Yq11.222	20 541 592	20 541 670	445
	27	KDM5D	11747-L12530	Yq11.223	20 619 533	20 619 614	208
	28	KDM5D	20390-L28749	Yq11.223	20 639 107	20 639 189	274
		SY127 (PCR)	_	***Yq11.223***	***20 979 747***	***20 980 130***	_
	29	EIF1AY	15249-L28507	Yq11.223	21 054 536	21 054 616	499
	30	EIF1AY	11734-L12517	Yq11.223	21 078 671	21 078 740	136

		SY134 (PCR)	_	***Yq11.223***	***21 965 335***	***21 965 794***	_
	31	RBMY1J	11774-L28902	Yq11.223	22 834 819	22 834 897	427
	32	RBMY1J	11757-L28748	Yq11.223	22 841 239	22 841 324	263
AZFc	33	BPY2	11773-L12556	Yq11.223	23 282 390	23 282 468	418
	34	BPY2	11739-L13811	Yq11.223	23 282 929	23 283 010	166
	35	BPY2	11740-L14251	Yq11.223	23 284 612	23 284 693	178
	36	BPY2	15248-L17487	Yq11.223	23 327 257	23 327 332	486
	37	BPY2	11768-L28759	Yq11.223	23 376 453	23 376 527	378
		SY254 (PCR)	_	***Yq11.223***	***23 725 581***	***23 725 960***	_
	38	DAZ2	12738-L14632	Yq11.223	23 931 535	23 931 595	284
	39	DAZ2	11761-L28752	Yq11.223	24 029 522	24 029 604	301
	40	DAZ2	11758-L28912	Yq11.223	24 271 548	24 271 629	267
	41	CDY1B	15246-L28757	Yq11.223	24 467 621	24 467 702	364
		SY255 (PCR)	_	***Yq11.223***	***25 408 831***	***25 408 954***	_
	42	PPP1R12BP	12733-L14796	Yq11.23	26 891 166	26 891 229	142
	43	RBMY2DP	15241-L12617	Yq11.23	26 979 534	26 979 606	391

*: distância (em nucleotídeos) do telômero do braço curto do cromossomo Y até o início da sonda ou região SY.

Nota: As regiões analisadas por PCR são justapostas às analisadas por MLPA.

Tabela 5: Sondas Controle localizadas em outros cromossomos para confirmação da reação do kit P360-B1 (MRC-Holland)

Sondas Controle	Posição Cromossômica	Gene	Início*	Final*	Tamanho Fragmento
			NCBI36.1/hg18		
44	1p34.3	GJB3	35 019 690	35 019 746	154
45	4p13	ATP8A1	42 278439	42 278 509	130
46	5q22.1	WDR36	110 491 072	110 491 144	196
47	6p25.1	NRN1	5 947 638	5 947 698	190
48	8q24.13	HAS2	122 696 279	122 696 342	454
49	9q34.13	SETX	134 143 375	134 143 438	172
50	10p14	UPF2	12 018 627	12 018 695	471
51	11p13	LMO2	33 870 246	33 870 309	382
52	13q12.11	ZMYM2	19 499 384	19 499 449	148
53	14q11.2	RPGRIP1	20 872 602	20 872 681	507
54	16q13	SLC12A3	55 459 531	55 459 592	202
55	21q22.13	KCNJ6	38 210 496	38 210 560	295

*: distância (em nucleotídeos) do telômero do braço curto do cromossomo até o início da sonda.

3.5.1 **Protocolo de MLPA**

As reações de MLPA foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante (MRC-Holland®), com a colaboração do Laboratório de Citogenômica do HCFMUSP.

Para a fase de denaturação e hibridação, os DNAs genômicos foram adicionados a microtubos, que foram posicionados no termociclador *Mastercycler Nexus Gradient (Eppendorf®*) para denaturar o DNA a 98°C. A seguir houve um resfriamento (a 25°C), e durante este período, foi confeccionada uma combinação contendo, para cada amostra, o tampão (SALSA MLPA *Buffer*), a *probemix* (específica do kit P360) e a água ultrapura (*Nuclease-Free Water,* Qiagen®). Com o termociclador ajustado para 25°C, foi adicionado 1 µL da mistura por tubo e incubado (1 minuto a 95°C e 3 horas a 60°C) para a hibridação.

Após a hibridação das sondas de MLPA ao DNA, foi realizada a ligação entre as duas metades das sondas. Para esta fase, foi preparada uma misutra contendo, por tubo, o *Ligase Buffer A*, o *Ligase Buffer B*, a água ultrapura (*Nuclease-Free Water,* Qiagen®), e a *SALSA Ligase-65*. Em cada amostra no termociclador (à temperatura de 54°C) foram adicionados 8 µL da mistura descrita. As amostras foram incubadas a 54°C por 15 minutos, 98°C por 5 minutos e mantidas a 20°C.

Na terceira etapa, os reagentes para a reação de PCR foram adicionados para que a amplificação dos fragmentos unidos pela ligase ocorresse. Para isto, foi preparada uma mistura contendo o *SALSA PCR Primer*

Mix, a água ultrapura (*Nuclease-Free Water*, Qiagen®) e a enzima *SALSA Polymerase* e para cada tubo foram distribuídos 5 µL. Os tubos foram acondicionados em termociclador sob as seguintes condições: 35 ciclos de 98°C por 30 segundos, 60°C por 30 segundos e 72°C por 1 minuto, seguidos de extensão final a 72°C por 20 minutos. Os produtos amplificados foram armazenados em freezer -20°C até a preparação das placas para eletroforose capilar.

Para o preparo das placas, foi feita a diluição de 1µL de produto amplificado para 9µL de água ultrapura. Desta diluição, foi adicionado em cada poço da placa *MicroAmp® Fast Optical 96-Well Reaction Plate* (*Applied Biosystems®*) 1 µL, juntamente com 9 µL de formamida (*HiDi® Formamide, Applied Biosystems®*) e 0,075 µL de *GeneScan® 600 LIZ® dye Size Standard v2.0 (Applied Biosystems®*).

Antes da leitura dos fragmentos no sequenciador, os produtos amplificados foram denaturados a 98°C por 5 minutos e em seguida colocados em gelo para manter as fitas separadas.

A leitura das amostras foi feita por sequenciador automático ABI 3500 *Genetic Analyzer* contendo 8 capilares (*Applied Byosistems®*) da Rede de Equipamentos Multiusuários do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (nos laboratórios do InCor e Genômica Pediátrica LIM 36/FMUSP), de acordo com os parâmetros específicos para MLPA (Tabela 6), e os dados gerados (arquivos com extensão ".fsa") foram analisados por *software* específico.

Tabela 6: Parâmetros de corrida necessários para analisar fragmentos no equipamento de eletroforese capilar ABI 3500

Parâmetros – ABI 3500	
Temperatura do Equipamento	60°C
Tempo de corrida	2700 segundos
Voltagem da corrida	15 kV
Tempo de pré-corrida	180 segundos
Voltagem da pré-corrida	15 kV
Tempo de injeção	15 segundos
Voltagem de injeção	1,6 kV

3.5.2 **Análise dos resultados de MLPA**

Por ser uma técnica semi-quantitativa que permite detectar alterações no número de cópias de uma dada região genômica em relação aos controles, todas as reações de MLPA tiveram como controle amostras de homens férteis (saudáveis), além de uma amostra “branca” (tubo contendo água ultra-pura ao invés de amostra de DNA), para verificar a possível presença de contaminantes na reação. Na amostra “branca”, apenas devem aparecer os fragmentos Q, pois os quatro fragmentos Q não precisam da reação de ligação para ser amplificado, e já apresentam ambas as sequências dos *primers* em sua molécula.

A análise dos resultados de MLPA foi realizada utilizando o *software* GeneMarker® v.2.2.0 (Softgenetics, PA - *www.softgenetics.com*), com o painel contendo os perfis das posições esperadas de cada fragmento do kit P360, disponibilizado pela empresa MRC-*Holland* (*www.mlpa.com*). Posteriormente, a análise foi confirmada utilizando o software gratuito específico para reações de MLPA*, Coffalyser.Net* (*www.mlpa.com*), disponível pela mesma empresa.

Para que a análise fosse possível, foram feitas normalizações comparativas nas amostras avaliadas em uma mesma corrida: *intra-amostra*

(normalização por sondas controle internas), na qual foi feita a comparação dos picos das sondas de interesse com os picos das sondas de referência (que detectam sequências que tenham o número normal de cópias esperado em todas as amostras); e *inter-amostra* (normalização de população), no qual o padrão de pico da amostra de interesse é comparado à média do padrão de pico das amostras controle normal incluídas na corrida. Sendo assim, detectamos sinais alterados que possam indicar deleção ou duplicação nas sequências de interesse (http://www.mlpa.com).

A análise foi realizada comparando a altura do pico de cada produto amplificado, refletindo o número de cópias relativo a cada sequência. Foram considerados resultados anormais se o pico relativo foi menor de 0,75 (deleção) ou maior de 1,25 (duplicação), e normais quando o pico foi igual a 1 (número de cópias dissômico). O resultado final da análise gerou um gráfico e uma tabela de número de cópias genômicas para o grupo de sondas utilizado no kit (Figura 11).

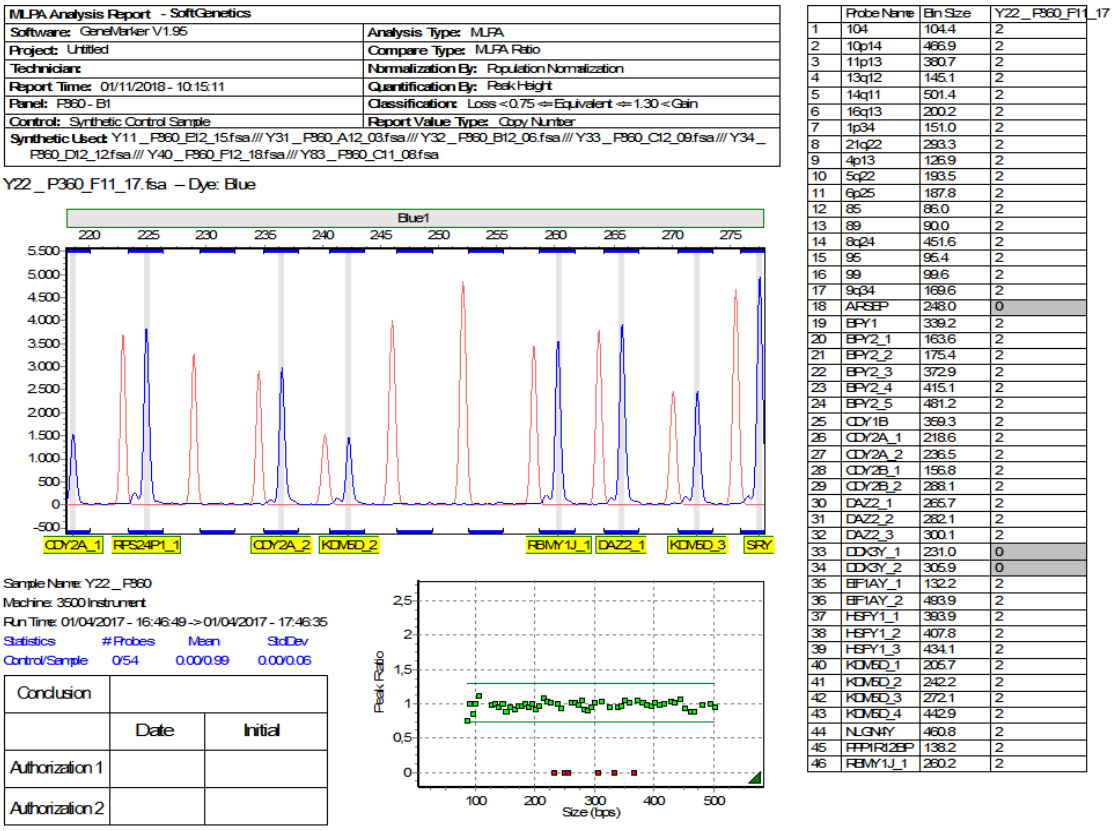


Figura 11: Exemplo de resultado de MLPA

Kit P360 versão B1 analisado pelo software *GeneMarker* mostrando deleção de sondas do cromossomo Y.

Os resultados alterados foram avaliados em reações independentes e comparados aos bancos de dados *DGV*, *DECIPHER* e *Genome Browser* para a identificação de quais CNVs eram benignas e quais eram patogênicas.

3.6 Cultura de Linfócitos de Sangue Periférico

A cultura de linfócitos foi realizada em apenas um paciente (M43), de acordo com a técnica descrita por Moorhead et al. (1960), para a confirmação do

cariótipo e análise de FISH, com a colaboração do Laboratório de Citogenômica do HCFMUSP.

3.6.1 **Protocolo de cultura de Linfócitos**

O sangue total foi semeado em tubo cônico estéril contendo o meio de cultivo PB-MAX® *Karyotyping Medium* (Gibco®). O cultivo foi realizado em incubadora de CO_2 a 5% e temperatura de 37°C por 72 horas. Em seguida, foi adicionada a colchicina (*KaryoMAX COLCEMID*®) à cultura e incubada por 1 hora a 37°C. Posteriormente, o material cultivado foi centrifugado.

O sobrenadante foi desprezado e o sedimento ressuspendido com solução hipotônica (KCl 0,075 M), e o frasco de cultura foi incubado novamente a 37°C por 15 minutos. Passado este período, foi adicionada a solução fixadora gelada (-20°C) constituída de metanol (*Merck*®) e ácido acético glacial (*Merck*®) na proporção 3:1 para interromper a hipotonização. A cultura com a solução fixadora foi homogeneizada e centrifugada e, em seguida, o sobrenadante foi desprezado. Ao *pellet*, foi adicionada a solução fixadora gelada.

Este processo de fixação foi repetido 3 vezes, e com o material obtido (células em solução fixadora) foram preparadas as lâminas para a realização das técnicas de FISH e cariótipo.

As lâminas foram previamente higienizadas com sabão *Extran*® da *Merck*®, que é um detergente não residual, e dispostas inclinadas em um suporte no banho Maria a 90°C. O material de cultivo, já fixado, foi ressuspendido e gotejado na lâmina a uma distância de aproximadamente 90

cm. Após a secagem, as lâminas foram visualizadas sob microscopia com contraste de fase para assegurar a qualidade das culturas e crescimento celular.

3.7 **FISH**

A técnica de FISH permite avaliar sequências específicas de DNA em cromossomos metafásicos ou em núcleos interfásicos após o cultivo de linfócitos em sangue periférico. Para isto, as sondas DNA são marcadas com fluorescência e hibridadas para detectar presença, número e localização de pequenas regiões dos cromossomos (Kurtovic-kozaric et al., 2016).

Basicamente, o DNA e a sonda são denaturados por temperatura elevada, e com uma temperatura adequada (ao redor de 37°C), se as sequências forem complementares, ocorrerá a hibridação entre a sonda e o DNA alvo. Sob microscopia de fluorescência com os filtros adequados, podemos observar a sequência marcada (Pinkel et al., 1986).

Neste estudo foram utilizadas as sondas comerciais "LPE XYc-*Chromosome X α-satellite (DXZ1)* e *Chromosome Y α-satellite (DYZ3) dual labelled" (Cytocell®),* que marca a região de centrômero do cromossomo X em verde, e do Y (centrômero e heterocromatina) em vermelho.

3.7.1 **Protocolo de FISH**

A lâmina previamente preparada com o material do paciente M43 foi tratada com 2x SSC, pH=7,0 por 2 minutos a temperatura ambiente, e então

desidratada em lavagens seriadas com etanol (*Merck*®) a 70%, 85% e 100% por 2 minutos a cada graduação, e seca em temperatura ambiente.

Ao término, a sonda específica foi depositada sobre a lâmina, e esta recoberta com lamínula. Após, a lâmina foi colocada sobre placa aquecida a 75°C e o material denaturado por 3 minutos.

Com o DNA do paciente e a sonda denaturados, a lâmina foi vedada com plástico filme de parafina (*Parafilm M.*®) e armazenada em câmara úmida ao abrigo de luz por 18 horas a 37°C para permitir a hibridação. No dia posterior, o filme plástico e a lamínula foram removidos e a lâmina lavada em solução de 0,4x SSC, pH=7,0 por 2 minutos a 72°C, e em seguida 2x SSC/0,05% *Tween-20* (*Sigma-Aldrich*®) por 30 segundos a temperatura ambiente.

A lâmina foi inclinada para secagem e em seguida foi aplicado o contracorante DAPI *antifade* (4,6-diamidino-2-fenilindol) e então a lâmina pôde ser recoberta com lamínula e observada sob microscópio de epifluorescência *Axio Imager.A2* (*Carl Zeiss AG*®). Foram analisadas 50 células em metáfase e 100 em interfase, e a fotodocumentação foi realizada pelo sistema de captura de imagens *Isis v5.4.7* (*MetaSystems GmbH*).

4 Resultados

Grupo de Estudo: Foram selecionados 43 indivíduos do sexo masculino com azoospermia ou oligozoospermia confirmadas por análise seminal anterior. A idade dos homens variou de 18 a 50 anos, com média de 34,7 (desvio padrão, DP=6,3 e mediana=34). Quanto à etnia, 28 homens eram brancos (65,2%), 10 mulatos (23,2%), 3 negros (7%) e 2 amarelos (4,6%) (Tabela 7).

Dos 43 pacientes do grupo de homens inférteis, 29 eram oligozoospérmicos (67,5%) e 14 azoospérmicos (32,5%) (Figura 12).

Grupo Controle: Foram selecionados 40 homens férteis, com prole constituída.. A idade dos homens variou de 25 a 55 anos, com média de 39 (DP=7,5 e mediana=37). Em sua etnia, o grupo continha 25 homens brancos (62,5%), 12 mulatos (30%) e 3 negros (7,5%) (Tabela 8).

Além disso, foi selecionada uma mulher fértil, com 40 anos, que foi caracterizada como controle negativo das reações, pela ausência de cromossomo Y.

Comparação entre os grupos:

Os homens do grupo de estudo eram significantemente mais jovens do que os do grupo controle (p=0,0055). Não houve diferença significante quando comparadas a etnias entre os grupos (p=0,5) (Teste *t de Student*).

As técnicas de STS-PCR e MLPA foram aplicadas nos 43 pacientes e nos 41 controles, e os resultados finais das reações estão apresentados nos Anexos D e E.

É importante ressaltar que, como mostrado na Tabela 4, as regiões analisadas por PCR e MLPA não são exatamente iguais, e sim justapostas. Considerando a distância entre o telômero do braço curto do cromossomo Y e as sondas ou regiões sY, nota-se que elas estão lado a lado, e não sobrepostas.

4.1 Resultados de STS-PCR

Foram detectadas microdeleções em sete pacientes do grupo de estudo (16,3%), subclassificados entre um em AZFa (14,2%); três em AZFc (42,9%) e três em AZFb e AZFc simultaneamente (42,9%) (Tabela 7). Em relação aos controles, não foi encontrada nenhuma microdeleção (Tabela 8).

Quando subdividimos os pacientes em azoospermia e oligozoospermia, encontramos microdeleções em cinco dos 14 pacientes azoospérmicos (35,7%) e em dois dos 29 pacientes oligozoospérmicos (6,9%) (Figura 12).

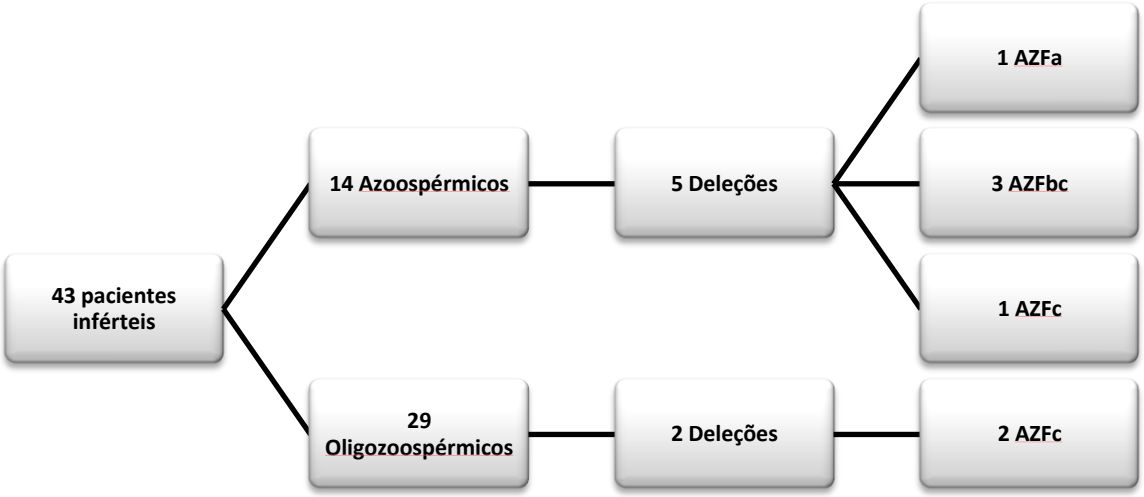


Figura 12: Representação esquemática dos resultados encontrados de Microdeleções do Cromossomo Y pela técnica de STS-PCR

Os indivíduos M3, M18 e M20 apresentaram microdeleções nas regiões SY254 e SY255 de AZFc; os pacientes M5, M23 e M29 possuem microdeleções nas regiões SY127, SY134, SY254 e SY255, indicando microdeleções simultaneamente nas regiões AZFb e AZFc; e o indivíduo M22 possui deletadas as regiões SY84 e SY86, indicando microdeleções na região AZFa.

Tabela 7: Resultados das STS-PCRs e características dos pacientes inférteis

Código	*Análise Seminal*	*Idade*	*Etnia*	*SY84*	*SY86*	*SY127*	*SY134*	*SY254*	*SY255*	*SRY*	*ZFY*
M1	O	40	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M2	A	37	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M3	O	38	M	+	+	+	+	-	-	+	+
M4	O	27	M	+	+	+	+	+	+	+	+
M5	A	38	B	+	+	-	-	-	-	+	+
M6	O	33	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M7	O	30	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M8	O	26	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M9	O	40	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M10	O	27	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M11	O	29	M	+	+	+	+	+	+	+	+
M12	O	45	Am	+	+	+	+	+	+	+	+
M13	O	30	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M14	A	18	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M15	A	34	M	+	+	+	+	+	+	+	+
M16	O	40	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M17	O	47	M	+	+	+	+	+	+	+	+
M18	O	32	M	+	+	+	+	-	-	+	+
M19	O	31	N	+	+	+	+	+	+	+	+
M20	A	50	N	+	+	+	+	-	-	+	+
M21	O	32	N	+	+	+	+	+	+	+	+
M22	A	40	Am	-	-	+	+	+	+	+	+
M23	A	25	B	+	+	-	-	-	-	+	+
M24	O	41	M	+	+	+	+	+	+	+	+
M25	A	32	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M26	O	33	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M27	O	39	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M28	O	37	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M29	A	37	B	+	+	-	-	-	-	+	+
M30	O	28	M	+	+	+	+	+	+	+	+
M31	O	35	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M32	O	40	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M33	O	35	M	+	+	+	+	+	+	+	+
M34	O	32	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M35	A	35	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M36	A	34	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M37	A	33	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M38	O	37	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M39	O	34	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M40	A	40	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M41	O	29	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M42	A	29	B	+	+	+	+	+	+	+	+
M43	O	44	M	+	+	+	+	+	+	+	+

Legendas:

O: Oligozoospérmicos; **A**: Azoospérmicos; **B**: brancos; **M**: mulatos, **Am**: amarelo.

+: região presente (não há microdeleção)

-: região ausente (microdeleção presente).

Tabela 8: Resultados das STS-PCRs e características dos controles

Código	*Análise Seminal*	*Idade*	*Etnia*	*SY84*	*SY86*	*SY127*	*SY134*	*SY254*	*SY255*	*SRY*	*ZFY*
C1	N	33	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C2	N	45	N	+	+	+	+	+	+	+	+
C3	N	37	M	+	+	+	+	+	+	+	+
C4	N	25	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C5	N	37	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C6	N	36	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C7	N	42	M	+	+	+	+	+	+	+	+
C8	N	35	M	+	+	+	+	+	+	+	+
C9	N	50	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C10	N	48	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C11	N	52	M	+	+	+	+	+	+	+	+
C12	N	32	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C13	N	47	M	+	+	+	+	+	+	+	+
C14	N	35	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C15	N	41	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C16	N	42	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C17	N	49	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C18	N	37	N	+	+	+	+	+	+	+	+
C19	N	33	M	+	+	+	+	+	+	+	+
C20	N	49	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C21	N	43	M	+	+	+	+	+	+	+	+
C22	N	36	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C23	N	34	M	+	+	+	+	+	+	+	+
C24	N	49	M	+	+	+	+	+	+	+	+
C25	N	45	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C26	N	46	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C27	N	27	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C28	N	31	N	+	+	+	+	+	+	+	+
C29	N	39	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C30	N	35	M	+	+	+	+	+	+	+	+
C31	N	55	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C32	N	29	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C33	N	34	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C34	N	41	M	+	+	+	+	+	+	+	+
C35	N	34	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C36	N	40	M	+	+	+	+	+	+	+	+
C37	N	30	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C38	N	47	M	+	+	+	+	+	+	+	+
C39	N	30	B	+	+	+	+	+	+	+	+
C40	N	33	B	+	+	+	+	+	+	+	+
CF	-	40	B	-	-	-	-	-	-	-	+

Legendas:

N: Normozoospérmicos; **CF**: Controle Feminino; **B**: branco; **M**: mulato.

+: região presente (não há microdeleção)

- : região ausente (microdeleção presente).

4.2 Resultados de MLPA

Os pacientes e controles foram analisados por MLPA para investigar o número de cópias dos genes de interesse (Tabela 9 e Tabela 10).

Todos os pacientes que possuíam microdeleções diagnosticadas por STS-PCR também apresentaram microdeleções por MLPA. Além destes, encontramos deleções em mais dois pacientes, contabilizando nove deleções (21%). Além das deleções, encontramos cinco duplicações nos pacientes (11,6%) (Figura 13).

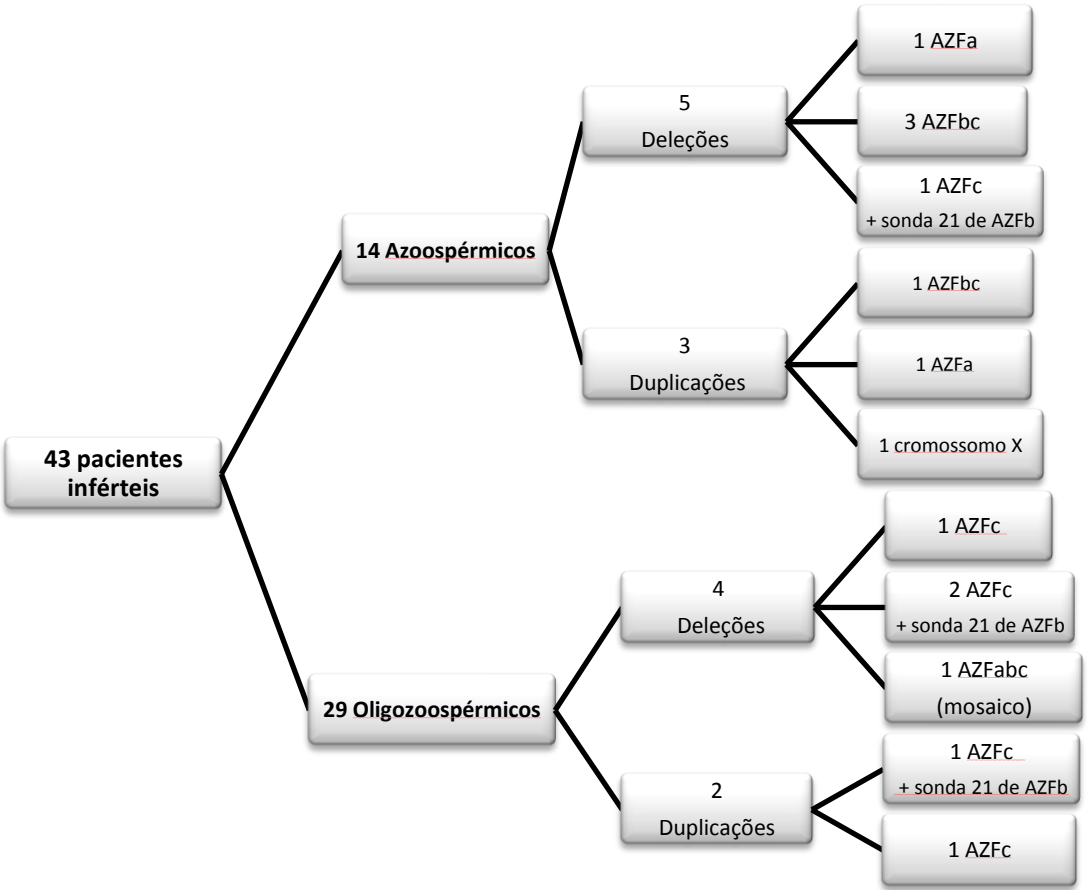


Figura 13: Representação esquemática dos resultados encontrados de microdeleções do cromossomo Y pela técnica de MLPA

Tabela 9 : Resultados da MLPA do grupo de estudo, evidenciando deleções (em vermelho e laranja) e duplicações (em azul e verde)

Paciente	Resultados (CNV) - Sondas					Genes envolvidos
	Normal (x2)	Deleção (x0)	Deleção (x1)	Dupli-cação (x4)	Duplica-ção(x3)	
M1	X					
M2	X					
M3		33-37, 40, 41	20, 21, 38, 39			BPY2, DAZ2, CD1YB, CDY2A, DAZ2
M4	X					
M5		22-37	19-21, 38-41			HSFY1, KDM5D, EIF1AY. RBMY1J, BPY2, CDY2A, CDY2B, CDY1B, DAZ2
M6	X					
M7					36-41	BPY2, DAZ2, CDY1B
M8	X					
M9	X					
M10	X					
M11	X					
M12	X					
M13	X					
M14					21, 37-41	CDY2A, BPY2, DAZ2, CDY1B
M15	X					
M16	X					
M17		33-35	21, 36, 37, 40, 41			BPY2, CDY2A, BPY2, DAZ2, CDY1B
M18		33-37, 40-41	21, 38, 39			BPY2, DAZ2, CDY1B, CDY2A, DAZ2
M19	X					
M20		33-37, 40, 41	21, 38, 39			BPY2, DAZ2, CDY1B, CDY2A, DAZ2
M21	X					
M22		4-9				ARSEP, USP9Y, DDX3Y
M23		22-37	19-21, 38-41			HSFY1, KDM5D, EIF1AY, RBMY1J, BPY2, CDY2A, CDY2B, DAZ2, CDY1B
M24	X					
M25	X					
M26	X					
M27	X					
M28					21,36-41	CDY2A, BPY2, DAZ2, CDY1B
M29		22-42	21, 43		1-18	SRY, RPS24P1, ARSEP, USP9Y, DDX3Y, UTY, BPY1, VCY1B, NGLN4Y, CDY2B, HSFY1, KDM5D, EIF1AY, RBMY1J, BPY2, DAZ2, CDY1B, PPP1R12BP, CDY2A, RBMY2DP
M30	X					
M31	X					
M32	X					
M33	X					
M34	X					
M35	X					
M36	X					
M37					**X** (Sonda Controle)	47, XXY: Sindrome de Klinefelter
M38	X					
M39	X					
M40	X					
M41	X					
M42	X					
M43			01-43			Sugestivo de Mosaico

Tabela 10: Resultados da MLPA do grupo controle, evidenciando deleções (em vermelho e laranja) e duplicações (em azul e verde)

Paciente	Resultados (CNV) - Sondas					Genes envolvidos
	Normal (x2)	Deleção (x0)	Deleção (x1)	Dupli-cação (x4)	Duplica-çãol (x3)	
C1	X					
C2	X					
C3	X					
C4	X					
C5	X					
C6	X					
C7	X					
C8	X					
C10	X					
C11	X					
C12	X					
C13	X					
C14	X					
C15	X					
C16	X					
C17	X					
C18	X					
C19	X					
C20	X					
C21	X					
C22	X					
C23	X					
C24	X					
C25	X					
C26	X					
C27					36-40	BPY2, DAZ2
C28	X					
C29				4, 5		ARSEP, USP9Y
C30	X					
C31	X					
C32	X					
C33	X					
C34	X					
C35	X					
C36	X					
C37	X					
C38	X					
C39	X					
C40	X					
CF	X	1-43				Mulher (46, XX): ausência de Y

Foram encontradas deleções nos pacientes M3, M5, M17, M18, M20, M22, M23, M29 e M43; e duplicações nos pacientes M7, M14, M28, M29, M37 (Tabela 9) e também em dois dos controles (C27 e C29) (Tabela 10).

Os pacientes M5, M23 e M29 apresentaram deleção nas regiões AZFbc; o M22 em AZFa e M17, M18 e M20 em AZFc (com mais uma sonda de AZFb deletada) (Figura 14).

Em relação às cinco duplicações, encontramos três pacientes (M7, M14 e M28) com a mesma duplicação em AZFc (envolvendo as sondas 36 a 41), um paciente (M37, Figura 15) com a sonda controle do cromossomo X duplicada (evidenciando a presença da Síndrome de Klinefelter, que se confirmou por cariótipo), e um paciente (M29) com a duplicação de uma sonda do braço curto, além de 17 sondas da região AZFa.

Nos controles, as regiões duplicadas eram AZFc (C27) e AZFa (C29).

No paciente M43, foi encontrada apenas uma cópia de todas as 43 sondas correspondentes a fragmentos de genes ao longo do cromossomo Y (Figura 17). Com este resultado, conjecturamos a presença de um possível mosaicismo.

Para confirmar nossa hipótese, recorremos às técnicas de cariotipagem por bandamento G e FISH para este paciente.

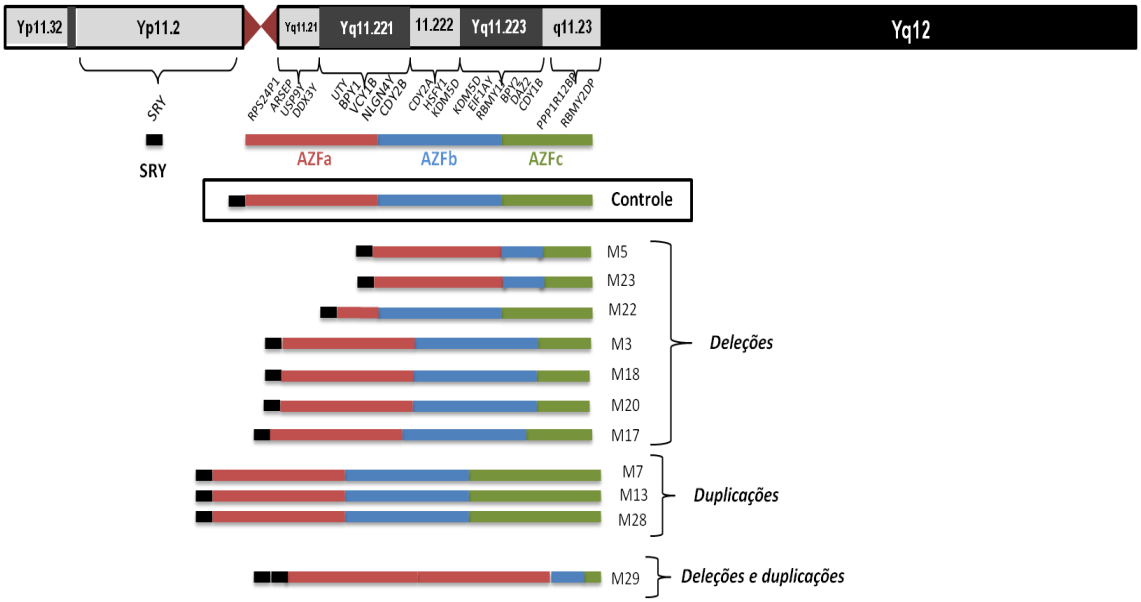
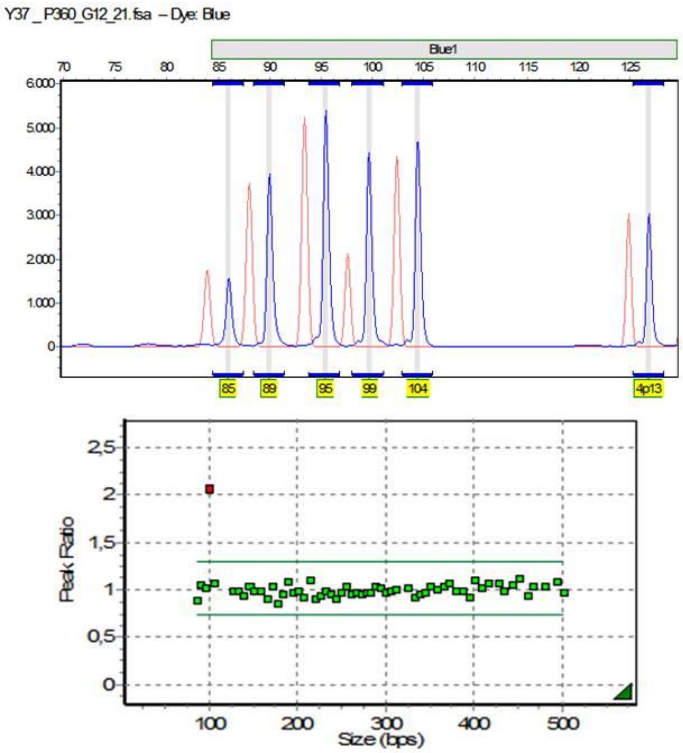


Figura 14: Representação esquemática do cromossomo Y* contemplando as sondas de MLPA

Nota-se em itálico, as sondas correspondentes aos genes e sua localização cromossômica, em vermelho a região AZFa, em azul a AZFb, em verde a AZFc e em preto o SRY. Como controle, representação esquemática de homens que tenham o cromossomo Y íntegro; e abaixo, os pacientes portadores de deleção e duplicação

*Baseado no Genome Browser (https://genome.ucsc.edu)



	Probe Name	Bin Size	Y37 _P360_G12_21
1	104	104.4	2
2	10p14	466.9	2
3	11p13	380.7	2
4	13q12	145.1	2
5	14q11	501.4	2
6	16q13	200.2	2
7	1p34	151.0	2
8	21q22	293.3	2
9	4p13	126.9	2
10	5q22	193.5	2
11	6p25	187.8	2
12	85	86.0	2
13	89	90.0	2
14	8q24	451.6	2
15	95	95.4	2
16	99	99.6	4
17	9q34	169.6	2
18	ARSEP	248.0	2
19	BPY1	339.2	2
20	BPY2_1	163.6	2
21	BPY2_2	175.4	2
22	BPY2_3	372.9	2
23	BPY2_4	415.1	2
24	BPY2_5	481.2	2
25	CDY1B	359.3	2
26	CDY2A_1	218.6	2
27	CDY2A_2	236.5	2
28	CDY2B_1	156.8	2
29	CDY2B_2	288.1	2
30	DAZ2_1	265.7	2
31	DAZ2_2	282.1	2
32	DAZ2_3	300.1	2
33	DDX3Y_1	231.0	2
34	DDX3Y_2	305.9	2
35	EIF1AY_1	132.2	2
36	EIF1AY_2	493.9	2
37	HSFY1_1	393.9	2
38	HSFY1_2	407.8	2
39	HSFY1_3	434.1	2
40	KDM5D_1	205.7	2
41	KDM5D_2	242.2	2
42	KDM5D_3	272.1	2
43	KDM5D_4	442.9	2
44	NLGN4Y	460.8	2
45	PPP1R12BP	138.2	2
46	RBMY1J_1	260.2	2

Figura 15: Análise dos dados de MLPA do paciente M37, indicando a presença de uma cópia a mais do cromossomo controle X, evidenciando Síndrome de Klinefelter

4.2.1 **Resultado de Cariótipo**

Por bandamento G, foram analisadas 100 metáfases, que mostrou o resultado: 46,X,r(Y)[61]/45,X[39] evidenciando um mosaicismo.

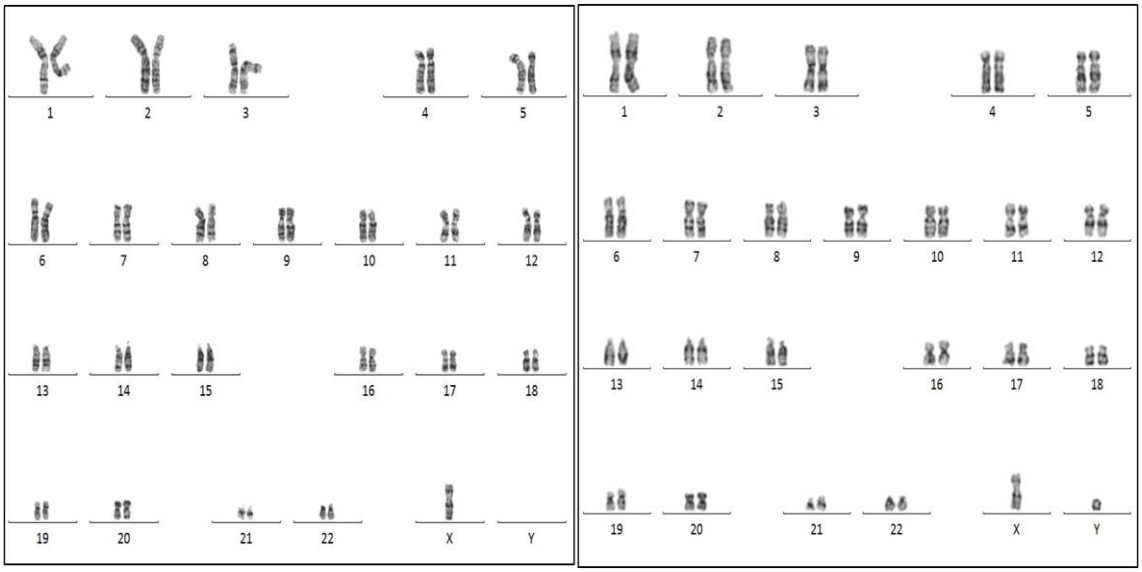


Figura 16: Resultado do cariótipo por bandamento G do paciente M43
À esquerda, a linhagem 45,X e à direita a linhagem 46,Xr(Y)

4.2.2 **Resultado de FISH**

Para a técnica de FISH, utilizamos sondas para os centrômeros de X e Y, LPE 0XYc *alpha satéllite* (Cytocell®). Foram analisadas metáfases e intérfases, confirmando o mosaicismo e revelando quatro linhagens diferentes:

ishX(DXZ1x1,DYZ3x0)[283]/X(DXZ1x1),Y(DYZ3x1)[212]/X(DXZ1x2),Y(DYZ3x0)[2]/X(DXZ1x2),Y(DYZ3x1)[2]

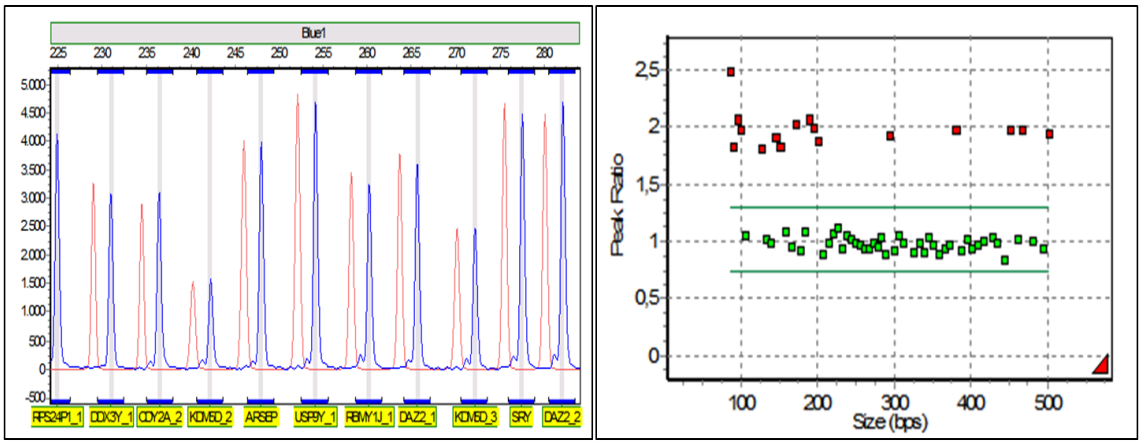


Figura 17: Imagem dos dados obtidos por MLPA do paciente M43, após normatização, sugerindo a presença de mosaicismo para o cromossomo Y

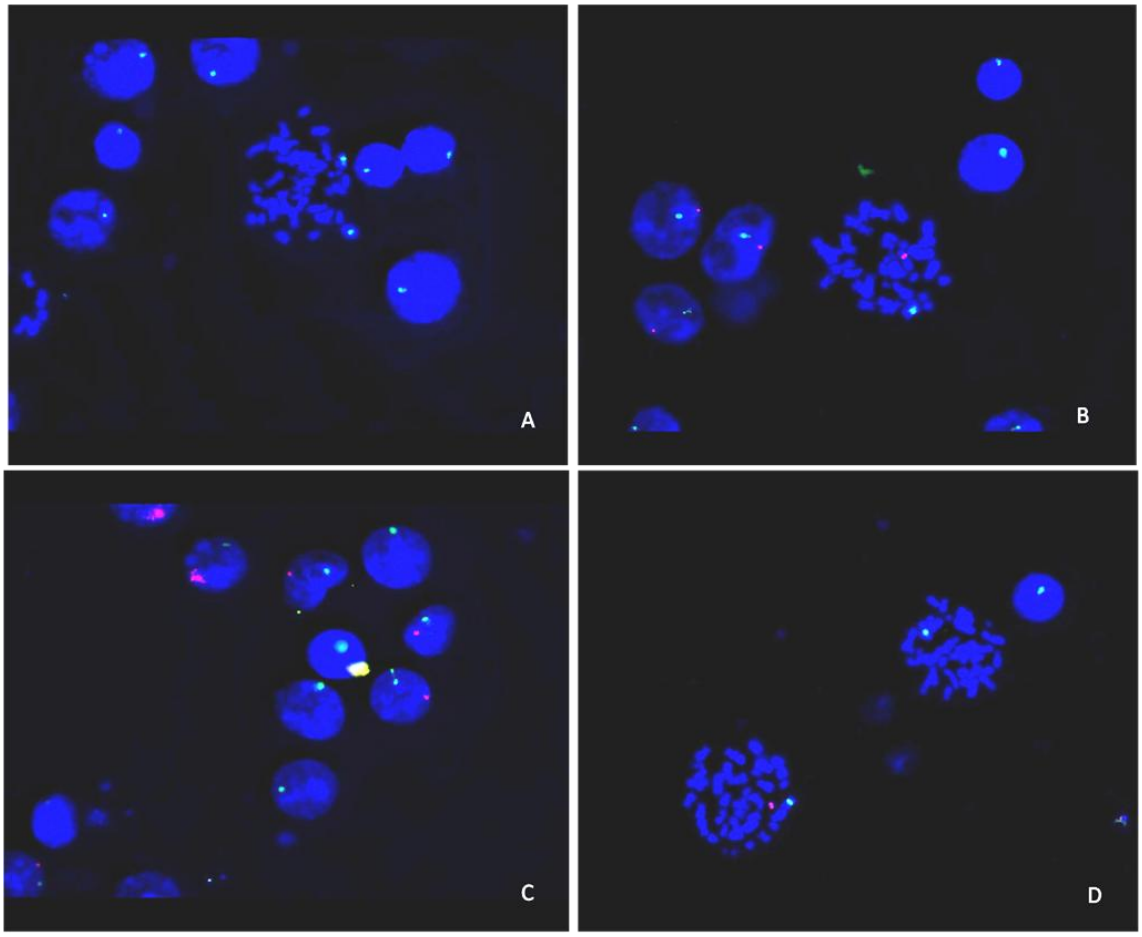


Figura 18: Resultado de FISH do paciente M43, evidenciando o mosaicismo

Sinais em vermelho indicam o cromossomo Y, e em verde o cromossomo X.

ishX(DXZ1x1,DYZ3x0)[283]/X(DXZ1x1),Y(DYZ3x1)[212]/X(DXZ1x2),Y(DYZ3x0)[2]/X(DXZ1x2),Y(DYZ3x1)[2]

4.3 **Análise Estatística:**

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software padrão SPSS (*SPSS for the Social Science*, v. 14 para Windows). O nível de significância adotado foi de 5% ($p < 0,05$).

O risco relativo (RR) e intervalo de confiança (IC) foram calculados.

Dos pacientes azoospérmicos, um apresentou deleção em AZFa (7,1%), três em AZFbc (21,4%) e um em AZFc (7,1%). Dos oligozoospérmicos, dois apresentaram deleção em AZFc (6,9%), e nenhum em AZFa ou b. Sendo assim, o risco relativo de um paciente azoospérmico apresentar deleção em AZFc comparado a um oligozoospérmico pela técnica de PCR é de RR=4,14 (IC95%: 0,86–19,9), porém não significante, por conter o número 1 no intervalo de confiança. Já pela técnica de MLPA, o risco da presença de deleções em AZFc de um paciente azoospérmico é RR=2,76 (IC95%: 0,7 – 10,7) vezes o mesmo risco em pacientes oligozoospérmicos, porém não significante.

Quando comparamos os resultados obtidos por PCR entre as raças dos pacientes, não obtivemos significância (3,11, p=0,37). O mesmo ocorreu com a MLPA (5,2; p=0,15) (Teste exato de Fischer).

Considerando que todos estes pacientes são candidatos a microdissecção testicular para busca de espermatozoides com a finalidade de utilizá-los em Reprodução Assistida, com o resultado da análise de microdeleção do cromossomo Y, tanto por PCR como por MLPA (ambas as técnicas geraram o mesmo número), apenas quatro pacientes (9,3%) não

teriam um bom prognóstico na recuperação de espermatozoides cirurgicamente, por conta de terem diagnosticadas deleções em AZFa ou AZFb.

5 Discussão

A integridade do cromossomo Y é fundamental para que a espermatogênese, a diferenciação e a determinação sexuais dos homens ocorram de forma adequada. Com o advento de novas técnicas moleculares e citogenômicas, as anormalidades do cromossomo Y vem sendo identificadas com mais acurácia, diminuindo assim as alterações patogênicas subdiagnosticadas e melhorando a relação genótipo-fenótipo clínico desses pacientes (Patsalis et al., 2005; Krausz & Casamonti, 2017).

Considera-se que o estudo das microdeleções do cromossomo Y seja extremamente relevante para a compreensão dos mecanismos envolvidos na espermatogênese, uma vez que os indivíduos portadores dessas alterações apresentam alta variabilidade do seu fenótipo clínico, desde hipoespermatogênese até azoospermia (Pandey et al., 2010).

Sabe-se que em gestações após ICSI, originadas de homens inférteis por microdeleção do Y, os descendentes do sexo masculino terão a mesma deleção de seu pai, devido à transmissão patrilinear do cromossomo Y (Saut et al., 2000; Esteves & Agarwal, 2011). Por este motivo, é indispensável a realização do aconselhamento genético para essas famílias.

Até recentemente era consenso na literatura, o fato de que homens com deleções completas de AZFa, AZFb e AZFbc eram azoospérmicos, e sem chance de se obter espermatozoides cirurgicamente (Hopps et al., 2003; Choi

et al., 2004). Porém, desde 2010, foram descritos casos em que portadores de deleções parciais e até totais em AZFb e AZFbc possuíam espermatozoides no ejaculado e exemplos onde foi possível recuperá-los cirurgicamente (Kleiman et al., 2011; Liu et al., 2017a; Stouffs et al., 2017; Zhang et al., 2017), evidenciando claramente a complexidade da associação dessas regiões à infertilidade masculina.

Kleiman e colaboradores (2011) demonstraram que foram encontrados espermatozoides em 7% dos pacientes com deleção total em AZFb e AZFbc e 57% dos pacientes com deleção parcial nas mesmas regiões. Propuseram então uma reavaliação na predição da presença de espermatozoides em homens com estas deleções.

Os estudos publicados até o momento apontam haver variação muito grande na incidência de microdeleções do cromossomo Y dependendo da população estudada de 1 a 55% (van der Ven et al., 1997; Foresta et al., 1998; Quintana-Murci et al., 2001; Krausz et al., 2003). Esta variação pode ser devida à escolha dos marcadores STS, pois quanto maior a disponibilidade de marcadores para análise, maior a chance de se encontrar microdeleções (Martinez et al., 2000). No entanto, outros autores sugerem que fatores ambientais e epigenéticos podem estar intimamente ligados a estas variações (Krausz et al., 2003).

Em nosso estudo, encontramos sete deleções por STS-PCR (16,2%) e nove deleções por MLPA (21%), mostrando que a técnica de MLPA, por gerar mais dados, pode ser mais acurada para este diagnóstico.

Nossos achados corroboram os dados da literatura, associados aos resultados de maior número de regiões deletadas em AZF por MLPA, quando comparados aos achados pela técnica de PCR (Jiang et al., 2012), mesmo em uma população distinta.

Na população brasileira, foram realizados estudos que detectaram 6,7% de microdeleções na cidade de São Paulo (São Pedro et al., 2003) e 7,5% na região sudeste (Pina-Neto et al., 2006).

Nossos dados revelaram uma incidência maior do que as da literatura, de microdeleções nas regiões AZF, possivelmente porque o local em que estes pacientes foram recrutados concentra maior numero de pacientes inférteis, uma vez que estão buscando assistência médica para descobrirem as causas de infertilidade e assim conseguirem realizar o sonho de estabelecer gestação.

Quando subdividimos os pacientes pelo fenótipo clínico, encontramos microdeleção de Y em 35,7% de pacientes azoospérmicos e 13,8% de oligozoospérmicos, estando de acordo com a enorme variação de porcentagem descrita na literatura (10% a 33,4% nos azoospérmicos e 0 a 66% nos oligozoospérmicos) (Raicu et al., 2003; Galletto et al., 2008; Yu et al., 2015).

A alta incidência de microdeleções em AZF pode ser explicada por ser esta uma região rodeada por heterocromatina, que é caracteristicamente uma região com muito DNA repetitivo, o que favorece a recombinação com mutações durante a meiose paterna (Ferrás et al., 2004; Bunyan et al., 2012).

No geral, as microdeleções no cromossomo Y ocorrem *de novo*, ou seja, não são herdadas (Esteves & Agarwal, 2011). Raramente em uma família

a mesma deleção pode causar infertilidade em um só homem. Assim, é possível que homens férteis com deleção em alguma porção das regiões AZF possam ter gerado filhos inférteis (Saut et al., 2000).

Atualmente, a técnica padrão de detecção laboratorial de microdeleções do cromossomo Y é a STS-PCR (Yu et al., 2015), porém, este método em sua investigação clínica inicial está restrita às regiões mais comuns, sendo que as regiões que mais raramente deletadas no geral não são analisadas, e dessa forma alguns pacientes permanecem subdiagnosticados.

Nesse trabalho, utilizando a técnica de MLPA, conseguimos diagnosticar deleções em mais dois pacientes (4,7% a mais) além daqueles detectados por PCR. Também foi possível encontrar outros tipos de alterações genéticas, como duplicações, Síndrome de Klinefelter (47,XXY) e a presença de um mosaicismo importante de deleção do cromossomo Y. Esses resultados não seriam possíveis de se obter utilizando somente a técnica de STS-PCR, pois ela avalia apenas a presença ou ausência do DNA, e não apresenta a mesma acurácia diagnóstica que a MLPA.

Além desses resultados relevantes, também foi possível detectar duplicações: três pacientes apresentaram a mesma duplicação em AZFc (envolvendo as sondas 36 a 41, referentes aos genes *BPY2*, *DAZ* e *CDY1B*), um paciente apresentou a sonda controle do cromossomo X duplicada (Síndrome de Klinefelter), e outro paciente apresentou duplicação de uma sonda do braço curto, além das 17 sondas da região AZFa).

Os rearranjos complexos (incluindo deleções, duplicações e suas

combinações) na região AZFc que interferem na espermatogênese são controversos e podem variar entre as populações (Navarro-Costa et al., 2010).

Foram publicados estudos que mostram que as duplicações também aumentam o risco de infertilidade (Lin et al., 2007), e estão de acordo com nossos dados, com as mesmas regiões duplicadas: *CDY1*, que age no processo de maturação do espermatozoide (na transição de histona para protamina), *BPY2*, que modela o citoesqueleto de células germinativas, e *DAZ*, que codifica proteínas de ligação que regulam a espermatogênese. Provavelmente estes genes citados são sensíveis à dosagem, ou seja, se suas expressões forem aumentadas, podem interferir no processo de espermatogênese.

Lu et al. (2014) avaliaram o grau de comprometimento espermatogênico dos genes de múltiplas cópias de AZFc pela dosagem gênica de oito famílias desta região. Encontraram que apenas as CNV de *DAZ* e *BPY2* foram associadas à falha espermatogênica, as mesmas CNVs que achamos duplicadas em três pacientes.

Nem sempre as duplicações têm efeitos prejudiciais. Recentemente foi relatado que duplicações secundárias a deleções em AZFc parciais podiam restaurar a concentração de espermatozoides móveis ao valor normal (Noordam et al., 2011). Sendo assim, podemos dizer que as duplicações encontradas nos dois homens do grupo controle podem ter sido balanceadas por outras alterações subdiagnosticadas, sem causar efeito deletério e prejudicial.

É importante ressaltar que a técnica de MLPA também possui limitações. Se houver alguma mutação ou polimorfismo na sequência detectada por uma sonda, pode ocasionar redução na altura relativa do pico, mesmo se esta mutação não estiver localizada exatamente no sítio de ligação. A intensidade do sinal da sonda pode ser alterada também devido às características do DNA utilizado, incluindo o método de extração, a solução de eluição, o grau de degradação da amostra e a presença de possíveis contaminantes (resíduos de reagentes, proteínas, RNAs, sais, etc.) (Schouten et al., 2002; Kozlowski et al., 2008).

Wu e colaboradores (2011) descreveram um polimorfismo de nucleotídeo único (SNP) dentro da região sY84 em AZFa do cromossomo Y (rs72609647). Este SNP era responsável pela troca de um nucleotídeo T por G na quinta base da região 5´ do final do *primer* reverso de SY84, fazendo com que a PCR não hibridizasse nesta região e gerasse um resultado falso positivo, mostrando que a técnica tem suas limitações de uso. Isto ocorreu em 9,8% dos pacientes estudados, e, provavelmente, se esta análise tivesse sido realizada por MLPA, por ter mais regiões próximas a esta englobadas pelo *kit*, as limitações seriam menores e perceptíveis por profissionais capacitados.

A técnica de MLPA não detecta o mosaicismo propriamente, mas um profissional capacitado consegue inferir sua presença na maioria das vezes.

O mosaicismo é definido pela presença de duas ou mais linhagens celulares em um mesmo indivíduo, e é causado essencialmente por falhas nas primeiras divisões mitóticas do embrião. Estas alterações não são herdadas e

na maioria das vezes sua causa é desconhecida (Johansen et al., 2012; Martinerie et al., 2012).

O cariótipo mosaico 45,X/46,XY apresenta ampla variedade de fenótipos, desde mulheres com Síndrome de Turner até homens fenotipicamente normais, além de diversos graus de genitália ambígua (Cools et al., 2011), dependendo da porcentagem de células das duas linhagens. Em nosso estudo, o paciente é um homem fenotipicamente normal, e o aparecimento dessas duas linhagens cromossômicas provavelmente ocorreu devido à não-disjunção do cromossomo Y durante a anáfase mitótica. Neste paciente do estudo (M43), o mosaicismo não foi detectado por PCR, pela característica da técnica, e por MLPA pudemos constatar uma anormalidade no resultado, sugerindo que se tratava de mosaicismo, para posterior confirmação por cariótipo.

Com o cariótipo em bandamento G, pudemos perceber que além da linhagem 45,X, este paciente tem o cromossomo Y em anel (45,X/46,X(r)Y).

De acordo com o ISCN (*International System for Human Cytogenetic Nomenclature)* (Shaffer et al., 2013), um cromossomo em anel (*ring*) é designado pela letra *r*, como no paciente descrito, 46, X(r)Y.

O cromossomo em anel, em geral, é resultante da quebra das extremidades do cromossomo e a subsequente fusão das pontas quebradas. Estas estruturas são perdidas muito facilmente nas divisões celulares devido a trocas entre as cromátides irmãs que originam um único anel dicêntrico ou a dois anéis interligados durante a divisão. As características fenotípicas deste

indivíduo dependerão da extensão dos fragmentos perdidos (Hsu, 1994; Martinerie et al., 2012).

No caso do paciente englobado em nosso estudo, com cariótipo 45,X/46,X(r)Y, é imprescindível que seja feito o aconselhamento genético pré-gestacional, pois a chance de gerar prole com alterações devido à formação de gametas alterados é grande.

Outro paciente que não teve alteração detectada por PCR foi o M37, portador da Sindrome de Klinefelter (47,XXY), padrão este que também foi confirmado por cariótipo uma vez que a MLPA detectou a presença de um cromossomo X adicional, mostrando novamente a eficácia da técnica.

No caso do paciente com deleção de AZFbc e também duplicação do braço curto e AZFa simultâneos (M29), por PCR pudemos apenas detectar a deleção AZFbc. Esta conformação mostra similaridade com o caso descrito por Roovere et al. (Roovere et al., 2007), que apresenta um paciente azoospérmico com duplicação da região Yp11 (que inclui o gene *SRY*), e com deleção parcial em Yq11 (incluindo as regiões AZFbc). Para esta detecção, os pesquisadores utilizaram as técnicas de bandamento G, FISH e PCR. Em nosso paciente, a deleção de AZFbc é praticamente total, o que possivelmente gerou maior gravidade no fenótipo clínico azoospérmico.

Mesmo com todos estes dados genômicos gerados pelas mais atuais e diferentes técnicas citogenômicas, ainda é difícil estabelecer correlações entre as microdeleções em AZF e os diferentes fenótipos espermatogênicos. Sabe-

se que esta região sofre plasticidade genômica e também devemos considerar a presença de várias deleções polimórficas em homens férteis (Vogt, 2004a).

No momento, caminhamos para a aplicação do diagnóstico genômico personalizado, com decisões médicas, práticas, intervenções e produtos adaptados ao paciente com base em sua resposta individual prevista ou seu risco para uma doença, que pode ser determinado pela sua constituição genética, possibilidade recente que apareceu devido ao avanço das técnicas moleculares e citogenômicas (Saunders et al., 2012; Farnaes et al., 2018; Lee et al., 2018).

Sendo assim, é de extrema relevância que sejam realizados mais estudos para melhor compreender os rearranjos complexos do cromossomo Y, com suas deleções, duplicações e translocações, para que os pacientes possam ser cada vez mais individualizados e tenham terapêutica mais efetiva.

6 Conclusões

1. Foram encontradas, pela técnica de PCR, microdeleções no cromossomo Y de sete pacientes e, por MLPA, nove deleções (duas além das mesmas encontradas por PCR);

2. Pela técnica de MLPA foram detectadas cinco duplicações e outras alterações cromossômicas não diagnosticadas por PCR;

3. Esses resultados mostram que a MLPA é uma técnica mais sensível que a técnica de PCR para detectar microdeleções do cromossomo Y.

7 Anexos

Anexo A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para PACIENTES

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

☒ **PACIENTE**

☐ CONTROLE

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DE PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "**Detecção de Microdeleções do Cromossomo Y comparando os resultados obtidos pelas técnicas de PCR e MLPA em pacientes inférteis"**

PESQUISADOR: Prof. Dr. Edmund Chada Baracat

CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular da Disciplina de Ginecologia

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: CRM Nº 28085

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Ginecologia – Centro de Reprodução Humana

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

☒ RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO

☐ RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR

4.DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HCFMUSP

1- Você está sendo convidado a participar deste estudo por possivelmente ser portador uma pequena deleção em seu cromossomo Y. O objetivo do estudo é tentar avaliar se os pacientes homens que não tem ou tem poucos espermatozoides no sêmen possuem em seu cromossomo Y pequenos pedaços faltando. Tentaremos procurar a falta destes pedaços no cromossomo por duas técnicas diferentes, esperando encontrar que a técnica mais nova e avançada identifique mais pedaços faltando do que a técnica mais antiga, podendo no futuro melhorar o diagnóstico e tratamento dos pacientes.

2- Para isso, coletaremos uma amostra de sangue de 10 mL de sua veia do braço, com agulha estéril e descartável. Este procedimento poderá causar um pouco de dor na picada e apesar de raro, pode haver a formação de hematoma no local.

3- Com o sangue coletado, extrairemos o DNA para esta avaliação.

4- Não há benefício direto e imediato para o participante, além da possibilidade de obter um aconselhamento genético para entender melhor a possibilidade de transmitir aos filhos homens o mesmo problema.

5- Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para o esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Prof. Dr. Edmund Chada Baracat, que pode ser encontrado na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 – 4° andar, bloco 19 (Centro de Reprodução Humana), telefones: 2661-7994 / 2661-7993. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com a Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq (Diretoria Clínica do HCFMUSP) – Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 – 5° andar – Prédio da Administração – Cerqueira César – CEP: 05403-010, São Paulo/SP, telefone: 2661-7585 – e-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br.

6- Você pode deixar o estudo em qualquer momento, retirando o consentimento para participação no estudo; a continuidade de seu tratamento na Instituição é garantida.

7- As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

8- Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

9- Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

10- Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Detecção de Microdeleções do Cromossomo Y comparando os resultados obtidos pelas técnicas de PCR e MLPA em pacientes inférteis".

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HCFMUSP

Eu discuti com o Prof. Dr. Edmund Chada Baracat sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

_____

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____ /_____

_____

Assinatura da testemunha Data ____/____ /_____

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____ /_____

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para CONTROLES

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

☐ PACIENTE

☒ **CONTROLE**

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DE PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME: .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº : ..... SEXO : M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE .....

CEP:..... TELEFONE: DDD (.....) .....

2.RESPONSÁVEL LEGAL .....

NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.) .....

DOCUMENTO DE IDENTIDADE :.....SEXO: M ☐ F ☐

DATA NASCIMENTO: ...../...../.....

ENDEREÇO: ..... Nº ..... APTO: .....

BAIRRO: ..... CIDADE: .....

CEP: ..... TELEFONE: DDD (.....).....

DADOS SOBRE A PESQUISA

1. TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "**Detecção de Microdeleções do Cromossomo Y comparando os resultados obtidos pelas técnicas de PCR e MLPA em pacientes inférteis"**

PESQUISADOR: Prof. Dr. Edmund Chada Baracat

CARGO/FUNÇÃO: Professor Titular da Disciplina de Ginecologia

INSCRIÇÃO CONSELHO REGIONAL: CRM Nº 28085

UNIDADE DO HCFMUSP: Departamento de Ginecologia – Centro de Reprodução Humana

3. AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:

☒ RISCO MÍNIMO ☐ RISCO MÉDIO

☐ RISCO BAIXO ☐ RISCO MAIOR

4.DURAÇÃO DA PESQUISA: 48 meses

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HCFMUSP

1- Você está sendo convidado a participar deste estudo para fazer parte de um grupo controle de homens férteis para um estudo que pretende avaliar homens inférteis que possam ser portadores de uma pequena deleção em seu cromossomo Y. O objetivo do estudo é tentar avaliar se os pacientes homens que não tem ou tem poucos espermatozoides no sêmen possuem em seu cromossomo Y pequenos pedaços faltando. Tentaremos procurar a falta destes pedaços no cromossomo por duas técnicas diferentes, esperando encontrar que a técnica mais nova e avançada identifique mais pedaços faltando do que a técnica mais antiga, podendo no futuro melhorar o diagnóstico e tratamento dos pacientes.

2- Para isso, coletaremos uma amostra de sangue de 10 mL de sua veia do braço, com agulha estéril e descartável. Este procedimento poderá causar um pouco de dor na picada e apesar de raro, pode haver a formação de hematoma no local.

3- Com o sangue coletado, extrairemos o DNA para esta avaliação.

4- Não há benefício direto e imediato para o participante, além da possibilidade de obter um aconselhamento genético para entender melhor a possibilidade de transmitir aos filhos homens o mesmo problema.

5- Em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para o esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é o Prof. Dr. Edmund Chada Baracat, que pode ser encontrado na Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 255 – 4° andar, bloco 19 (Centro de Reprodução Humana), telefones: 2661-7994 / 2661-7993. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com a Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa – CAPPesq (Diretoria Clínica do HCFMUSP) – Rua Dr. Ovídio Pires de Campos, 225 – 5° andar – Prédio da Administração – Cerqueira César – CEP: 05403-010, São Paulo/SP, telefone: 2661-7585 – e-mail: marcia.carvalho@hc.fm.usp.br.

6- Você pode deixar o estudo em qualquer momento, retirando o consentimento para participação no estudo; a continuidade de seu tratamento na Instituição é garantida.

7- As informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente;

8- Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas, quando em estudos abertos, ou de resultados que sejam do conhecimento dos pesquisadores;

9- Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

10- Compromisso do pesquisador de utilizar os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Detecção de Microdeleções do Cromossomo Y comparando os resultados obtidos pelas técnicas de PCR e MLPA em pacientes inférteis".

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO - HCFMUSP

Eu discuti com o Prof. Dr. Edmund Chada Baracat sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

_____

Assinatura do paciente/representante legal Data ____/____ /_____

_____

Assinatura da testemunha Data ____/____ /_____

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

_____

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____/____ /_____

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

Anexo C: Parecer do Comitê de Ética Institucional

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Detecção de Microdeleções do Cromossomo Y comparando os resultados obtidos pelas técnicas de PCR e MLPA em pacientes inférteis

Pesquisador: Edmund Chada Baracat

Área Temática: Genética Humana:
(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP;);

Versão: 3

CAAE: 23697213.9.0000.0068

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 535.321

Data da Relatoria: 19/02/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto encaminhado irá analisar microdeleções do cromossomo Y em pacientes masculinos inférteis com azoospermia e oligozoospermia. O projeto visa a obtenção do título de Doutor; está bem escrito, fundamentado em dados de literatura e com metodologia adequada. Os pacientes serão aqueles atendidos no Centro de Reprodução Humana Governador Mario Covas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Objetivo da Pesquisa:

Os objetivos da pesquisa são:

- investigar molecularmente sequências do cromossomo Y, procurando por microdeleções em suas subregiões;
- Detectar variações no número de cópias dos genes contidos nas sequências de DNA de partes do cromossomo Y;
- Realizar correlação genótipo x fenótipo;
- Introduzir a técnica de MLPA no Laboratório de Genética do Centro de Reprodução Humana Governador Mario Covas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, a fim de obtermos uma terapêutica mais efetiva aos pacientes.

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 536.321

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Segundo os pesquisadores o único risco aos pacientes é aquele inerente à coleta de sangue (dor e formação de hematoma).

Não há benefício direto para o participante, além da possibilidade de obter um aconselhamento genético para melhor entendimento da possibilidade de transmitir aos filhos homens a mesma mutação detectada. O benefício da pesquisa seria o desenvolvimento e implantação de uma técnica mais sensível e precisa no Serviço em questão, para melhor caracterização dos quadros de infertilidade masculina.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Pesquisa bastante interessante, de grande importância para a área, que traz novas possibilidades de entendimento da etiologia da infertilidade masculina.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador apresentou as modificações solicitadas, afirmando o descarte das amostras restantes após o término da pesquisa. Portanto, não haverá armazenamento de material biológico para uso futuro.

O projeto será custeado com verba advinda do Ministério da Saúde destinada ao Centro de Reprodução Humana Governador Mário Covas da Faculdade de Medicina da USP.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há mais nenhuma pendência ética.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 ¿ cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c)apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA USP - HCFMUSP

Continuação do Parecer: 535.321

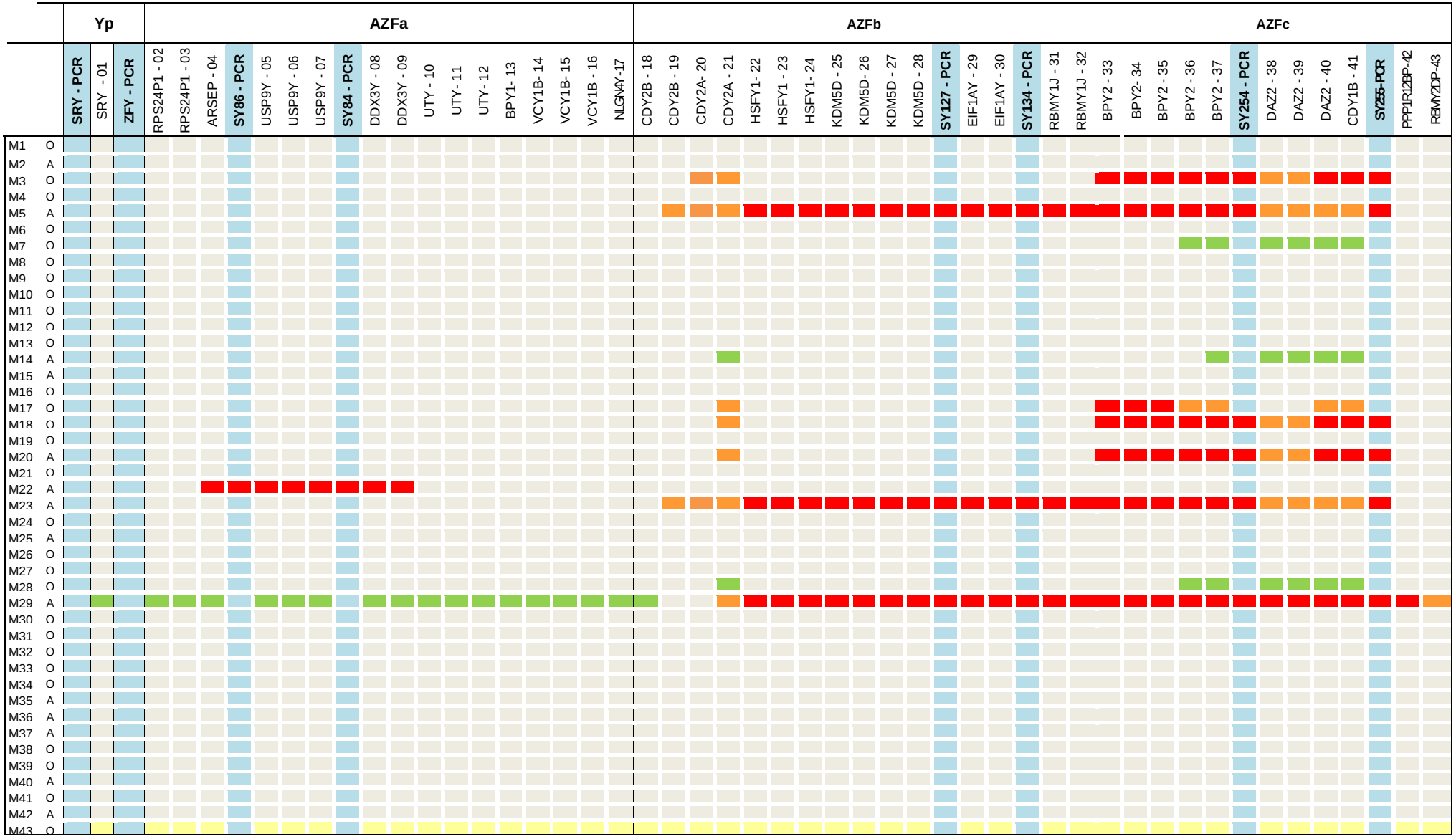
a não publicação dos resultados.

SAO PAULO, 20 de Fevereiro de 2014

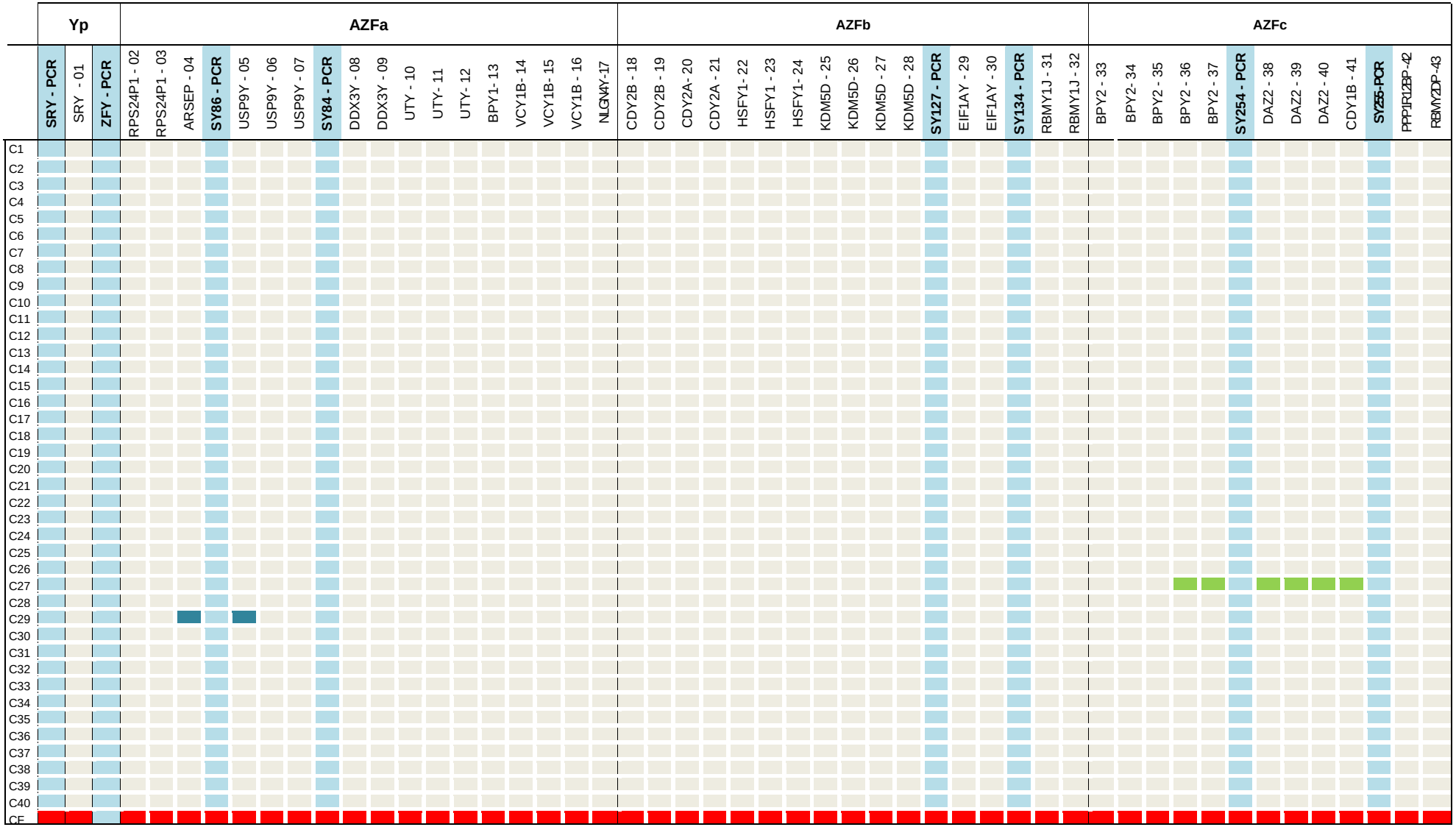
Assinador por:
ALFREDO JOSE MANSUR
(Coordenador)

Endereço: Rua Ovidio Pires de Campos, 225 5º andar
Bairro: Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** marcia.carvalho@hc.fm.usp.br

Anexo D: Resultados finais das reações de PCR (em azul) e MLPA (numeradas) dos pacientes do grupo de estudo



Anexo E: Resultados finais das reações de PCR (em azul) e MLPA (numeradas) dos pacientes do grupo controle



8 Referências

Akimoto C, Kitagawa H, Matsumoto T, Kato S. Spermatogenesis-specific association of SMCY and MSH5. Genes to Cells. 2008;13:623–33.

Allais-Bonnet A, Pailhoux E. Role of the prion protein family in the gonads. Front Cell Dev Biol. 2014;2(October):1–9.

Andrés O, Kellermann T, López-Giráldez F, Rozas J, Domingo-Roura X, Bosch M. RPS4Y gene family evolution in primates. BMC Evol Biol. 2008;1–12.

Bansal SK, Jaiswal D, Gupta N, Singh K, Dada R, Sankhwar SN, et al. Gr/gr deletions on Y-chromosome correlate with male infertility: An original study, meta-analyses, and trial sequential analyses. Sci Rep. 2016;6:1–14.

Bosch E, Jobling MA. Duplications of the AZFa region of the human Y chromosome are mediated by homologous recombination between HERVs and are compatible with male fertility. Hum Mol Genet. 2003;12(3):341–7.

Bunyan DJ, Callaway JLA, Laddach N. Short Communication Detection of Partial Deletions of Y-chromosome AZFc in Infertile Men Using the Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification Assay. 2012;13(9):174–8.

Carlsen E, Giwercman A, Keiding N, Skakkebaek NE. Evidence for decreasing quality of semen during past 50 years. Bmj. 1992;305:609–13.

Castellani CA, Melka MG, Wishart AE, Locke MEO, Awamleh Z, O'Reilly RL, et al. Biological relevance of CNV calling methods using familial relatedness including monozygotic twins. BMC Bioinformatics. 2014;15(1):1–8.

Centola GM. Semen assessment. Urol Clin North Am. 2014;41(1):163–7.

Centola GM, Blanchard A, Demick J, Li S, Eisenberg ML. Decline in sperm count and motility in young adult men from 2003 to 2013: Observations from a U.S. sperm bank. Andrology. 2016;4(2):270–6.

Choi JM, Chung P, Veeck L, Mielnik A, Palermo GD, Schlegel PN. AZF microdeletions of the Y chromosome and in vitro fertilization outcome. Fertil Steril. 2004;81(2):337–41.

Colaco S, Modi D. Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. Reprod Biol Endocrinol. 2018;16(14):1–24.

Cools M, Pleskacova J, Stoop H, Hoebeke P, Van Laecke E, Drop SLS, et al. Gonadal pathology and tumor risk in relation to clinical characteristics in patients with 45,X/46,XY mosaicism. J Clin Endocrinol Metab. 2011;96(7):1171–80.

Cooper TG, Noonan E, von Eckardstein S, Auger J, Baker HWG, Behre HM, et al. World Health Organization reference values for human semen characteristics. Hum Reprod Update. 2010;16(3):231–45.

Delbridge ML, Longepied G, Depetris D, Mattei M-G, Disteche CM, Graves JAM, et al. TSPY, the candidate gonadoblastoma gene on the human Y chromosome, has a widely expressed homologue on the X ^ implications for Y chromosome evolution. Chromosom Res. 2004;12:345–56.

Ditton HJ, Zimmer J, Kamp C, Rajpert-De Meyts E, Vogt PH. The AZFa gene DBY (DDX3Y) is widely transcribed but the protein is limited to the male germ cells by translation control. Hum Mol Genet. 2004;13(19):2333–41.

Dreumont N, Bourgeois CF, Lejeune F, Liu Y, Ehrmann IE, Elliott DJ, et al. Human RBMY regulates germline-specific splicing events by modulating the function of the serine/arginine-rich proteins 9G8 and Tra2-. J Cell Sci. 2010;123:40–50.

Erdal ME, Barlas IO. Detection of the SRY Gene in a 46 , XY Phenotypic Female by the PCR-SSCP Method. Turk J Med Sci. 2000;30:501–3.

Esteves SC, Agarwal A. Novel concepts in male infertility. Int Braz J Urol. 2011;37(3):5–15.

Farnaes L, Hildreth A, Sweeney NM, Clark MM, Chowdhury S, Nahas S, et al. Rapid whole-genome sequencing decreases infant morbidity and cost of hospitalization. npj Genomic Med. 2018;4(3):3–10.

Faul F, Erdfelder E, Buchner A, Lang A-G. Statistical power analyses using G*Power 3.1: tests for correlation and regression analyses. Behav Res Methods. 2009;41(4):1149–60.

Ferrás C, Fernandes S, Marques CJ, Carvalho F, Alves C, Silva J, et al. AZF and DAZ gene copy-specific deletion analysis in maturation arrest and Sertoli cell-only syndrome. Mol Hum Reprod. 2004;10(10):755–61.

Foresta C, Ferlin A, Garolla A, Moro E, Pistorello M, Barbaux S, et al. High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertolli cell-only Syndrome.

Hum Reprod. 1998;13(2):302–7.

Foresta C, Ferlin A, Moro E. Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. Hum Mol Genet. 2000;9(8):1161–9.

Foresta C, Moro E, Ferlin A. Prognostic value of Y deletion analysis: The role of current methods. Hum Reprod. 2001a;16(8):1543–7.

Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y Chromosome Microdeletions and Alterations of SpermatogenesY Chromosome Microdeletions and Alterations of Spermatogenesisis. Endocr Rev. 2001b;22(2):226–39.

Fu X-F, Cheng S-F, Wang L-Q, Yin S, De Felici M, Shen W. DAZ Family Proteins, Key Players for Germ Cell Development. Int J Biol Sci. 2015;11:1226–35.

Galletto GC, Galletto E, Rueda F, Genética L De, Humana M, Ccbs N, et al. [T] Análise das microdeleções do cromossomo Y em homens inférteis com Azoospermia ou Oligozoospermia severa idiopática [A]. 2008;30:27–33.

Giachini C, Laface I, Guarducci E, Balercia G, Forti G, Krausz C. Partial AZFc deletions and duplications: Clinical correlates in the Italian population. Hum Genet. 2008;124:399–410.

Van Golde RJT, Wetzels AMM, De Graaf R, Tuerlings JHAM, Braat DDM, Kremer JAM. Decreased fertilization rate and embryo quality after ICSI in oligozoospermic men with microdeletions in the azoospermia factor c region of the Y chromosome. Hum Reprod. 2001;16(2):289–92.

Hernández-Vargas P, Mateu E, Rubio C, Pérez-Cano I, Landeras J, Muñoz M. Infertilidad masculina asociada a las microdeleciones del cromosoma Y. Opciones reproductivas y riesgos de la descendencia. Med Reprod y Embriol Clínica. 2016;1–11.

Hernández P, Pérez-Cano I, Munoz M, Sellés E. Aneuploidies in Embryos and Spermatozoa From Patients With Y-chromosome MicrodeletioHernández P, Pérez-Cano I, Munoz M, Sellés E. Aneuploidies in Embryos and Spermatozoa From Patients With Y-chromosome Microdeletions [Internet]. ClinicalTrials.gov. 2018 [[Internet]. ClinicalTrials.gov. 2018 [citado 2 de janeiro de 2018]. available at: https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02527954?cond=NCT02527954&rank=1

Heydarian N, Favaedi R, Ali M, Gilani S, Shahhoseini M, Shahhosseini M. Expression level of chromodomain Y (CDY): potential marker for prediction of sperm recovery

in non- obstructive azoospermia. Int J Reprod BioMed This Artic Extr from MSc thesis. 2016;14(6):383–8.

Hopps C V., Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb, and AZFc regions. Hum Reprod. 2003;18(8):1660–5.

Hsu LYF. Phenotype/Karyotype correlations of Y chromosome aneuploidy with emphasis on structural aberrations in postnatally diagnosed cases. Am J Med Genet. 1994;53(2):108–40.

Hucklenbroich K, Gromoll J, Heinrich M, Hohoff C, Nieschlag E, Simoni M. Partial deletions in the AZFc region of the Y chromosome occur in men with impaired as well as normal spermatogenesis. Hum Reprod. 2005;20(1):191–7.

Jiang Y, Wang W, Guo Q, Sha Y, Ouyang H, Zhou Y. Multiplex ligation-dependent probe amplification for detecting AZF microdeletions on the Y chromosome in infertile men with azoospermia or severe oligozoospermia. Zhonghua Nan Ke Xue. 2012;18(2):115–21.

Jobling MA, Tyler-Smith C. The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. Nat Rev Genet. 2003;4(8):598–612.

Johansen ML, Hagen CP, Rajpert-De Meyts E, Kjærgaard S, Petersen BL, Skakkebæk NE, et al. 45,X/46,XY Mosaicism: Phenotypic Characteristics, Growth, and Reproductive Function—A Retrospective Longitudinal Study. J Clin Endocrinol Metab. 2012;97(8):E1540–9.

Kamischke A, Gromoll J, Simoni M, Behre HM, Nieschlag E. Transmission of a Y chromosomal deletion involving the deleted in azoospermia (DAZ) and chromodomain (CDY1) genes from father to son through intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod. 1999;14(9):2320–2.

Kamp C, Hirschmann P, Voss H, Huellen K, Vogt PH. Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. Hum Mol Genet. 2000;9(17):2563–72.

Kauppi L, Barchi M, Baudat F, Romanienko PJ, Keeney S, Jasin M. Distinct properties of the XY pseudoautosomal region crucial for male meiosis. Science (80-). 2011;331:1–9.

Kent-First M, Muallem A, Shultz J, Pryor J, Roberts K, Nolten W, et al. Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth

AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. Mol Reprod Dev. 1999;53(1):27–41.

Kichine E, Rozé V, Di Cristofaro J, Taulier D, Navarro A, Streichemberger E, et al. HSFY genes and the P4 palindrome in the AZFb interval of the human Y chromosome are not required for spermatocyte maturation. Hum Reprod. 2012;27:615–24.

Kido T, Lau Y-FC. Roles of the Y chromosome genes in human cancers. Asian J Androl. 2015;17:373–80.

Kihaile PE, Kisanga RE, Aoki K, Kumasako Y, Misumi J, Utsunomiya T. Embryo Outcome in Y-Chromosome Microdeleted Infertile Males after ICSI. Mol Reprod Dev. 2004;68(2):176–81.

Kim B, Lee Y, Kim Y, Lee KH, Chun S, Rhee K, et al. Polymorphic expression of DAZ proteins in the human testis. Hum Reprod. 2009;24:1507–15.

Kim ED, Bischoff FZ, Lipshultz LI, Lamb DJ. Genetic concerns for the subfertile male in the era of ICSI. Prenat Diagnosis . 1998;18:1349–65.

Kim J-W, Park S-Y, Ryu H-M, Lee D-E, Lee B-Y, Kim S-Y, et al. Molecular and Clinical Characteristics of 26 Cases with Structural Y Chromosome Aberrations. Cytogenet Genome Res. 2012;136(4):270–7.

Kirsch S, Weiß B, Miner TL, Waterston RH, Clark R a, Eichler EE, et al. region on the human Y chromosome Interchromosomal segmental duplications of the pericentromeric region on the human Y chromosome. 2005;1:1–10.

Kleiman SE, Yogev L, Hauser R, Botchan A, Maymon BBS, Paz G, et al. Expression profile of AZF genes in testicular biopsies of azoospermic men. Hum Reprod. 2007;22(1):151–8.

Kleiman SE, Yogev L, Lehavi O, Hauser R, Botchan A, Paz G, et al. The likelihood of finding mature sperm cells in men with AZFb or AZFb-c deletions: Six new cases and a review of the literature (1994-2010). Fertil Steril. 2011;95(6):2005–2012.e4.

Komura K, Jeong SH, Hinohara K, Qu F, Wang X, Hiraki M, et al. Resistance to docetaxel in prostate cancer is associated with androgen receptor activation and loss of KDM5D expression. Proc Natl Acad Sci. 2016;113(22):6259–64.

Kozlowski P, Jasinska AJ, Kwiatkowski DJ. New applications and developments in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification. Electrophoresis. 2008;29(23):4627–36.

Krausz C, Casamonti E. Spermatogenic failure and the Y chromosome. Human Genetics. 2017. p. 637–55.

Krausz C, Degl'Innocenti S. Y chromosome and male infertility: update, 2006. Front Biosci. 2006;11:3049–61.

Krausz C, Degl'Innocenti S, Nuti F, Morelli A, Felici F, Sansone M, et al. Natural transmission of USP9Y gene mutations: A new perspective on the role of AZFa genes in male fertility. Hum Mol Genet. 2006;15(18):2673–81.

Krausz C, Escamilla AR, Chianese C. Genetics of male infertility: from research to clinic. Reproduction. 2015;150(5):R159-74.

Krausz C, Forti G, McElreavey K. The Y chromosome and male fertility and infertility. Vol. 26, International Journal of Andrology. 2003. p. 70–5.

Krausz C, Giachini C, Forti G. TSPY and male fertility. Genes (Basel). 2010;1(2):308–16.

Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, Tüttelmann F. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: State-of-the-art 2013. Vol. 2, Andrology. 2014. p. 5–19.

Kühnert B, Gromoll J, Kostova E, Tschanter P, Luetjens CM, Simoni M, et al. Case report: Natural transmission of an AZFc Y-chromosomal microdeletion from father to his sons. Hum Reprod. 2004;19(4):886–8.

Kuroda-kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, et al. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform. 2001;29(november):279–86.

Kurtovic-kozaric A, Mehinovic L, Stomornjak-vukadin M, Kurtovic-basic I. Diagnostics of common microdeletion syndromes using fluorescence in situ hybridization : single center experience in a developing country. 2016;(January):1–21.

Lahn BT, Tang ZL, Zhou J, Barndt RJ, Parvinen M, Allis CD, et al. Previously uncharacterized histone acetyltransferases implicated in mammalian spermatogenesis. Proc Natl Acad Sci. 2002;99(13):8707–12.

Lee CR, Sriramoju VB, Cervantes A, Howell LA, Varunok N, Madan S, et al. Clinical Outcomes and Sustainability of Using CYP2C19 Genotype-Guided Antiplatelet Therapy After Percutaneous Coronary Intervention. Circ Genomic Precis Med. abril de 2018;11(4):e002069.

Li N, Dhar SS, Chen T-Y, Kan P-Y, Wei Y, Kim J-H, et al. JARID1D Is a Suppressor and Prognostic Marker of Prostate Cancer Invasion and Metastasis. Cancer Res. 2016;

Li Y, Zhang DJ, Qiu Y, Kido T, Lau YFC. The Y-located proto-oncogene TSPY exacerbates and its X-homologue TSPX inhibits transactivation functions of androgen receptor and its constitutively active variants. Hum Mol Genet. 2017;26(5):901–12.

Li Z, Haines CJ, Han Y. “Micro-deletions” of the human Y chromosome and their relationship with male infertility. J Genet Genomics. 2008;35(4):193–9.

Lin YW, Hsu LCL, Kuo PL, Huang WJ, Chiang HS, Yeh S Der, et al. Partial duplication at AZFc on the Y chromosome is a risk factor for impaired spermatogenesis in Han Chinese in Taiwan. Hum Mutat. 2007;28(5):486–94.

Liu XY, Wang RX, Fu Y, Luo LL, Guo W, Liu RZ. Outcomes of intracytoplasmic sperm injection in oligozoospermic men with Y chromosome AZFb or AZFc microdeletions. Andrologia. 2017a;49(e12602):1–6.

Liu XY, Zhang HY, Pang DX, Xue LT, Yang X, Li YS, et al. AZFa Microdeletions: Occurrence in Chinese Infertile Men and Novel Deletions Revealed by Semiconductor Sequencing. Urology. 2017b;.

Lopes AM, Miguel RN, Sargent CA, Ellis PJ, Amorim A, Affara NA. The human RPS4 paralogue on Yq11.223 encodes a structurally conserved ribosomal protein and is preferentially expressed during spermatogenesis. BMC Mol Biol. 2010;11(33):1–12.

Lu C, Jiang J, Zhang R, Wang Y, Xu M, Qin Y, et al. Gene copy number alterations in the azoospermia-associated AZFc region and their effect on spermatogenic impairment. Mol Hum Reprod. 2014;20(9):836–43.

Luddi A, Margollicci M, Gambera L, Serafini F, Cioni M, De Leo V, et al. Spermatogenesis in a Man with Complete Deletion of *USP9Y*. N Engl J Med. 2009;360(9):881–5.

Maan AA, Eales J, Akbarov A, Rowland J, Xu X, Jobling MA, et al. The y chromosome: A blueprint for men’s health? Eur J Hum Genet. 2017;25(11):1181–8.

Machev N, Saut N, Longepied G, Terriou P, Navarro A, Levy N, et al. Sequence family variant loss from the AZFc interval of the human Y chromosome, but not gene copy loss, is strongly associated with male infertility. J Med Genet.

2004;41(11):814–25.

Mamoulakis C, Georgiou I, Dimitriadis F, Tsounapi P, Koukos S, Antypas S, et al. Screening for Y chromosome microdeletions in childhood: Lack of evidence for a direct association with testicular maldescent. Andrologia. 2013;45(6):409–16.

Mangs AH, Morris B. The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future. Curr Genomics. 2007;8:129–36.

Martinerie L, Morel Y, Gay CL, Pienkowski C, De Kerdanet M, Cabrol S, et al. Impaired puberty, fertility, and final stature in 45,X/46,XY mixed gonadal dysgenetic patients raised as boys. Eur J Endocrinol. 2012;166(4):687–94.

Martinez MC, Bernabés MJ, Gómez E, Ballesteros A, Landeras J, Glover G, et al. Screening for AZF deletion in a large series of severely impaired spermatogenesis patients. J Androl. 2000;21(5):651–5.

Massart A, Lissens W, Tournaye H, Stouffs K. Genetic causes of spermatogenic failure. Asian J Androl. 2012;14(1):40–8.

Mateu E, Rodrigo L, Martínez MC, Peinado V, Milán M, Gil-Salom M, et al. Aneuploidies in embryos and spermatozoa from patients with y chromosome microdeletions. Fertil Steril. 2010;94(7):2874–7.

McLachlan RI. Approach to the patient with oligozoospermia. J Clin Endocrinol Metab. 2013;98(3):873–80.

Mello MP, Assumpção J de G, Hackel C. Genes Envolvidos na Determinação e Diferenciação do Sexo. Arq Bras Endocrinol Metab. 2005;49(1):14–25.

Miyamoto T, Minase G, Okabe K, Ueda H, Sengoku K. Male infertility and its genetic causes. J Obstet Gynaecol Res. 2015;41(10):1501–5.

Moorhead PS, Nowell PC, Mellman WJ, Battips DM, Hungerford DA. Chromosome preparations of leukocytes cultured from human peripheral blood. Exp Cell Res. setembro de 1960;20:613–6.

Nakasuji T, Ogonuki N, Chiba T, Kato T, Shiozawa K, Yamatoya K, et al. Complementary Critical Functions of Zfy1 and Zfy2 in Mouse Spermatogenesis and Reproduction. PLoS Genet. 2017;13(1):1–20.

Navarro-Costa P, Gonçalves J, Plancha CE. The AZFc region of the Y chromosome: At the crossroads between genetic diversity and male infertility. Hum Reprod Update. 2010;16(5):525–42.

Noordam MJ, Westerveld GH, Hovingh SE, van Daalen SKM, Korver CM, van der Veen F, et al. Gene copy number reduction in the azoospermia factor c (AZFc) region and its effect on total motile sperm count. Hum Mol Genet. 2011;20(12):2457–63.

Oates RD, Silber S, Brown LG, Page DC. Clinical characterization of 42 oligospermic or azoospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. Hum Reprod. 2002;17(77):2813–24.

Olson M, Hood L, Cantor C, Botstein D. A common language for physical mapping of the human genome. Science (80-). 29 de setembro de 1989;245(4925):1434 LP-1435.

Page DC, Mosher R, Simpson EM, Fisher EMC, Mardon G, Pollack J, et al. The sex-determining region of the human Y chromosome encodes a finger protein. Cell. 1987;51:1091–104.

Pandey LK, Pandey S, Gupta J, Saxena AK. Loss of the AZFc region due to a human Y-chromosome microdeletion in infertile male patients. Genet Mol Res. 2010;9(2):1267–73.

Park E, Pan Z, Zhang Z, Lin L, Xing Y. The Expanding Landscape of Alternative Splicing Variation in Human Populations. 2018;102:11–26.

Patsalis PC, Skordis N, Sismani C, Kousoulidou L, Koumbaris G, Eftychi C, et al. Identification of high frequency of Y chromosome deletions in patients with sex chromosome mosaicism and correlation with the clinical phenotype and Y-chromosome instability. Am J Med Genet. 2005;135 A(2):145–9.

Pina-Neto JM, Carrara RC V, Bisinella R, Mazzucalto LF, Martins MD, Sartoratto E, et al. Somatic cytogenetic and azoospermia factor gene microdeletion studies in infertile men. Brazilian J Med Biol Res. 2006;39(4):555–61.

Pinkel D, Straume T, Gray JW. Cytogenetic analysis using quantitative, high-sensitivity, fluorescence hybridization. Proc Natl Acad Sci. 1986;83(9):2934–8.

Poongothai J, Gopenath TS, Manonayaki S. Genetics of human male infertility. Singapore Med J. 2009;50(4):336–47.

Quintana-Murci L, Krausz C, McElreavey K. The human Y chromosome: function, evolution and disease. Forensic Sci Int. 2001;118:169–81.

Raicu F, Popa L, Apostol P, Cimponeriu D, Dan L, Ilinca E, et al. Screening for microdeletions in human Y chromosome--AZF candidate genes and male

infertility. J Cell Mol Med. 2003;7(1):43–8.

Redon R, Ishikawa S, Fitch KR, Feuk L, Perry GH, Andrews TD, et al. Global variation in copy number in the human genome. Nature. 2006;444(7118):444–54.

Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, Van Der Veen F, Oates RD, et al. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. Am J Hum Genet. 2002;71(4):906–22.

Roovere T, Peters M, Horelli-Kuitunen N, Mölter-Väär T, Punab M, Rootsi S, et al. Cytogenetic and molecular characterization of the derivative Y chromosome: A case study of an azoospermic patient. Clin Genet. 2007;72(5):460–3.

Rozen S, Skaletsky H, Marszalek JD, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, et al. Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes. Nature. 2003;423(6942):873–6.

Rozen SG, Marszalek JD, Irenze K, Skaletsky H, Brown LG, Oates RD, et al. AZFc deletions and spermatogenic failure: A population-based survey of 20,000 y chromosomes. Am J Hum Genet. 2012;91(5):890–6.

Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. Science. 1988;239(4839):487–91.

Saito K, Miyado M, Kobori Y, Tanaka Y, Ishikawa H, Yoshida A, et al. Copy-number variations in Y-chromosomal azoospermia factor regions identified by multiplex ligation-dependent probe amplification. J Hum Genet. 2015;60:127–31.

São Pedro SL, Fraietta R, Spaine D, Porto CS, Srougi M, Cedenho AP, et al. Prevalence of Y chromosome deletions in a Brazilian population of nonobstructive azoospermic and severely oligozoospermic men. Brazilian J Med Biol Res. 2003;36(6):787–93.

Saunders CJ, Miller NA, Soden SE, Dinwiddie DL, Noll A, Alnadi NA, et al. Rapid Whole-Genome Sequencing for Genetic Disease Diagnosis in Neonatal Intensive Care Units. Sci Transl Med. outubro de 2012;4(154):1–27.

Saut N, Terriou P, Navarro a, Lévy N, Mitchell MJ. The human Y chromosome genes BPY2, CDY1 and DAZ are not essential for sustained fertility. Mol Hum Reprod. 2000;6(9):789–93.

Saxena R, De Vries JWA, Repping S, Alagappan RK, Skaletsky H, Brown LG, et al.

Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome. Genomics. 2000;67:256–67.

Schouten JP, McElgunn CJ, Waaijer R, Zwijnenburg D, Diepvens F, Pals G. Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. Nucleic Acids Res. 2002;30(12):e57.

Sebat J. Major changes in our DNA lead to major changes in our thinking. Nat Genet. 27 de junho de 2007;39:S3.

Shaffer LG, McGowan-Jordan J, Schmid M. ISCN 2013: An International System for Human Cytogenetic Nomenclature (2013). S Karger AG; 2013.

Shojaei A, Ebrahimzadeh-Vesal R, Ali A, Razzaghy-Azar M, Khakpour G, Ghazi F, et al. Genetic Screening of Iranian Patients with 46,XY Disorders of Sex Development. Reports Biochem Mol Biol. 2017;6(1).

Siffroi JP, Le Bourhis C, Krausz C, Barbaux S, Quintana-Murci L, Kanafani S, et al. Sex chromosome mosaicism in males carrying Y chromosome long arm deletions. Hum Reprod. 2000;15(12):2559–62.

Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. Vol. 27, International Journal of Andrology. 2004. p. 240–9.

Singh K, Jaiswal D. Human Male infertility: A Complex Multifactorial Phenotype. Reprod Sci. 2011;18(5):418–25.

Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosic of discrete sequence classes. Nature. 2003;423:825–37.

Song S-H, Chiba K, Ramasamy R, Lamb D. Recent advances in the genetics of testicular failure. Asian J Androl. 2016;18(3):350.

Sørensen KM, Andersen PS, Larsen LA, Schwartz M, Schouten JP, Nygren AOH. Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification Technique for Copy Number Analysis on Small Amounts of DNA Material. 2008;80(23):9363–8.

Stahl PJ, Schlegel PN. Genetic evaluation of the azoospermic or severely oligozoospermic male. Curr Opin Obstet Gynecol. 2012;24(4):221–8.

Stouffs K, Lissens W, Tournaye H, van Steirteghem A, Liebaers I. The choice and outcome of the fertility treatment of 38 couples in whom the male partner has a Yq

microdeletion. Hum Reprod. 2005;20(7):1887–96.

Stouffs K, Vloeberghs V, Gheldof A, Tournaye H, Seneca S. Are AZFb deletions always incompatible with sperm production? Andrology. 2017;5(4):691–4.

Sun C, Skaletsky H, Birren B, Devon K, Tang Z, Silber S, et al. An azoospermic man with a de novo point mutation in the Y-chromosomal gene USP9Y. Nat Genet. 1999;23(4):429–32.

Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. Vol. 34, Human genetics. 1976. p. 119–24.

van der Ven K, Montag M, Peschka B, Leygraaf J, Schwanitz G, Haidl G, et al. Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection. Mol Hum Reprod. 1997;3(8):699–704.

Vogt PH. Genomic heterogeneity and instability of the AZF locus on the human Y chromosome. Mol Cell Endocrinol. 2004a;224(1–2):1–9.

Vogt PH. Molecular genetics of human male infertility: from genes to new therapeutic perspectives. Curr Pharm Des. 2004b;10(5):471–500.

Vogt PH, Fernandes S, Oosterhuis JW, McElreavey K, Lothe R. Polymorphic DAZ gene family in polymorphic structure of AZFc locus: Artwork or functional for human spermatogenesis? In: APMIS. 2003.

Vorstman JAS, Jalali GR, Rappaport EF, Hacker AM, Scott C, Emanuel BS. MLPA: A rapid, reliable, and sensitive method for detection and analysis of abnormalities of 22q. Hum Mutat. 2006;27(8):814–21.

WHO. Examination and processing of human semen. World Heal Organ. 2010;Edition, F(10):286.

Wu Q, Chen GW, Yan TF, Wang H, Liu YL, Li Z, et al. Prevalent false positives of azoospermia factor a (AZFa) microdeletions caused by single-nucleotide polymorphism rs72609647 in the sY84 screening of male infertility. Asian J Androl. 2011;13:877–80.

Yang X, Leng X, Tu W, Liu Y, Xu J, Pei X, et al. Spermatogenic phenotype of testis-specific protein, Y-encoded, 1 (TSPY1) dosage deficiency is independent of variations in TSPY-like 1 (TSPYL1) and TSPY-like 5 (TSPYL5): a case-control study in a Han Chinese population. Reprod Fertil Dev. março de 2018;30(3):555–

62.

Yu XW, Wei ZT, Jiang YT, Zhang SL. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and transmission characteristics in azoospermic and severe oligozoospermic patients. Int J Clin Exp Med. 2015;8(9):14634–46.

Zhang YS, Li LL, Xue LT, Zhang H, Zhu YY, Liu RZ. Complete Azoospermia Factor b Deletion of Y Chromosome in an Infertile Male With Severe Oligoasthenozoospermia: Case Report and Literature Review. Urology. 2017;102:111–5.