

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GINECOLOGIA E OBSTETRÍCIA**

MATEUS FELIPE DE SOUZA

Análise da expressão de genes alvo em homens com varicocele

Ribeirão Preto

2021

MATEUS FELIPE DE SOUZA

Análise da expressão de genes alvo em homens com varicocele

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

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Orientadora: Profa. Dra. Rosana Maria Dos Reis

Ribeirão Preto

2021

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Souza, Mateus Felipe de

Análise da expressão de genes alvos em homens com varicocele. Ribeirão Preto, 2021.

72 p.: il.; 30 cm

Dissertação de Mestrado, apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Ginecologia e Obstetrícia.

Orientador: Reis, Rosana Maria Dos.

1. Varicocele. 2. Gene expression. 3. Male infertility. 4. *EHMT2*.
5. *HDAC2*. 6. *PLP2*. *SPINT3*.

Nome: SOUZA, Mateus Felipe de

Título: Análise da expressão de genes alvos em homens com varicocele

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, para obtenção do título de Mestre em Ciências Médicas.

Aprovado em:

Banca examinadora

Profa. Dra. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

Profa. Dr. _____

Instituição: _____

Julgamento: _____

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pelo dom da vida e pela salvação através de seu filho amado Jesus.

Deixo o meu muito obrigado aos meus pais, Samuel Souza e Helen Souza. Sem a ajuda de vocês eu não teria chegado até aqui, amo vocês!! Não poderia esquecer do meu irmão Caio Souza, por todo apoio que me concedeu durante esses anos. Vlw manolo!!

A minha namorada Izabel Moura, pelas orações e por todos os conselhos. Obrigado amor, te amo de montão S2.

A minha querida orientadora Dra. Rosana Reis deixo o meu muito obrigado!!! Sou grato pela oportunidade que me concedeu de ser seu aluno. Por todo conhecimento passado, paciência e carinho também. A senhora é uma pessoa incrível!!

Sabe aquela pessoa que a gente implica, briga e depois fica tudo bem? Então, conheci uma pessoa assim durante o mestrado. Muiiiito obrigado Viviane Paiva, sem a sua imensa ajuda eu não teria chegado nem perto de terminar esse mestrado. Levarei seus conselhos sempre comigo.

A Cris, Matheus Eiras e Murilo, deixo os mais sinceros agradecimentos. Cada técnica e ensinamento de vocês, irei levar sempre em minha vida profissional.

Serei eternamente grato a toda equipe do HC Ribeirão, Cidinha, Marilda, Cris, Roberta, Fabi, dentre outros. Obrigado por me receberem tão bem na casa de vocês!!

A pessoa mais engraçada e parceira de roles do Multi, Cris Padovan, muito obrigado!!!! Melhor técnica impossível! Sempre disposta a ajudar com muita paciência. Você é demais!!

Agradeço a parceria de todos os alunos da pós-graduação do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP.

Gratidão a toda equipe do professor Molina, por toda ajuda com os pacientes cedidos para a pesquisa.

Agradeço a todos os pacientes que fizeram parte do meu trabalho. Sem vocês, fazer essa pesquisa seria impossível.

Agradeço a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo financiamento do projeto, sem o qual o projeto não poderia ser realizado.

“Que darei eu ao Senhor, por todos os benefícios que me tem feito? ”

Salmos 116:12

RESUMO

SOUZA, Mateus Felipe de. Análise da expressão de genes alvos em homens com varicocele. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

INTRODUÇÃO: A varicocele é uma das principais causas de infertilidade masculina. Alterações nos parâmetros seminais e baixa qualidade espermática são frequentemente observadas em homens com varicocele, cujos mecanismos envolvidos ainda não estão bem elucidados. A etiologia multifatorial, bem como a variação das manifestações clínicas e a possibilidade de reversão da doença, sugerem que os fatores genéticos, epigenéticos e ambientais podem estar associados a fisiopatologia da doença.

OBJETIVO: Analisar os genes diferencialmente expressos em homens com varicocele utilizando dados de sequenciamento de RNA.

MÉTODOS: Trata-se de um estudo prospectivo observacional do tipo caso controle, que incluiu 25 homens com varicocele e 25 homens com padrão seminal normal, sem a doença. Foi realizado o espermograma para a análise da qualidade seminal, e para a fragmentação de DNA a técnica de dispersão da cromatina. Os dados utilizados para as análises de bioinformática foram extraídos de um prévio sequenciamento de RNA. Os resultados obtidos foram analisados utilizando a linguagem de programação R, mais especificamente o pacote DESeq2 e clusterProfiler. Para a determinação de um gene diferencialmente expresso foram utilizados os filtros de $p < 0.05$ e $\log_{2}FC > 1.5$. O nível de expressão para os genes analisados foi calculado para cada amostra de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, descrito por Livak e Schmittgen (2001). As comparações entre os grupos e as correlações entre as variáveis de interesse foram investigadas utilizando o coeficiente de correlação de Spearman.

RESULTADOS: Observamos aumento das alterações morfológicas ($p=0,0018$) no grupo com varicocele quando comparado ao grupo controle. Não foi constatada diferença em relação à fragmentação de DNA espermático entre os grupos. Inicialmente encontramos 494 genes diferencialmente expressos entre homens com varicocele e férteis sem a doença, sendo 92 genes *up regulated* e 402 *down regulated* em varicocele. Para a seleção dos principais genes *up* e *down regulated*, os seguintes critérios foram adotados: Nível de expressão do gene, interação e co-expressão gênica, vias e funções associadas a varicocele. Seguindo esses critérios encontramos os genes alvos *EHMT2* e *HDCA2 down regulated*, bem como os genes *PLP2* e *SPINT3, up regulated*, para a análise da expressão gênica. Esses genes participam de vias e possuem diversas funções relacionadas a varicocele. A média da quantificação relativa do gene *HDAC2* ($p=0,0020$) foi de 0,542 para o grupo varicocele, contra 1,506 do grupo controle. O gene *PLP2* ($p=0,0032$) apresentou quantificação relativa de 0,227 no grupo varicocele e 0,739 no grupo controle. Além disso, quando correlacionamos nossos resultados do nível de expressão dos genes *HDAC2* e *PLP2* com os parâmetros seminais do grupo varicocele, nossos resultados mostraram uma fraca correlação negativa, entre o gene *HDAC2* ($p = -0,464$) e a variável concentração. Na viável morfologia, os resultados mostraram uma correlação positiva moderada, tanto para o gene *HDAC2* ($p=0,601$), quando para o gene *PLP2* ($p=0,507$).

CONCLUSÃO: A diminuição da expressão dos genes *HDAC* e *PLP2*, que participam de importantes vias relacionadas ao transporte de íons, manutenção das células germinativas, e espermatogêneses, podem conduzir as alterações seminais encontradas em pacientes com varicocele.

Palavras-chave: Varicocele. Expressão Gênica. Infertilidade Masculina. *EHMT2*. *HDAC2*. *PLP2*. *SPINT3*.

ABSTRACT

SOUZA, Mateus Felipe de. Analysis of target gene expression in men with varicocele. 2021. Dissertação (Mestrado em Ciências Médicas) – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

INTRODUCTION: Varicocele is a major cause of male infertility. Changes in seminal parameters and low sperm quality are frequently observed in men with varicocele, whose mechanisms involved are still not well understood. The multifactorial etiology, as well as the variation of clinical manifestations and the possibility of reversal of the disease, suggest that genetic, epigenetic and environmental factors may be associated with the pathophysiology of the disease.

OBJECTIVE: Analyze differentially expressed genes in men with varicocele using RNA sequencing data.

METHODOLOGY: This is a prospective observational, case-control study, which included 25 men with varicocele and 25 men with normal seminal pattern, without the disease. The spermogram was performed to analyze the seminal quality, and for the DNA fragmentation the chromatin dispersion technique. The data used for bioinformatics analysis were extracted from a previous RNA sequencing. The results obtained were analyzed using the R programming language, more specifically the DESeq2 package and clusterProfiler. For the determination of a differentially expressed gene, filters of $p < 0.05$ and $\log_{2}FC > 1.5$ were used. The level of expression for the analyzed genes was calculated for each sample according to the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method, described by Livak and Schmittgen (2001). The comparisons between the groups and the correlations between the variables of interest were investigated using Spearman's correlation coefficient.

RESULTS: We observed decreases in the concentration ($p = 0.0002$) and vitality ($p = 0.0285$) of sperm, and an increase in morphological changes ($p = 0.0018$) in the group with varicocele when compared to the control group. There was no difference regarding the fragmentation of sperm DNA between the groups. Initially, we found 494 genes differentially expressed between men with varicocele and fertile men without the disease, with 92 genes up regulated and 402 down regulated in varicocele. For the selection of the main up and down regulated genes, the following criteria were adopted: Level of gene expression, gene interaction and co-expression, pathways and functions associated with varicocele. Following these criteria, we find the target genes EHMT2 and HDCA2 down regulated, as well as the genes PLP2 and SPINT3, up regulated, for the analysis of gene expression. These genes participate in pathways and have several functions related to varicocele. The average relative quantification of the HDAC2 gene ($p = 0.0020$) was 0.542 for the varicocele group, against 1.506 for the control group. The PLP2 gene ($p = 0.0032$) showed a relative quantification of 0.227 in the varicocele group and 0.739 in the control group. Furthermore, when we correlated our results of the expression level of the HDAC2 and PLP2 genes with the seminal parameters of the varicocele group, our results showed a weak negative correlation between the HDAC2 gene ($p = -0.464$) and the concentration variable. In viable morphology, the results showed a moderate positive correlation, both for the HDAC2 gene ($p = 0.601$), and for the PLP2 gene ($p = 0.507$).

CONCLUSION: The decreased expression of the HDAC and PLP2 genes, which participate in important pathways related to ion transport, maintenance of germ cells, and spermatogenesis, can lead to the seminal changes found in patients with varicocele.

Keywords: Varicocele. Gene expression. Male infertility. *EHMT2*. *HDAC2*. *PLP2*. *SPINT3*.

LISTA ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Fluxograma demonstrando a distribuição dos participantes da pesquisa 26
Figura 2	<i>Volcano plot</i> dos genes diferencialmente expressos entre os grupos fértil e varicocele30
Figura 3	Heatmap dos 494 genes diferencialmente expressos entre homens com varicocele e férteis sem a doença.31
Figura 4	Rede de co-expressão e interação genica do módulo 135
Figura 5	Rede de co-expressão e interação genica do módulo 236
Figura 6	Rede de co-expressão e interação genica do módulo 337
Figura 7	Rede de co-expressão e interação gênica do módulo 439
Figura 8	Rede de co-expressão e interação gênica do módulo 5.40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Desenho dos primers utilizados para a análise da expressão gênica.	25
Tabela 2. Grupo, grau e lado da varicocele, IMC e fertilidade dos pacientes do estudo	27
Tabela 3. Parâmetros seminais e fragmentação do DNA de pacientes com e sem varicocele	29
Tabela 4. Parâmetros seminais e fragmentação do DNA do grupo de homens com varicocele, subdivididos de acordo com o grau da doença.	29
Tabela 5. Top 10 genes mais expressos em varicocele.	32
Tabela 6. Top 10 genes menos expressos em varicocele.	32
Tabela 7. Módulos de co-expressão e similaridade de função.	33
Tabela 8: Correlação entre as variáveis espermáticas e expressão gênica.	44

LISTA DE SIGLAS

AR	Receptor de Andrógeno
DNA	ácido desoxirribonucleico
EROs	Espécie Reativas De Oxigênio
FDE	Fragmentação Do DNA Espermático
GO	Gene Antology
IMC	Índice De Massa Corporal
<i>mTOR</i>	Gene da rapamicina
NGS	Sequenciamento de nova geração
OMS	Organização Mundial de Saúde
PB	Pares de base
RefSeq	Sequência referência
RNA	Ácido Ribonucleico
RNAi	RNA de interferência
RNA _m	RNA mensageiro
RNA _{pi}	RNA Piwi-interacting
RNA _r	RNA ribossômico
RNA _t	RNA transportador
<i>ROPNI</i>	Proteína da cauda associada à Rhofilina 1

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
1.1 VARICOCELE E INFERTILIDADE	13
1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E FRAGMENTAÇÃO DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA)	14
1.3 A TRANSCRIÇÃO GÊNICA NA FERTILIDADE MASCULINA E VARICOCELE	15
1.4 JUSTIFICATIVA.....	20
2 OBJETIVO	20
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 MATERIAIS E MÉTODOS.....	21
3.1 CONTEXTO	21
3.2 DESENHO DO ESTUDO	21
3.3 PARTICIPANTES	21
3.3 COLETA DAS AMOSTRAS DE SÊMEN E ESPERMOGRAMA	22
3.4 ANÁLISE DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA	22
3.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE ESPERMATOZOIDES	23
3.6 ISOLAMENTO DO RNA	23
3.7 ANÁLISE <i>IN SILICO</i>	23
3.8 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DOS GENES ALVOS.....	24
3.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR.....	24
3.10 CÁLCULO AMOSTRAL	25
3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA	25
4 RESULTADOS	26
4.1 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA	26
4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR BIOINFORMÁTICA	29

4.3 AGRUPAMENTO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS POR ANÁLISE DE INTERAÇÃO E CO-EXPRESSÃO GÊNICA	32
4.4 SELEÇÃO DOS GENES <i>DONW REGULATED</i>	33
.4 SELEÇÃO DOS GENES <i>UP REGULATED</i>	38
4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR.....	41
4.6 ANÁLISE DA CORRELAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO ESPERMOGRAMA COM OS RESULTADOS DA EXPRESSÃO GÊNICA.	42
5 DISCUSSÕES	43
REFERÊNCIAS	50
APÊNDICE	56
ANEXO 1.....	69
ANEXO 2 PRIMEIRA E ÚLTIMA PÁGINA DE APROVAÇÃO DO CONEP.....	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 VARICOCELE E INFERTILIDADE

A varicocele é uma das principais causas de infertilidade masculina tratável (BAAZEEM *et al.*, 2011). Em 1843, Curling descreveu a varicocele como dilatações das veias testiculares na porção escrotal do plexo pampiniforme, devido à dificuldade do retorno venoso nessa região (CURLING, 1843). Em um contexto geral, a incidência da doença na população é de 10 a 15%, e em homens que buscam tratamento para infertilidade, varia de 19 a 41% (WEIDNER *et al.*, 2010). Além disso, dos homens com infertilidade, 30 a 35% possuem infertilidade primária e 69 a 81% apresentam infertilidade secundária (CHOI; KIM, 2013). Na maioria das vezes a varicocele é assintomática, e quando há sintomas o mais comum é a dor testicular, encontrada em 2% a 10% dos casos (PAICK; CHOI, 2019). A diminuição do volume testicular também é um dos sintomas que quando presente no testículo esquerdo, diminuem os volumes testiculares em 73, 53 e 43% nos graus III, II e I respectivamente (SIGMAN; JAROW, 1997). O diagnóstico clínico é feito através de exame físico (INCI; GUNAY, 2013) podendo ser classificada em grau 1, quando palpável apenas durante a manobra de valsava, grau 2, palpável em repouso, e grau 3, visível e palpável em repouso (DUBIN; AMELAR, 1977; GOLDSTEIN, 2012). A varicocele subclínica não é visível e nem palpável ao exame físico, sendo evidenciada apenas por ultrassonografia com Doppler (GOLDSTEIN, 2012).

A relação entre varicocele e infertilidade foi primeiramente observada por Tulloch *et al.* (1955), e desde então diversos estudos foram realizados para melhorar a compreensão do mecanismo da doença e sua ligação com a infertilidade masculina (SIGMAN; JAROW, 1997; DIAMOND *et al.*, 2007; YANG *et al.*, 2016). Os achados mais frequentes em homens com varicocele são a diminuição na concentração, motilidade e morfologia espermática (NAFTULIN *et al.*, 1991; XUE *et al.*, 2012; KADIOGLU; ALIYEV; CELTIK, 2014), além de uma maior porcentagem de espermatozoides com cromatina anormal ou imatura (OLESZCZUK; GIWERCMAN; BUNGUM, 2016). Algumas hipóteses foram levantadas para explicar a influência da varicocele nos testículos e na qualidade seminal (BROWN; DUBLIN; HOTCHKISS, 1967; GOLDSTEIN, 2012), como por exemplo, a circulação debilitada no plexo pampiniforme causada pela varicocele que gera a desregulação da termorregulação testicular e aumento da temperatura nessa região (MASSON; BRANNIGAN,

2014). Concomitante a isso, o refluxo de metabólitos das glândulas adrenais e dos rins, tais como os hormônios epinefrina e a norepinefrina, atuam nas arteríolas testiculares causando vasoconstrição. Desse modo, os níveis de oxigênio caem, elevando os níveis de gás carbônico e como consequência ocorre hipóxia testicular devido a estase venosa. Além disso, a oclusão de pequenos vasos sanguíneos podem provocar disfunções nas células germinativas e de Leydig, ocasionando uma diminuição na secreção de andrógenos (CHOI; KIM, 2013).

1.2 ESTRESSE OXIDATIVO E FRAGMENTAÇÃO DE ÁCIDO DESOXIRRIBONUCLEICO (DNA)

A qualidade espermática é definida de acordo os valores de referência para cada parâmetro seminal. Sendo a concentração, motilidade, vitalidade e morfologia espermática os principais parâmetros seminais (WHO, 2010). A diminuição da qualidade espermática em indivíduos com varicocele parece estar associada ao aumento do estresse oxidativo e da fragmentação de DNA (NAUGHTON; NANGIA; AGARWAL, 2001; SALEH;AGARWAL, 2002; TUNC; TREMELLEN, 2008; AGARWAL *et al.*, 2012; HAMADA; ESTEVES; AGARWAL, 2013). Hendin *et al.* (1999) foram uns dos primeiros pesquisadores a evidenciar uma elevação significativa dos níveis de espécie reativas de oxigênio (EROs) em pacientes com varicocele comparados ao grupo controle, juntamente com uma diminuição do potencial antioxidante nesses indivíduos. O aumento da produção de EROs é proveniente da elevação da pressão sanguínea exercida sobre a parede das veias, nas quais as células endoteliais liberam óxido nítrico para relaxar a musculatura lisa presente no vaso, dilatando-o e aumento o fluxo sanguíneo (KRZYSCIANK; KOZKA, 2011). Além disso, os graus mais acentuados de varicocele foram correlacionados com níveis mais elevados de estresse oxidativo (ALLAMANENI *et al.*, 2004).

O processo de fragmentação do DNA espermático (FDE) é multifatorial, sofrendo influência de fatores genéticos e epigenéticos (KADIOGLU; ALIYEV; CELTIK, 2014). Alguns estudos mostraram que falhas na remodelação da cromatina durante a espermiogênese, podem levar a uma maturação incompleta do espermatozoide, bem como altos níveis de danos ao DNA (SAKKAS; ALVAREZ, 2010; CHO;ESTEVES; AGARWAL, 2016). Outro fator associado a FDE é o aumento da geração de EROs e a diminuição do potencial antioxidante. Desse modo, há peroxidação dos lipídios presentes na membrana dos espermatozoides, resultando em dano ao DNA nuclear e mitocondrial, modificação de bases, quebra nas cadeias de DNA, *cross linking* e reticulação da cromatina (AITKEN; IULIIS,

2010; SAKKAS; ALVARES, 2010). Como consequência, existe uma perda da seletividade, na troca iônica, na liberação de conteúdos pelas organelas e formação de produtos citotóxicos, resultando em dano ao DNA e podendo culminar até mesmo na morte desses espermatozoides (ROMEO; SANTORO, 2014). Alguns trabalhos vêm correlacionando FDE com alterações morfológicas, perda da motilidade e da capacidade de fertilização (SHEN *et al.*, 2002; PELUSO *et al.*, 2013). Além disso, outros estudos mostraram um aumento significativo na FDE de pacientes com varicocele, quando comparado ao grupo fértil. Associando tais resultados com o aumento do estresse oxidativo provocado pela doença, com a diminuição da qualidade seminal nesses pacientes (ENCISO *et al.*, 2006; SMITH *et al.*, 2006; BLUMER *et al.*, 2008). Entretanto, apenas a fisiopatologia da varicocele não pode explicar todas as manifestações clínicas da doença (CARREL, 2012). Acredita-se que a etiologia da doença seja complexa e multifatorial, com a associação de fatores genéticos, epigenéticos e ambientais, os quais podem estar relacionados à baixa qualidade seminal em homens com varicocele (BENOFF *et al.*, 2005).

1.3 A TRANSCRIÇÃO GÊNICA NA FERTILIDADE MASCULINA E VARICOCELE

O DNA vem sendo estudado desde 1869, quando o bioquímico alemão Johann Friedrich Miescher encontrou uma nova substância ácida e a chamou de nucleína. Essa substância foi extraída das células de glóbulos brancos presentes no pus (VEIGL; HARMAN; LAMM, 2020). Mais tarde, em 1889 Richard Altman confirmou a natureza ácida do material, denominando-a de ácido nucleico. Posteriormente em 1909, Phoebus Levine e Walter Jacobs determinaram a organização das moléculas de fosfato, do açúcar e das bases nitrogenadas (adenina, timina, guanina e citosina), como sendo a unidade fundamental, denominada de nucleotídeos (PORTIN, 2014). Contudo, a forma como os nucleotídeos se ligava e formava uma estrutura espacial, permanecia um mistério. Assim, em 1953 Watson e Crick apresentaram um modelo no qual a molécula de DNA é constituída por duas cadeias polinucleotídicas dispostas em hélice (dupla hélice). Essas cadeias são complementares, sendo ligadas por pontes de hidrogênio estabelecidas entre as bases nitrogenadas. Cada tipo de ligação é específico, ou seja, guanina parecia apenas citosina, bem como adenina apenas com timina. Dessa forma, foi possível chegar à estrutura da molécula de DNA, que por si só desempenha a função de armazenar e transmitir as informações genéticas por meio da transcrição (WATSON; CRICK, 1953).

Em 1958 Francis Crick apresenta o “Dogma Central da Biologia Molecular”, pelo qual discorre sobre a forma como o fluxo de informações genéticas ocorrem. Esse modelo diz como a sequência de um ácido nucleico pode formar uma proteína, não sendo possível o contrário. De acordo com esse modelo, o DNA contendo as informações genéticas é transcrito em uma molécula de RNA (ácido ribonucleico), que posteriormente será traduzido em uma proteína (PETTER, 2014). Entretanto, algumas mudanças foram realizadas nesse modelo e hoje sabemos que através da transcriptase reversa podemos transformar uma molécula de RNA em um DNA cópia. Em adicional sabemos também, que o produto final da transcrição nem sempre será uma proteína, podendo ser gerado nesse processo RNAs não codificantes que participam da síntese, regulação e processamento de proteínas (TRAVERS; MUSKHELISHVILI, 2015).

Para uma melhor compreensão da forma como ocorre a expressão gênica na fertilidade masculina, primeiramente é necessário compreender a molécula de RNA e seu papel nesse processo. Nesse sentido, O RNA é composto por ribonucleotídeos, que são formados por uma ribose, um fosfato e as bases nitrogenadas (citosina, guanina, adenina e uracila). Apresentam diversas funções, que podem variar com os mais de 100 tipos de modificações químicas identificadas em RNAs celulares, sendo as principais a síntese de proteína e regulação da expressão gênica (ROUNDTREE *et al.*, 2017). Esses processos são extremamente coordenados e os diferentes tipos de RNA, possuem um papel fundamental em cada um deles. Assim, temos inicialmente o RNA mensageiro (mRNA) que é definido como o meio pelo qual a informação flui do DNA para a célula. O RNA transportador (RNAt) responsável pelo transporte dos aminoácidos que serão utilizados na formação das proteínas até os ribossomos. O RNA ribossômico (RNAr), que constituem os ribossomos. Existem outros tipos de RNAs, como: RNA de interferência (RNAi), microRNAs, Piwi-interactingRNA (piRNA) dentre uma gama de outros RNAs não codificantes, que tem como função o controle da expressão gênica (HARADA *et al.*, 2001).

A regulação da expressão genica é de suma importância, pois é ela que irá definir as variações na transmissão de informações, as quais permitem que organismos unicelulares respondam ao seu ambiente. Essas variações também fornecem um meio para que células individuais que transportam informações idênticas adquiram diferentes características necessárias para suas funções em organismos multicelulares. Esse processo é extremamente coordenado, porem passível de alterações que podem ser provocadas por variações nas condições as quais o organismo se encontra (SHARP, 2009). Entretanto, existem mecanismos que controlam a expressão gênica e é compreendido no controle transcricional, no

processamento e transporte de RNA, e por fim no controle da tradução. Desse modo, além de controlar como um gene será transcrito, também confere uma espécie de proteção a possíveis erros (URIU,2016; FRYE *et al.*, 2018).

O processo de regulação e expressão dos genes que controlam a fertilidade masculina vem sofrendo constantes mudanças. Durante anos, diversos estudos vêm sendo realizados com intuito de melhorar o entendimento dos mecanismos por trás desses processos (CSILLA; ANTONI, 2018). Nesse sentido, por muito tempo acreditava-se que apenas o genoma masculino fosse introduzido no citoplasma do ovócito, que detinha o papel principal no processo de fecundação. Com as descobertas da adição do centríolo pelos espermatozoides, bem como a de RNAs, essa percepção foi sendo mudada (SIMERLY *et al.*, 1995; OSTERMEIER *et al.*, 2004). Inicialmente o estudo do RNA de espermatozoide buscava compreender o fluxo de informações genéticas contidas nessas células. Foram vistos que durante a condensação e alongação, a maquinaria transcricional era desligada e a maior parte do citoplasma das espermátides era perdida e fagocitada pelas células de Sertoli. Sendo assim, acreditava-se que o restante não fosse capaz de suportar a tradução de mRNA (MILLER; OSTERMEIER, 2006).

Abraham e Bhargava (1963) mostraram que os espermatozoides eram capazes de incorporar radioativos no RNA e em proteínas. Entretanto, mais tarde foi concluído que os espermatozoides eram transcricionalmente ativos, apesar dessa atividade se restringir a mitocôndria (MACLAUGHLIN; TERNER, 1973). A hipótese que vinha sendo aceita era que o núcleo espermático era transcricionalmente inativo, contudo, foi provado que em alguns casos, a repressão transcricional e a traducional poderiam ser desfeitas (GUR; BREITBART, 2006).

Com o passar dos anos foi observado a presença de RNA intracelular através da hibridização *in situ*, e tipos de RNA nuclear por meio da eletroforese de espermatozoides humanos e de ratos (PESSOT *et al.*,1989). Outro estudo demonstrou a presença de mRNA na peça intermediária e na cauda de espermatozoides humanos (KUMAR *et al.*, 1993). Miller (1997) evidenciou numerosos mRNAs no ejaculado através de RT-PCR e com um estudo complementar, Wykes, Visscher e Krawetz (1997) localizaram RNA no núcleo celular e ao redor dele. Não obstante, foi visto que os espermatozoides também inseriam RNAs no ovócito no momento da fecundação (OSTERMEIER *et al.*,2004). Por último, foram descritos diversos tipos de RNAs codantes e não codantes, presentes em espermatozoides, como também a demonstração de algumas atividades traducionais que davam origem a proteínas envolvidas na qualidade seminal e no desenvolvimento embrionário (MILLER *et al.*, 2005).

A função e o papel biológico dos transcritos encontrados nos espermatozoides ainda continuam desconhecidos, mas têm sido levantadas hipóteses e estudos que apontam algumas possibilidades. Uma delas é que após a capacitação espermática o espermatozoide se encontra apto a traduzir seus mRNAs através da maquinaria mitocondrial com intuito de suplementar as proteínas que foram desnaturadas ou degradadas (AOKI; LIU; CARRELL, 2006). Outra possibilidade seria a ação dos RNAs no zigoto após a fecundação, que foi visto nos estudos de Ostermeier *et al.*, (2004) sobre a inserção de RNA durante a fecundação, os quais podem participar da formação pronuclear, na organização que levam à ativação do oócito e por fim na transição do controle do gene materno para o embrionário e o estabelecimento de impressões iniciais em embriões. Além disso, foi descrito que RNAs pequenos não codantes (do inglês: *small non-coding RNA*, *sncRNA*) podem estar relacionados ao controle do início da expressão genica embrionária, bem como na repressão de elementos transponíveis e na conformação da cromatina do espermatozoide (FEDOROFF, 2001; COWLEY; OAKEY, 2013). Também foram descritos diversos tipos de microRNAs no sêmen humano, associando alguns deles a regulação do desenvolvimento e na epigenética do embrião em estágio inicial (KRAWETS *et al.*, 2011). Por fim, alguns trabalhos demonstram que homens com teratozoospermia (PLATTS *et al.*, 2007), astenozoospermia (JODAR *et al.*, 2012), e homens com infertilidade idiopática (GARCIA-HERRERO *et al.*, 2011), apresentam determinados tipos de RNAs em quantidades alteradas quando comparados a quantidade presente em homens normais.

A varicocele tem sido alvo de estudos devido a capacidade de gerar estresse térmico e oxidativo a qual pode desencadear alterações na expressão gênica (NAUGHTON; NANGIA; AGARWAL, 2001), alguns trabalhos vêm buscando compreender a expressão de genes específicos que são essenciais nos processos de espermatogênese e maturação espermática. Dentre eles temos alterações na expressão de genes que: (1) são importantes na regulação da espermatogênese, como o que codifica o receptor de andrógeno (*AR*), (ZALATA *et al.*, 2013); (2) desempenha um papel na regulação do crescimento celular e síntese de proteínas, como o gene da rapamicina (*mTOR*) (MAHRAN *et al.*, 2019); (3) são envolvidos na integridade da bainha fibrosa do flagelo, motilidade espermática e na sinalização de proteína kinase AMPc dependente (PKA) necessários para a capacitação dos espermatozoides, como Proteína da cauda associada à Rhofilina 1 (*ROPN1*) (AMER *et al.*, 2015); (4) e que expressam classes de proteínas responsáveis por manter a autoregulação celular em resposta ao calor, como o gene HSPA2 (SANTORO, 2000) e pôr proporcionar o equilíbrio entre a síntese e degradação de proteínas (SHI; MOSSER; MORIMOTO, 1998; LIMA *et al.*, 2006). Um

estudo também demonstrou diferenças entre os perfis de expressão gênica de espermatozoides de casais que obtiveram sucesso na inseminação intra-uterina quando comparados a casais que não obtiveram êxito no procedimento (GARCÍA-HERRERO *et al*, 2010). Diante disso, é possível que os espermatozoides proporcionem RNAs funcionais ao oócito durante a fertilização, bem como para o desenvolvimento embrionário (KRAWETZ, 2005; KRAWETZ *et al.*, 2011; JODAR *et al.*, 2013).

Graças a evolução da biologia molecular e com o advento do sequenciamento de nova geração (NGS), que propicia mensurar os efeitos provocados pela doença na expressão de diversos genes simultaneamente, vem se tornando possível a investigação de alterações genômicas e permitindo analisar a expressão diferencial nas mais diversas condições patológicas (SHENDURE, 2008; COSTA *et al.*, 2013). Como a pesquisa em expressão gênica se dedica a compreender a forma como, quando e quanto os genes, contidos no DNA, são expressos ao longo de seu desenvolvimento e como respondem aos mais variados tipos de estímulos de estresse, a técnica de reação em cadeia da polimerase por transcriptase reversa (do inglês: *quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction*, RTqPCR) é considerada padrão ouro para tal abordagem. Isto se deve a sua capacidade de identificar a presença de RNAs específicos de um gene, além da sua quantificação, possibilitando o estudo da expressão diferencial, ou seja, nos permite compreender como o perfil de expressão de um determinado organismo é modificado quando submetido a uma determinada condição. Trazendo assim, grande contribuição para o entendimento como a alteração do perfil de expressão de genes impacta na qualidade seminal, bem como na fertilidade de homens com varicocele. Desse modo, conhecer os mecanismos genéticos envolvidos na varicocele são de grande importância para uma melhor compreensão da doença e das causas de infertilidade nesses pacientes, especialmente para sua prevenção e tratamento adequados (SANTANA *et al.*, 2017).

1.4 JUSTIFICATIVA

A manutenção do perfil de expressão gênica em espermatozoides é essencial para a espermatogênese, função espermiática, fertilização, viabilidade e desenvolvimento embrionário. As alterações no microambiente testicular, associadas a elevação da temperatura e estresse oxidativo gerados pela varicocele, podem conduzir a modificação da expressão gênica e impactar diretamente nesses mecanismos. Desse modo, identificar a transcrição de genes importantes para a qualidade seminal, além de buscar novos marcadores genéticos, se tornam essenciais para uma melhor compreensão da doença e das causas de infertilidade nesses pacientes. Assim, contribuindo para um diagnóstico e prognóstico mais completo e assertivo acerca da varicocele.

2 OBJETIVO

2.1 OBJETIVO GERAL

Analisar os genes diferencialmente expressos em homens com varicocele utilizando dados de sequenciamento de RNA.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a qualidade seminal e a taxa de fragmentação do DNA em homens com varicocele comparados a homens férteis.
- Analisar os resultados prévios do RNA-seq por bioinformática e seleção dos principais genes diferencialmente expressos em varicocele.
- Analisar as assinaturas moleculares após enriquecimento *in silico* por meio das informações disponíveis nos bancos de dados genéticos e biológicos.
- Avaliar a expressão dos genes diferencialmente expressos por RT-qPCR em amostras provenientes de pacientes com varicocele.
- Correlacionar o perfil diferencial de expressão dos genes achados com as alterações seminais encontradas em pacientes com varicocele.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 CONTEXTO

O presente trabalho teve início a partir dos resultados obtidos do sequenciamento de RNA de uma pesquisa prévia realizada pelo grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis, do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. O estudo da doutora Viviane Paiva Santana, incluiu amostras de sêmen de homens com varicocele (n=6) e férteis sem a doença (n=3). A quantificação do número de transcritos foi realizada através do sequenciamento de RNA em larga escala (RNA-seq), utilizando o TruSeq SBS kit v5 (Illumina, EUA) em equipamento Illumina Genome Analyzer Iix (Illumina, EUA). Um total de 50.302 anotações foram destacadas pelo sequenciamento, as quais foram analisadas por bioinformática, com o objetivo de encontrar os principais genes diferencialmente expressos em varicocele.

3.2 DESENHO DO ESTUDO

Estudo prospectivo do tipo caso controle, sendo um grupo de estudo formado por homens com varicocele e o outro por homens férteis sem a doença.

3.3 PARTICIPANTES

Foram convidados para participar da pesquisa como voluntários homens sem distinção de raça ou classe social, com idade entre 18 e 40 anos. Esses voluntários foram recrutados nos serviços assistências da Divisão de Urologia do Departamento de Cirurgia e Anatomia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, sob responsabilidade do Prof. Dr. Carlos Augusto Fernandes Molina. Somente foram incluídos os homens que aceitaram participar da pesquisa após entrevista e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, e que conseguiram coletar o sêmen no dia previamente agendado. Para o grupo de estudo, foram convidados homens que apresentaram o quadro de varicocele nos graus 1, 2 e 3, diagnosticada por palpação, independentemente de sua qualidade seminal. No grupo controle foram incluídos homens férteis sem varicocele, com pelo menos dois filhos, sendo o mais novo com até dois anos de idade (EAU GUIDELINES, 2018). Em todos os grupos foram excluídos pacientes que possuíam histórico de tabagismo, uso de álcool ou consumo de drogas,

varicocelectomia prévia, portadores de síndromes genéticas, traumas testiculares, suspeita de infecções urogenitais, câncer endocrinopatias, ou qualquer tratamento que poderia influenciar nas funções testiculares, interferindo nos resultados.

3.3 COLETA DAS AMOSTRAS DE SÊMEN E ESPERMOGRAMA

Para a coleta de sêmen, o paciente foi orientado a ficar em abstinência sexual por dois a cinco dias. A coleta foi realizada uma única vez no Centro de Reprodução Humana, do Hospital das Clínicas de Ribeirão Preto em frasco coletor plástico, estéril e de boca larga, mediante masturbação e realizada em uma sala apropriada. Em seguida, a análise do espermograma foi efetuada de acordo com o protocolo adotado segundo Björndahl *et al* (2016), com a utilização de materiais estéreis e descartáveis, e aplicação dos valores de referência indicados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (WHO, 2010).

A amostra passou pela análise macroscópica realizada em cabine de segurança biológica. O frasco coletor foi colocado sobre placa aquecida a 37°C para liquefação, de forma a ser verificado o tempo de liquefação, aspecto, cor, volume, viscosidade e pH do sêmen. Em seguida, a amostra passou pela análise microscópica realizada em microscópio óptico. A concentração dos espermatozoides foi verificada em câmara Makler. A motilidade foi avaliada de acordo com o nível de progressão dos espermatozoides, sendo os mesmos classificados como progressivos, não progressivos e imóveis. A vitalidade foi feita através da coloração de uma alíquota do sêmen com corante eosina, com contagem de 100 espermatozoides. A morfologia foi determinada por meio de um esfregaço de sêmen em lâmina tratada com corante Papanicolaou, onde os espermatozoides foram classificados de acordo com as anormalidades presentes na cabeça, peça, cauda e associação de mais de uma estrutura. O critério de avaliação morfológica de espermatozoides considerados normais seguiu as referências estipuladas pelo manual da OMS (WHO 2010).

3.4 ANÁLISE DA FRAGMENTAÇÃO DE DNA

A fragmentação de DNA espermático foi mensurada através da técnica de dispersão de cromatina, utilizando o kit Halosperm G2 (Halotech DNA, Espanha), segundo as instruções do fabricante. Brevemente, a amostra de sêmen foi transferida para uma lâmina contendo agarose. Foi adicionada solução ácida para desnaturação sobre a amostra, e, posteriormente, solução de lise, ambas pertencentes ao kit. As lâminas foram lavadas com água destilada, e

então desidratadas com uma sequência de banhos em etanol 70% e 100%. Foram adicionados os corantes Eosina e Azure B, para a leitura em microscópio com contraste de fase. Foram avaliados aproximadamente 300 espermatozoides e a porcentagem de fragmentação dos espermatozoides foi calculada de acordo com os valores de referências dados pela bula do fabricante.

3.5 PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS DE ESPERMATOZOIDES

Para as análises de expressão gênica, os espermatozoides foram separados a partir da técnica de gradiente descontínuo de densidade, utilizando ISolate 40% e 80% (Irvine Scientific). O pellet contendo os espermatozoides foi ressuspensionado em PBS (Phosphate Buffered., 1x) e armazenado em nitrogênio líquido até o uso.

3.6 ISOLAMENTO DO RNA

As moléculas de RNA provenientes do sêmen foram isoladas utilizando o MasterPure Complete RNA Purification Kit (Epicentre - Illumina company), seguindo os protocolos indicados pelo fabricante. A concentração de cada amostra de RNA foi obtida através da quantificação por espectrofotômetro NanoDrop 2000C (Thermo Scientific) e a integridade foi verificada através de eletroforese em gel de agarose 1,2%.

3.7 ANÁLISE *IN SILICO*

Os dados gerados a partir do sequenciamento foram analisados utilizando a linguagem de programação R, através do pacote do Bioconductor DESeq2 (Love et al., 2014). Para a determinação dos genes diferencialmente expressos foram utilizados os filtros de $p < 0.05$ e módulo de $\log_{2}FC > 1.5$ ($|\log_{2}FC| > 1.5$). O enriquecimento funcional foi realizado através do pacote clusterProfiler, o qual proporcionou a identificação de vias relacionadas ao Gene Ontology (processos biológicos, funções moleculares e componentes celulares) e a base de dados KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes). Para pesquisa individual dos genes foi utilizado o banco de dados GeneCards, com o comando UniProtKB/Swiss-Prot. O levantamento bibliográfico foi feito por meio da base de dados do PubMed, utilizando as seguintes palavras-chaves: *EHMT2*, *HDAC2*, *PLP2*, *SPINT3*, infertilidade, varicocele, qualidade seminal, expressão gênica, fertilidade masculina.

3.8 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DOS GENES ALVOS

Para que um gene fosse selecionado como alvo para o estudo da expressão gênica por RT-qPCR, o mesmo deveria se encaixar nos seguintes critérios: Nível de expressão do gene, interação e co-expressão gênica, vias e funções associadas a varicocele.

3.9 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR

No presente estudo, foi realizada a análise de expressão diferencial dos genes selecionados, por meio de RT-qPCR. Essa análise foi realizada nas amostras individuais de cada paciente, com as alíquotas que foram previamente separadas. Para a avaliação dos genes alvos foram selecionadas amostras de pacientes com varicocele grau 1, 2 e 3, e pacientes do grupo controle fértil. Brevemente, o RNA extraído foi transcrito reversamente usando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, EUA) segundo as instruções do fabricante. A concentração de cDNA utilizada na amplificação de cada gene foram obtidas através da quantificação por espectrofotômetro NanoDrop 2000C (Thermo Scientific). Para a análise de expressão gênica foram utilizados 5uL de Power™ SYBR™ Green Master Mix (Applied Biosystems), 0,2uL Fw, 0,2 Rv, 2uL do cDNA da amostra na concentração de 25ng e 2,6uL de Ultra Pure Water (Sigma) em microplaca de 96 poços. A reação foi realizada em 40 ciclos, com 50°C 20 segundos; 95°C 10 minutos; 95°C 15 segundos; 60°C 1 minuto; curva de melt a 95°C 15 segundos; 60°C 1 minuto; 95°C 30 segundos; 60°C 15 segundos. Utilizando o aparelho ABI Prisma 7500 FAST (Applied Biosystems) com primers previamente desenhados (Tabela 1). Foram testadas as eficiências dos primers na reação através da curva de amplificação em pool de amostra nas concentrações de 200, 100, 50, 25,12,5, 6,25ng. Foi utilizada uma curva de RNA diluída de forma seriada nas concentrações de 10^8 a 10^2 cópias/reação, sendo posteriormente aplicadas na placa em triplicatas. Como gene referência foi utilizado o gene *ACTB*. O nível de expressão para os genes analisados foi calculado para cada amostra de acordo com o método de $2^{-\Delta\Delta CT}$, descrito por Livak e Scmittgen (2001).

Tabela 1. Desenho dos primers utilizados para a análise da expressão gênica.

Gene	Sequencia 5'-3'	(pb)	RefSeq
<i>ACTB</i>	CAACCCACCTCACCCCT CTCGCTCGCTCTCCCTG	90	NM_001092.1.001101.3
<i>PLP2</i>	ACCTCCATTGTTGTCCTTGTTG CCCTTCGCTCTGTGCTTCA	95	NM_002659.1.002668.2
<i>SPINT3</i>	GCCTCTCTCTCGTTTCTCCTG GTTGTTGCTGTTGCCTCCG	213	NM_006652
<i>EHMT2</i>	CGGCTACAGCTCTACCGAAC GAGATCAGCTCCCCGACATA	104	NM_025256.7:22-3552
<i>HDAC2</i>	CTGTTAATTGGGCTGGAGGA AATCAAGGATGGCAAGCAC	94	NM_001527.4.241.170.7

(pb) pares de base; (RefSeq) Sequência referência.

3.10 CÁLCULO AMOSTRAL

Foi realizado o levantamento da literatura para o cálculo amostral (JODAR *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2018). Considerando uma diferença entre as médias de 0.6 e um desvio padrão de 0.73, foram necessários 25 pacientes em cada grupo, assumindo um poder de 80% e nível de significância de 5%. O cálculo do tamanho da amostra foi realizado no programa SAS versão 9.4, considerando o procedimento PROC POWER.

3.11 ANÁLISE ESTATÍSTICA

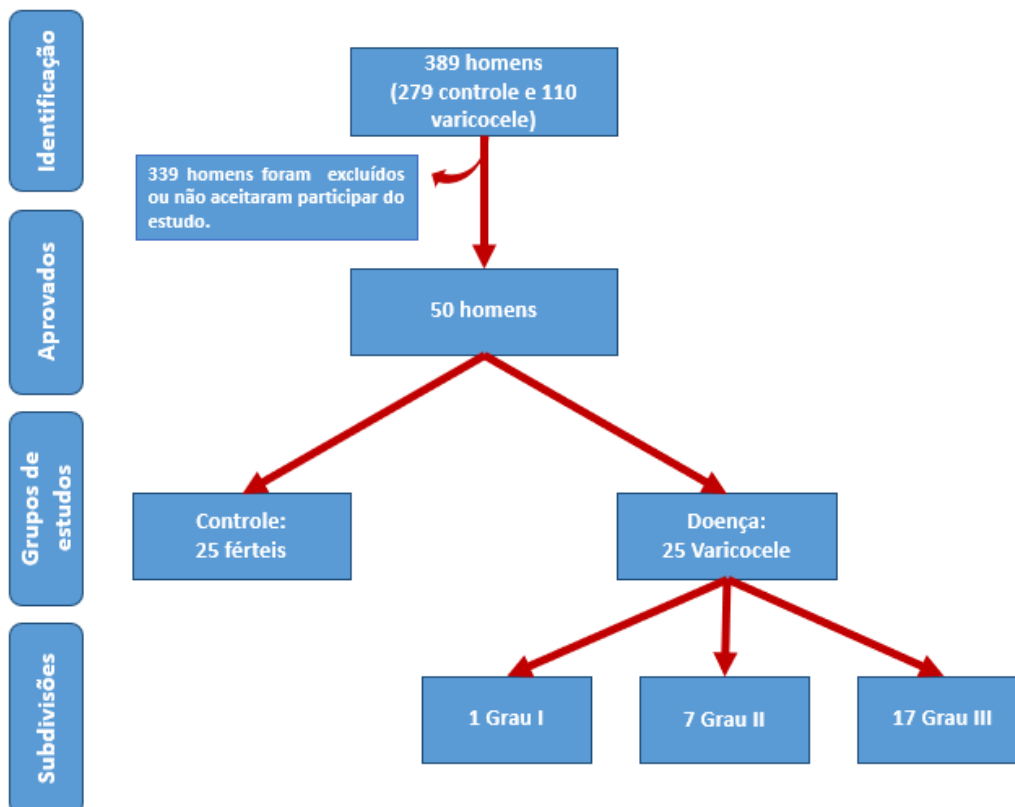
As médias e desvio padrão foram calculados para todas as variáveis investigadas. As análises de fragmentação do DNA e a expressão genica foram comparadas utilizando o teste t de Student para amostras independentes. Foi verificado a distribuição dos dados em cada grupo através de gráficos de normalidade. Caso os dados não tivessem distribuição normalmente, foi aplicado o teste não-paramétrico Mann-Whitney para comparar a distribuição das variáveis quantitativas entre grupos independentes. Para comparação das porcentagens de expressão dos genes de interesse entre os grupos amostrais foi realizado o teste exato de Fisher e a correlação entre as variáveis de interesse foram investigadas utilizando o coeficiente de correlação de Spearman. Todas as análises foram conduzidas utilizando o programa SAS® 9.0 (SAS Institute Inc., North Carolina University, NC, USA), com nível de significância de 5%.

4 RESULTADOS

4.1 SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DOS PARTICIPANTES DA PESQUISA

Foram convidados a participar da pesquisa um total de 389 homens, sendo 279 do grupo controle (72%) e 110 do grupo varicocele (28%). Dentre eles, 339 não foram incluídos (87%) por não se adequarem aos critérios de inclusão e exclusão, ou por não aceitarem participar do estudo. Um total de 50 homens (13%) foram incluídos na pesquisa, assim foram coletadas amostras de 25 pacientes férteis sem a doença, com pelos dois filhos sendo o mais novo com até dois anos de idade. No grupo varicocele foram coletadas amostras de 25 pacientes divididos por grau da doença, sendo, 1 grau I (4%), 8 graus II (28%) e 17 grau III (68%) (Figura 1).

Figura 1. Fluxograma demonstrando a distribuição dos participantes da pesquisa.



As características clínicas dos participantes, como grupo, índice de massa corporal (IMC), e as características da varicocele, como lado e grau da doença, estão apresentados na tabela 2.

Tabela 2. Grupo, grau e lado da varicocele, IMC e fertilidade dos pacientes do estudo.

Paciente	Grupo	Grau/ Lado	IMC (kg/m²)	Filhos
1	V	I	33,57	Sim
2	V	Esquerdo II	26,03	Não
3	V	Esquerdo II	23,72	Não
4	V	Esquerdo II	27,73	Sim
5	V	Esquerdo II	25,59	Não
6	V	Esquerdo / I Direito II	25,62	-
7	V	Esquerdo II	25,48	Não
8	V	Esquerdo II	31,71	Sim
9	V	Esquerdo / I Esquerdo III	18,81	Não
10	V	Esquerdo III	22,86	Sim
11	V	Esquerdo III	24,90	Não
12	V	Esquerdo III	28,46	Não
13	V	Esquerdo III	25,06	Não
14	V	Esquerdo / II Direito III	28,35	Sim
15	V	Bilateral III	33,24	Não
16	V	Esquerdo III	26,04	-
17	V	Esquerdo III	23,84	Sim
18	V	Esquerdo III	24,10	Não
19	V	Esquerdo / I Direito III	23,14	-
20	V	Esquerdo III Esquerdo / II	31,83	Não
21	V	Direito III	27,40	Não
22	V	Esquerdo III	17,96	Não

		Esquerdo / II		
		Direito		
23	V	III	20,24	Não
		Bilateral		
24	V	III	28,72	Sim
		Esquerdo		
25	V	III	26,12	Sim
		Esquerdo		
26	F	ausente	29,41	Sim
27	F	ausente	25,26	Sim
28	F	ausente	30,80	Sim
29	F	ausente	25,56	Sim
30	F	ausente	28,08	Sim
31	F	ausente	-	Sim
32	F	ausente	23,15	Sim
33	F	ausente	24,02	Sim
34	F	ausente	-	Sim
35	F	ausente	26,15	Sim
36	F	ausente	27,28	Sim
37	F	ausente	28,40	Sim
38	F	ausente	24,78	Sim
39	F	ausente	20,52	Sim
40	F	ausente	25,71	Sim
41	F	ausente	21,62	Sim
42	F	ausente	-	Sim
43	F	ausente	26,85	Sim
44	F	ausente	26,62	Sim
45	F	ausente	22,64	Sim
46	F	ausente	24,57	Sim
47	F	ausente	30,30	Sim
48	F	ausente	27,68	Sim
49	F	ausente	25,10	Sim
50	F	ausente	20,96	Sim

Grupo V: pacientes com varicocele; Grupo I: pacientes inférteis; Grupo F: pacientes férteis; IMC: índice de massa corpórea.

Foi observado um aumento de espermatozoides com alterações morfológicas ($p = 0,0018$) no grupo varicocele quando comparado ao grupo controle (Tabela 3). Não foi constatada diferença em relação à fragmentação de DNA espermático entre os grupos. Quando foi realizada análise das variáveis propostas separando os indivíduos de acordo com o grau da doença, não foram observadas diferenças estatísticas, de forma que a varicocele afetou a qualidade seminal independente da sua classificação clínica (Tabela 4).

Tabela 3. Parâmetros seminais e fragmentação do DNA de pacientes com e sem varicocele.

Variável	Varicocele	Controle	<i>p</i>
Volume (mL)	2,70 ± 1,42	3,22 ± 1,22	0,1333
pH	8,74 ± 0,46	8,58 ± 0,26	0,3039
Concentração (x10⁶ mL)	32,16 ± 34,73	83,59 ± 63,83	0,0004
Concentração Total (x10⁶ mL)	87,02 ± 110,67	272,78 ± 243,90	0,0002
Progressivos (%)	31,94 ± 14,90	32,71 ± 12,60	0,9927
Não progressivos (%)	33,62 ± 15,53	36,38 ± 10,84	0,5706
Imóveis (%)	38,24 ± 19,15	30,90 ± 6,64	0,4806
Vitalidade (%)	73,46 ± 22,88	85,71 ± 4,29	0,0285
Morfologia (%)	2,28 ± 2,08	4,05 ± 2,14	0,0018
FDE (%)	28,23 ± 15,19	30,11 ± 6,62	0,1970

Valores em média ± desvio padrão. FDE: fragmentação do DNA espermático. Significância (p<0,05).

Tabela 4. Parâmetros seminais e fragmentação do DNA do grupo de homens com varicocele, subdivididos de acordo com o grau da doença.

Variável	Grau 2	Grau 3	<i>p</i>
Volume (mL)	2,62 ± 1,18	2,79 ± 1,69	0,9898
Ph	8,55 ± 0,47	8,54 ± 0,50	0,8129
Concentração (x10⁶ mL)	48,01 ± 50,82	19,35 ± 17,95	0,5154
Concentração Total (x10⁶ mL)	115,95 ± 143,29	66,11 ± 101,88	0,4965
Progressivos (%)	32,09 ± 13,13	32,08 ± 13,84	0,9949
Não progressivos (%)	34,71 ± 9,93	37,86 ± 7,24	0,2949
Imóveis (%)	32,86 ± 14,21	35,00 ± 15,81	0,2987
Vitalidade (%)	76,78 ± 19,81	75,50 ± 22,31	0,5315
Morfologia (%)	2,36 ± 2,34	1,67 ± 0,98	0,7052
FDE (%)	26,18 ± 11,46	31,55 ± 19,10	0,7491

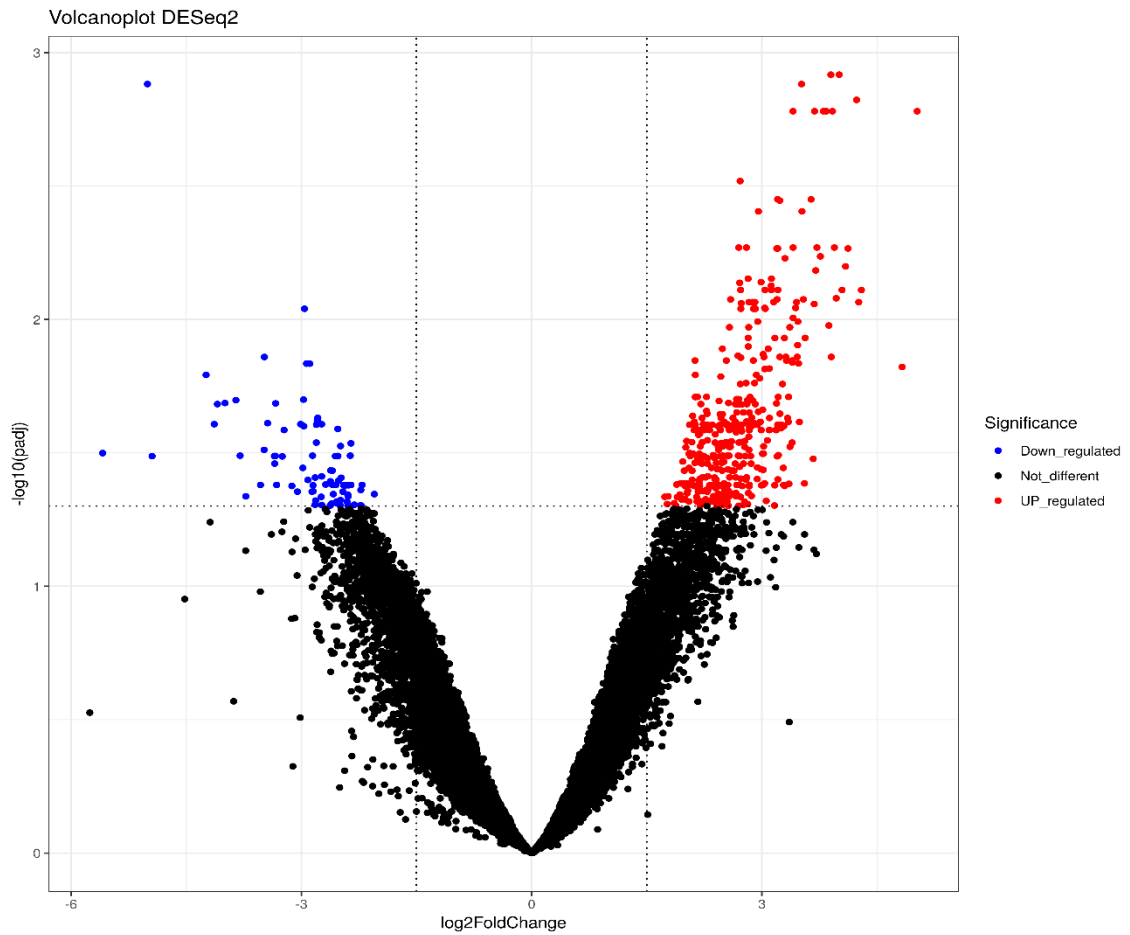
Valores em média ± desvio padrão. FDE: fragmentação do DNA espermático. Significância (p<0,05)

4.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR BIOINFORMÁTICA

Os dados brutos provenientes do sequenciamento de RNA, foram analisados e minerados por análises de bioinformática. Inicialmente foram encontrados um total de 494 genes diferencialmente expressos entre homens com varicocele e férteis sem a doença (Apêndice 1). Desses, 94 genes (19%) estavam *up-regulated* e 400 genes (81%) estavam *down-regulated* em varicocele (Figura 2 e 3). Do número total de genes, 368 eram

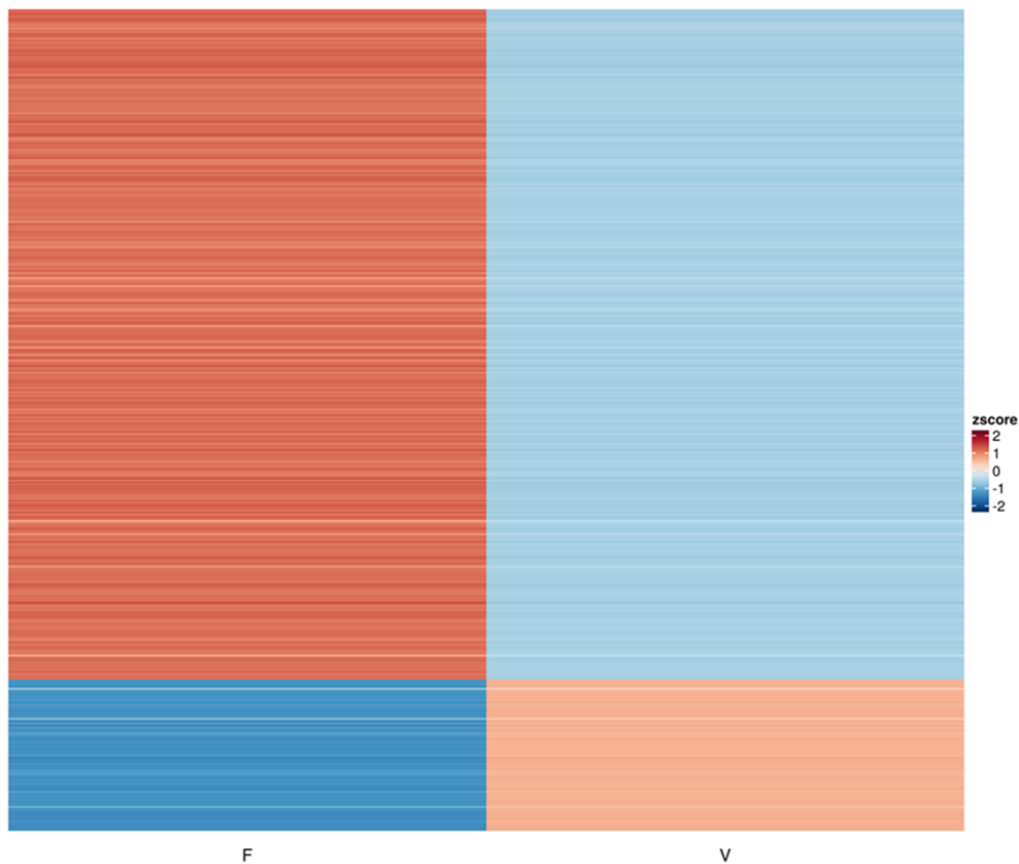
codificadores de proteínas (74%), 46 IncRNAs (9%), 43 pseudogenes (8%), 6 miRNA (1%), 31 pertencentes a outras classes (6%).

Figura 2. *Volcano plot* dos genes diferencialmente expressos entre os grupos fértil e varicocele.



As cores azuis e vermelho mostram a relação entre a diminuição e o aumento da expressão de genes no grupo fértil em relação ao grupo varicocele.

Figura 3: Heatmap dos 494 genes diferencialmente expressos entre homens com varicocele e férteis sem a doença.



F= Fértil V=Varicocele Zscore= Nível de expressão do gene, sendo 2 mais expresso e -2 menos expresso.

Os 494 genes foram filtrados novamente a fim de descobrir os genes com maior e menor grau de expressão, bem como de suas características. Foram considerados genes diferencialmente expressos aqueles com valor de $p < 0,05$. Foram montados agrupamentos hierárquicos, baseados nos níveis de expressão gênica de acordo com o p -valor ajustado de 0,05 e logFC de 1,5. Desse modo, os genes foram separados nos 10 mais *up-regulated*, 10 menos *down-regulated* e de acordo com suas classes (Tabelas 5 e 6). Nos 10 genes *up-regulated*, foram encontrados 6 genes codificadores de proteínas, 3 lincRNA e 1 pseudogene. Já nos 10 genes *down-regulated* foram achados apenas genes codificadores de proteínas. O objetivo dessa última análise foi de minerar os genes com maior percentual de alteração em seu perfil de expressão, bem como excluir outros tipos de RNAs não codantes. Assim, foram selecionados 6 potenciais genes no grupo dos *up-regulated* e 10 no grupo dos *down-regulated*, para serem pesquisados nas análises de enriquecimento de vias e funções, além da análise de coexpressão.

Tabela 5. Top 10 genes mais expressos em varicocele.

Colocação	Nome do gene	Tipo do gene	log2FoldChange	Valor de <i>p</i>
1º	<i>RP11-229P13.5</i>	lincRNA	5.5893	0.0316
2º	<i>RP11-294O2.2</i>	protein_coding	5.0054	0.0013
3º	<i>SPINT3</i>	protein_coding	4.9450	0.0325
4º	<i>RGS7BP</i>	protein_coding	4.2416	0.0161
5º	<i>RP11-274B21.4</i>	processed_pseudogene	4.1359	0.0246
6º	<i>ZNF792</i>	protein_coding	4.0940	0.0207
7º	<i>RP11-304L19.5</i>	lincRNA	3.9954	0.0205
8º	<i>PLP2</i>	protein_coding	3.8533	0.0200
9º	<i>PEMT</i>	protein_coding	3.7982	0.0323
10º	<i>RP11-452C8.1</i>	lincRNA	3.7238	0.0460

Tabela 6. Top 10 genes menos expressos em varicocele.

Colocação	Nome do gene	Tipo do gene	Log2FoldChange	Valor de <i>p</i>
1º	<i>MED21</i>	protein_coding	-1.9540	0.04726
2º	<i>RFX3</i>	protein_coding	-1.9419	0.04115
3º	<i>HDAC2</i>	protein_coding	-1.9319	0.04528
4º	<i>YY1API</i>	protein_coding	-1.8975	0.04631
5º	<i>SCMH1</i>	protein_coding	-1.8908	0.04155
6º	<i>MLXIP</i>	protein_coding	-1.8774	0.04981
7º	<i>YPEL1</i>	protein_coding	-1.8578	0.04882
8º	<i>AKAP8L</i>	protein_coding	-1.7790	0.04601
9º	<i>ALKBH7</i>	protein_coding	-1.7664	0.04918
10º	<i>MAPKAPK2</i>	protein_coding	-1.7350	0.04621

4.3 AGRUPAMENTO DOS GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS POR ANÁLISE DE INTERAÇÃO E CO-EXPRESSÃO GÊNICA

Nessa etapa, os 494 genes diferencialmente expressos foram analisados por interação e co-expressão gênica e posteriormente enriquecidos no Gene Ontology. Assim, foram formados 9 módulos (Tabela 7), os quais agrupavam os genes que eram co-expressos e apresentavam processos biológicos e moleculares relacionados. Os genes Hubs, que são aqueles que apresentam maior número de ligações gene a gene, também foram agrupados, devido ao fato de os mesmos serem considerados genes chaves de vias e por apresentarem grande importância biológica.

Tabela 7. Módulos de co-expressão e similaridade de função.

Módulo	Total de genes	Genes Hubs	Processos biológicos e moleculares (GO)
1°	357	13	Regulação da divisão nuclear e fissão de organelas.
2°	53	14	Processo metabólico de RNA, biogênese do ribossomo e constituinte estrutural do ribossomo.
3°	43	15	Regulação de fatores pró inflamatórios e regulação de fatores transcricionais.
4°	16	10	Centro germinativo de células B.
5°	8	2	Ligação de quimiocinas, fusão de mieloblasto e formação de sincício.
6°	5	2	Ativação da acetilgalactosamiltransferase e galactosiltransferase, biossíntese de oligossacarídeos.
7°	5	3	Diferenciação de células B maduras, regulação da diferenciação de células dendríticas e complexo de transporte de Golgi.
8°	3	3	Transporte de ribonucleoproteínas, regulação de glicoquinases e resposta a íons de magnésio.
9°	2	2	modificação de proteínas pós-tradução e metabolismo de lipopolissacarídeo.

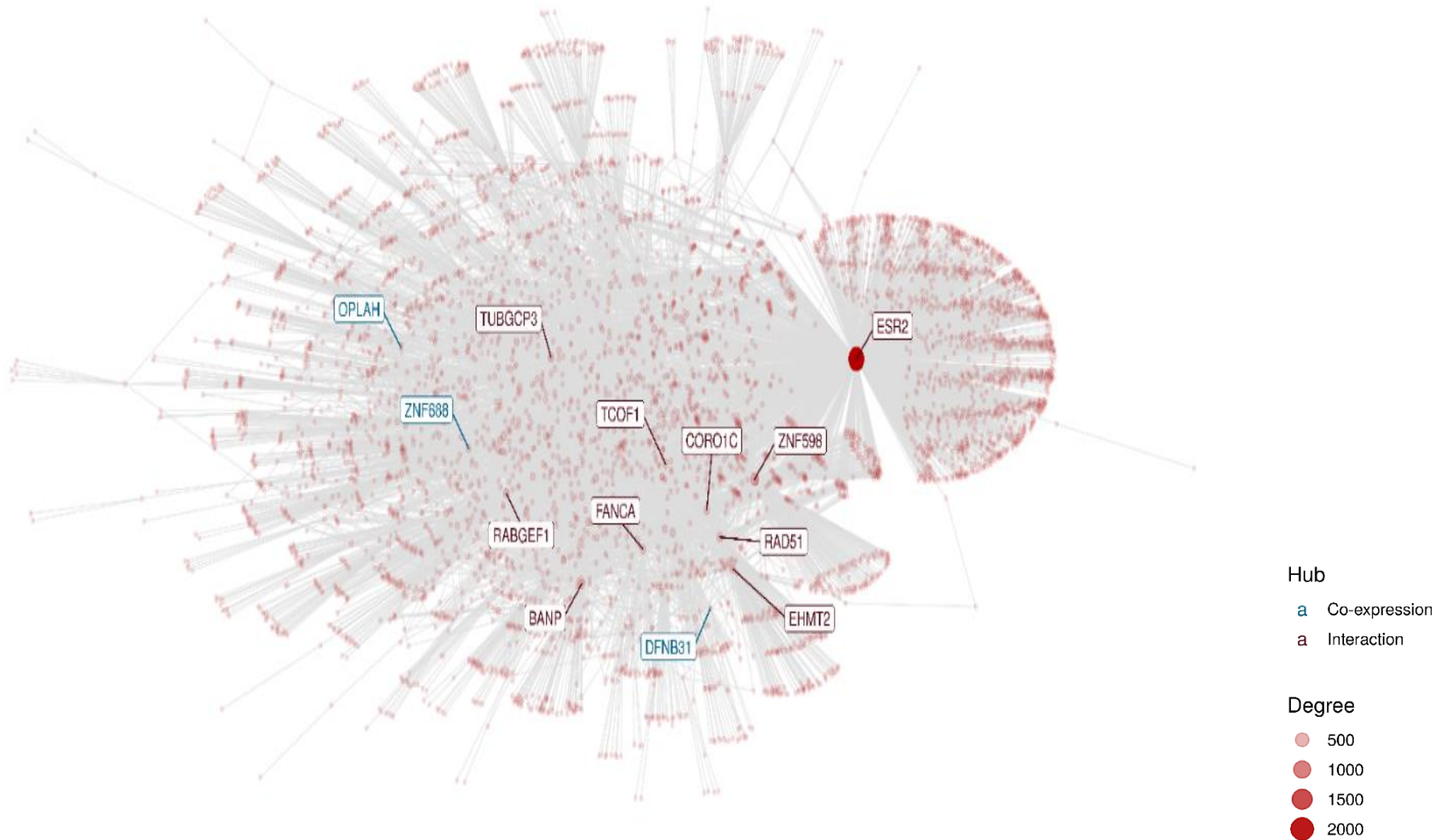
(Genes hubs): Genes de vias chaves. (Go) Gene ontology.

4.4 SELEÇÃO DOS GENES *DONW REGULATED*

Com a análise dos 9 módulos, verificamos que no módulo 1 (figura 4) foram encontrados um total de 357 genes (72%), sendo 13 genes hubs (4%), os quais foram enriquecidos e apresentaram funções biológicas relacionadas a regulação da divisão nuclear e participação no processão de divisão de organelas. Esse módulo apresentou o maior número de genes diferencialmente expressos, porém quando esses genes foram correlacionados com o grupo dos 10 genes mais *up regulated* e *down regulated*, nenhum dos 357 genes foram encontrados nesse grupo. Contudo, um gene Hub em particular, o *EHMT2* (Euchromatic Histone Lysine Methyltransferase 2) ou (G9a) quando analisado na data base da GeneCards, com o comando UniProtKB/Swiss-Prot Function, o qual confere as funções moleculares de

genes específicos individualmente, mostrou que o gene participa de processos relacionados ao recrutamento de reguladores epigenéticos adicionais e na repressão da transcrição. Desse modo, foram feitas buscas no PubMed, com o intuito de analisar estudos que correlacionassem o gene a regulação epigenética na fertilidade. Os resultados mostraram que uma deleção no gene *EHMT2* pode induzir a uma perda acentuada nas células germinativas, e como consequência levar a uma diminuição da fertilidade. Tais características influenciaram para a escolha do *EHMT2* como gene *down regulated* alvo para o estudo da expressão genica. O módulo 2 (Figura 5) apresentou um total de 53 genes (11%), sendo 14 genes hubs (26%) que participam do processo metabólico de RNA, constituem estruturalmente os ribossomos e participam da biogênese dos mesmos. Nenhum dos 53 genes desse grupo pertenciam aos top 10 genes. O módulo 3 (figura 6) apresentou 43 genes (9%), sendo 15 genes hubs (35%), que tem como principais processos a regulação de fatores pró-inflamatórios e transcricionais. Ao correlacionarmos os 43 genes com os 10 genes mais *up regulated* e *down regulated*, encontramos o gene *HDAC2* (Histone Deacetylase 2), número 3 entre os 10 menos expressos, além de apresentar um grande número de ligações com outros genes, sendo considerado um gene Hub. Não obstante, o gene *HDAC2* foi pesquisado individualmente na banco de dados da GeneCards, da mesma forma que o gene escolhido anteriormente. Desse modo, verificamos que o gene tem importante função na regulação transcricional, progressão do ciclo celular e eventos do desenvolvimento. Por fim não existindo nenhum outro gene menos expresso com tal importância nos demais módulos, o gene *HDAC2* foi selecionado como o segundo gene *down regulated* para o estudo da expressão gênica.

Figura 4: Rede de co-expressão e interação genica do módulo 1.



M2

Figura 5: Rede de co-expressão e interação genica do módulo 2.

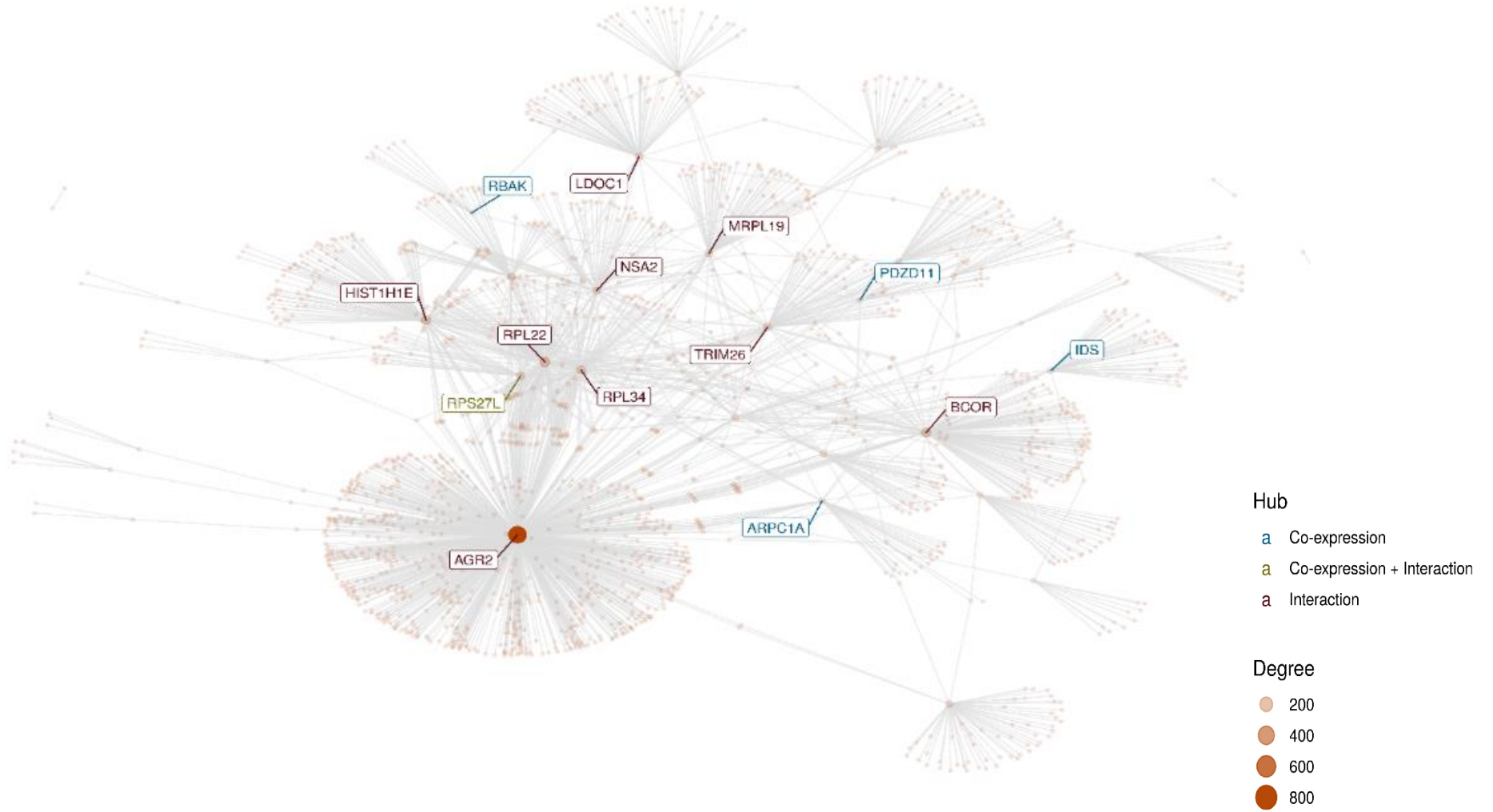
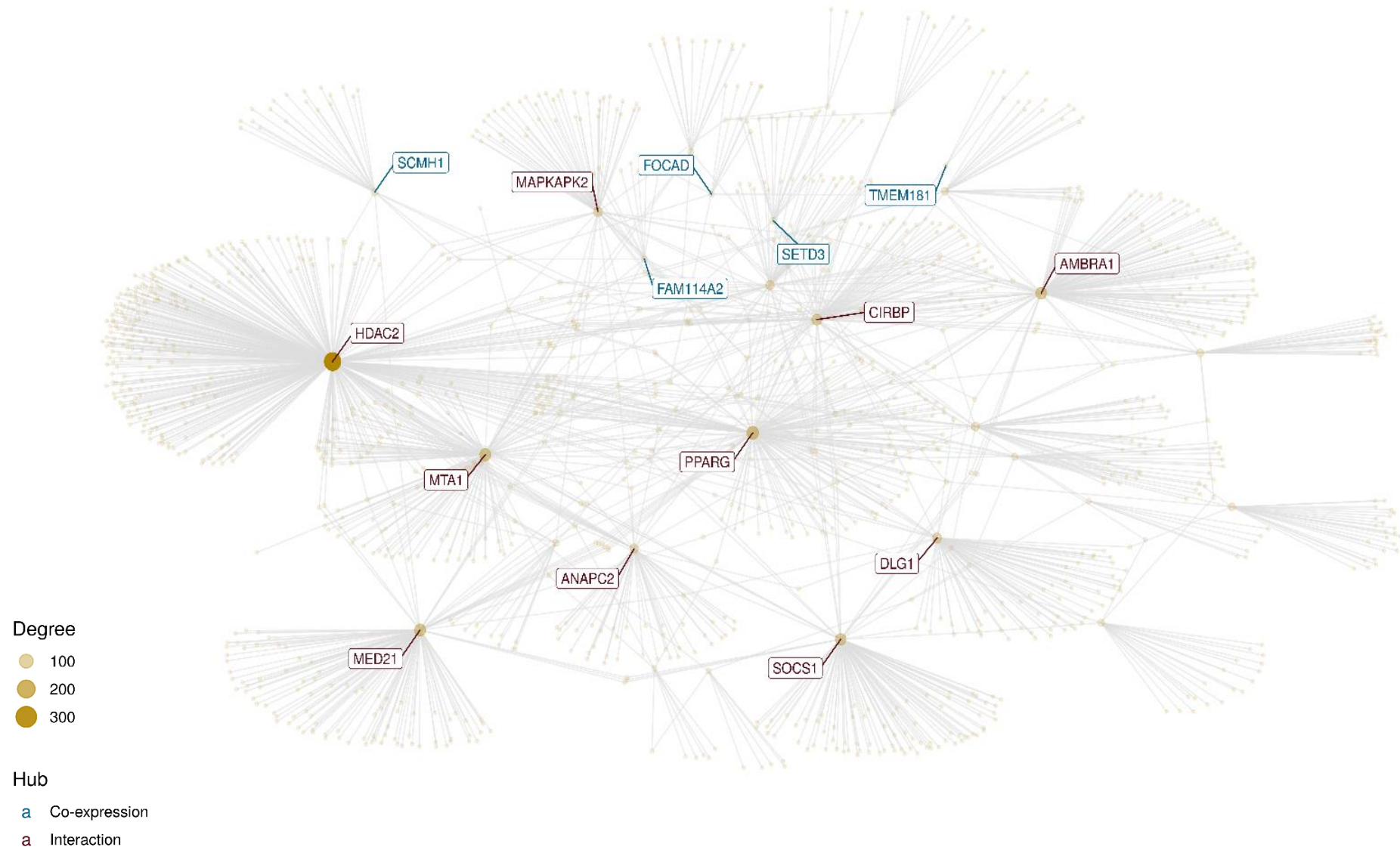


Figura 6: Rede de co-expressão e interação genica do módulo 3.



.4 SELEÇÃO DOS GENES *UP REGULATED*

Com o achado dos 2 genes *down regulated*, considerados de maior importância para o estudo, restaram a seleção dos 2 genes *up regulated*. Entretanto, nessa etapa as buscas se resumiram aos 6 módulos restantes, visto que nos 3 módulos anteriores nenhum dos genes em potencial eram *up regulated*. O módulo 4 (figura 7) apresentou um total de 16 genes (3%), sendo 10 genes hubs (2%) que apresentaram funções biológicas e moleculares relacionadas aos centros germinativos de células B, os quais são responsáveis pela geração de células de memória. Não obstante, dos 16 genes, 9 deles (56%) eram não codificantes de proteínas e dos 7 restantes apenas 1 (6%) era *up regulated* e que não pertencia ao top 10 genes *up regulated*, não apresentando funções que pudessem ser relacionadas a fertilidade masculina, quando pesquisado individualmente em outras bases de dados. Os demais 5 módulos, juntos apresentaram um total de 23 genes (5%), dos quais 12 eram hubs. Dentre as principais funções biológicas e moleculares observadas nesses módulos, foram destacadas as seguintes: Ligação de quimiocinas, fusão de mieloblasto e formação de sincício para o módulo 5; ativação da acetilgalactosamiltransferase e galactosiltransferase, biossíntese de oligossacarídeos para o módulo 6; diferenciação de células B maduras, regulação da diferenciação de células dendríticas e complexo de transporte de Golgi para o módulo 7; transporte de ribonucleoproteínas, regulação de glicoquinases e resposta a íons de magnésio para o módulo 8; modificação de proteínas pós-tradução e metabolismo de lipopolissacarídeo para o módulo 9. Dentre os 5 módulos restantes e diante de tais características, foram identificados dois genes *up regulated*, pertencentes ao top 10 genes mais expressos, sendo assim, de grande interesse para o estudo. Os genes SPINT3 (serine peptidase inhibitor, Kunitz type 3) e PLP2 (Proteolipid Protein 2), que expressão proteínas que participam do processo de coagulação seminal e que codificam proteínas multiméricas que funcionam como canais iônicos respectivamente. Por fim, com a seleção dos 4 genes de maior interesse para o estudo, foram sucedidas as análises da expressão gênica por RT-qPCR.

Figura 7: Rede de co-expressão e interação gênica do módulo 4.

M4

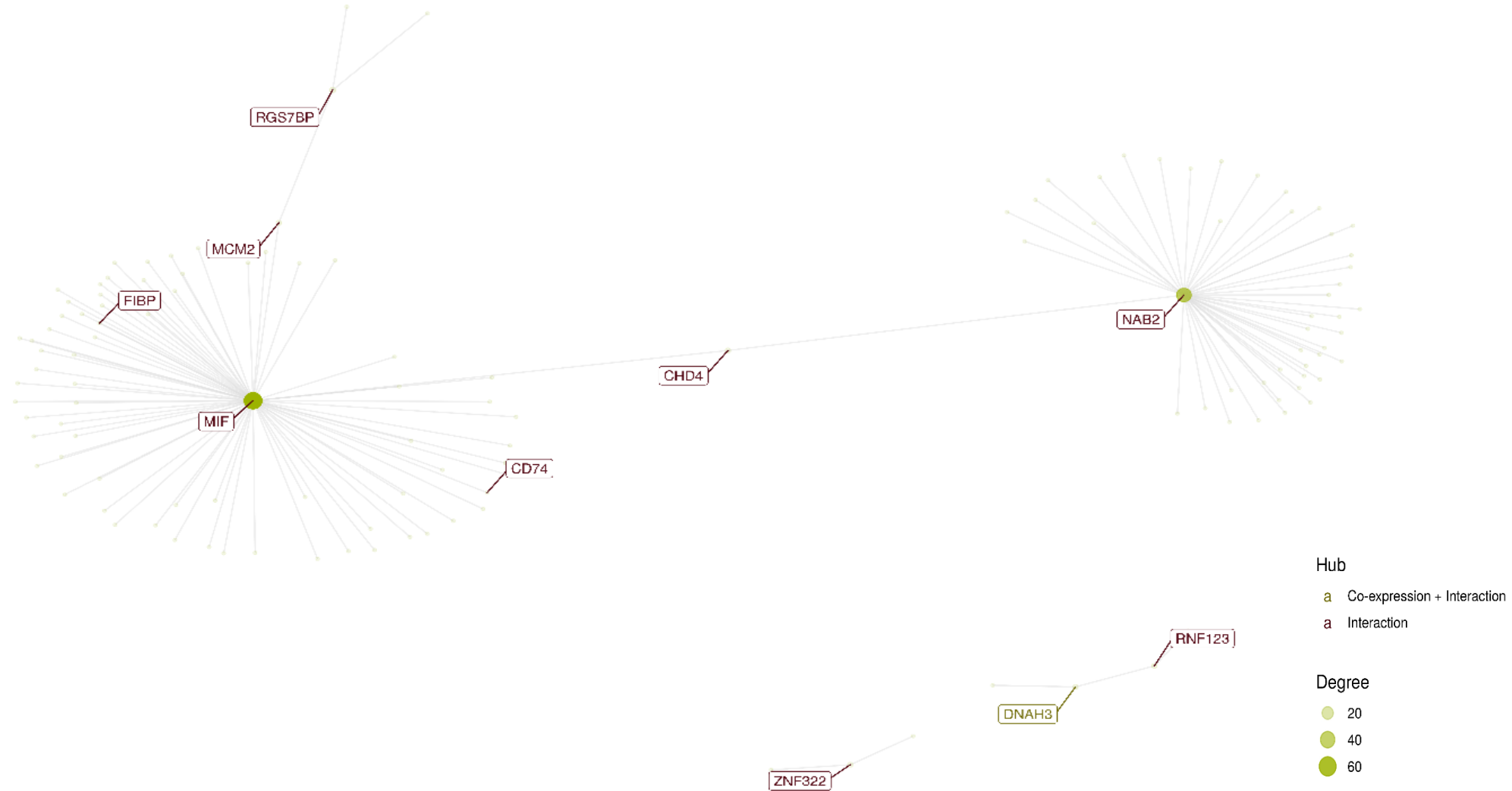
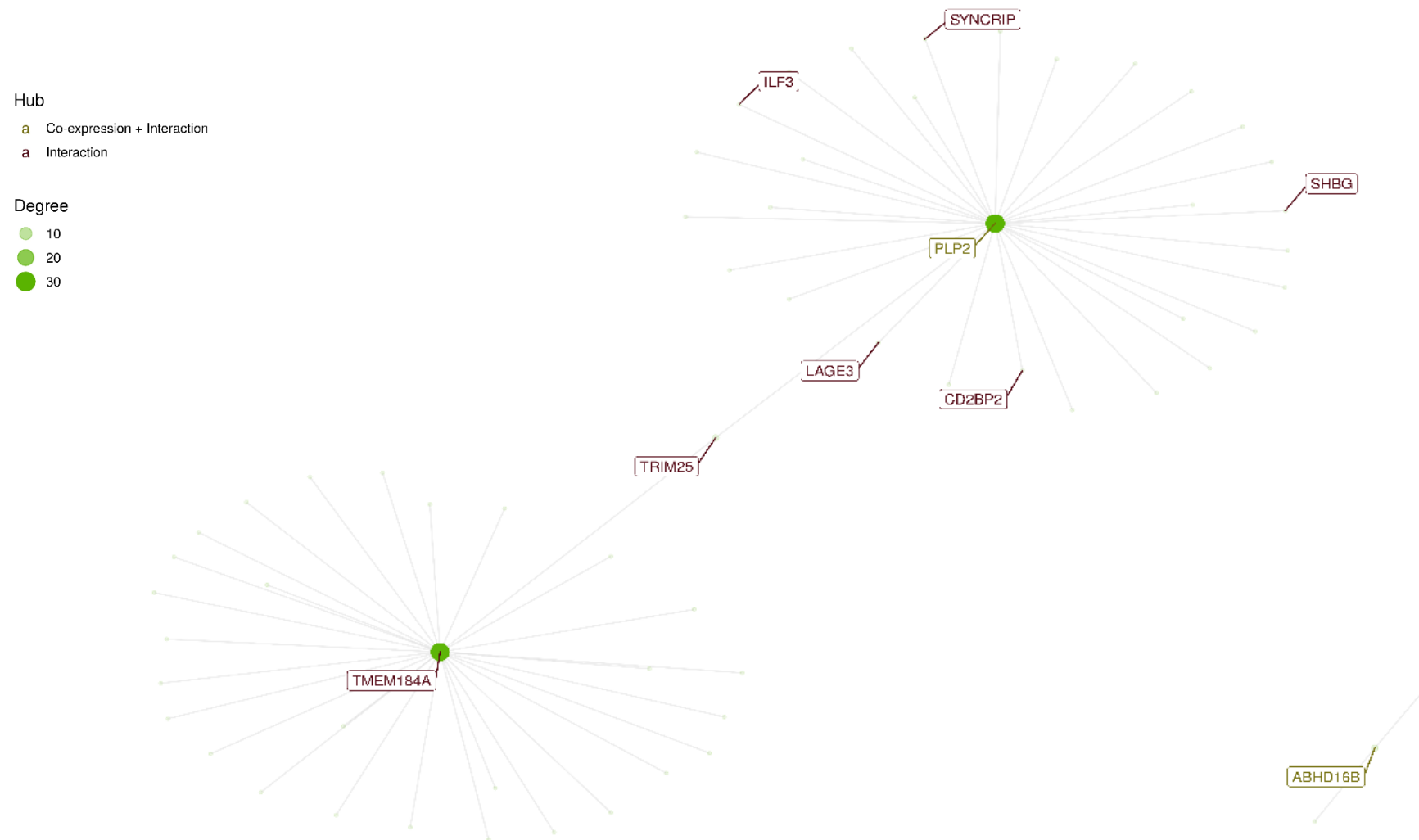


Figura 8: Rede de co-expressão e interação gênica do módulo 5.

M5



4.5 ANÁLISE DA EXPRESSÃO GÊNICA POR RT-QPCR.

Os resultados da análise da expressão gênica por RT-qPCR mostraram inicialmente uma fragilidade nos genes *SPINT3* e *EHMT2*, de modo que ambos os genes tiveram que ser excluídos do estudo, restando apenas os genes *HDAC2* e *PLP2*. Essa fragilidade estava relacionada à amplificação dos mesmos, devido a utilização de primers que não apresentam a especificidade desejada somada ao esgotamento das amostras destinadas para ambos os genes. Na análise da expressão dos demais genes, observamos que a média da quantificação relativa (QR) do gene *HDAC2* foi de 0,542 para o grupo varicocele, contra 1,506 no grupo controle, mostrando uma diminuição da expressão do gene no grupo varicocele (Gráfico 1). O gene *PLP2* também apresentou uma diminuição de sua expressão quando os grupos foram comparados. Desse modo, no grupo varicocele observamos uma QR de 0,227 e de 0,739 no grupo controle (Gráfico 2).

Gráfico 1: Comparação do nível de expressão do gene *HDAC2* entre os grupos de estudo e controle ($p=0,0020$), QR/*HDAC2*= Frequência relativa.

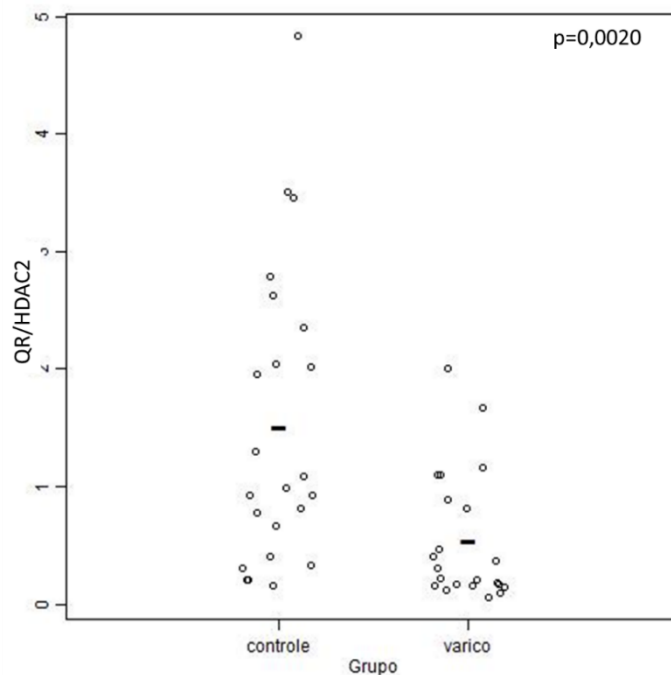
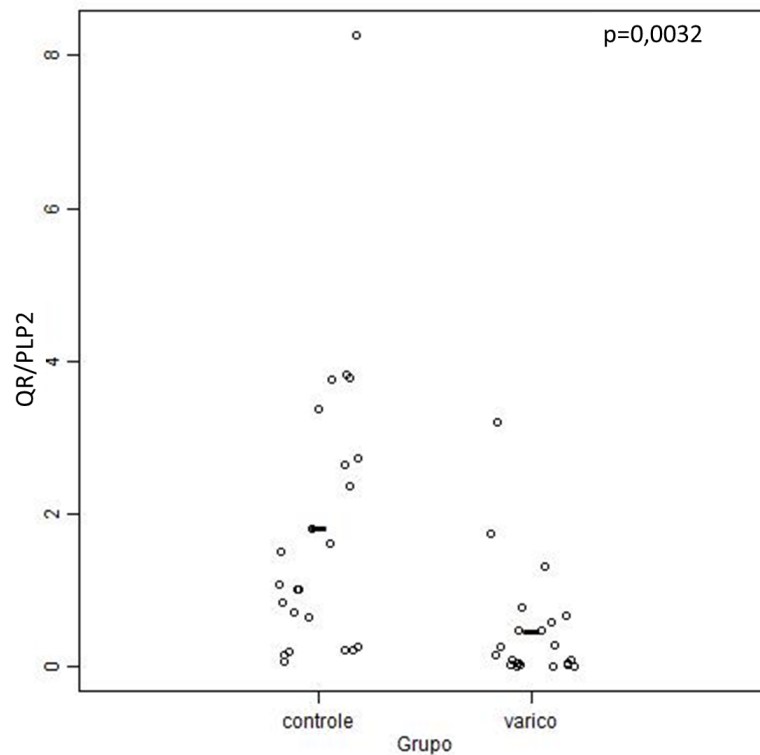


Gráfico 2: Comparação do nível de expressão do gene *PLP2* entre os grupos de estudo e controle ($p=0,0032$), QR/PLP2= Frequência relativa



4.6 ANÁLISE DA CORRELAÇÃO DAS VARIÁVEIS DO ESPERMOGRAMA COM OS RESULTADOS DA EXPRESSÃO GÊNICA.

Os resultados obtidos através da análise de expressão gênica, foram correlacionados com as variáveis encontradas no espermograma dos 50 pacientes pertencentes ao estudo. Nossos resultados mostraram uma fraca correlação negativa, entre o gene *HDAC2* ($p = -0,464$) e a variável concentração. A mesma variável analisada não apresentou estatística significativa para o gene *PLP2*, o qual obtivemos um valor de $p=0,324$. No caso da viável morfologia, os resultados mostraram uma correlação positiva moderada, tanto para o gene *HDAC2* ($p=0,601$), quando para o gene *PLP2* ($p=0,507$) (Tabela 8). Não foram observadas correlações entre as demais variáveis analisadas em nosso trabalho.

Tabela 8: Correlação entre as variáveis espermáticas e expressão gênica.

	QR <i>PLP2</i>	QR <i>HDAC2</i>
Concentração.	0.32451 p=0.0296 n=45	-0.46487 p=0.0013 n=45
Concentração total.	0.26478 p=0.0788 n=45	0.33846 p=0.0230 n=45
Motilidade progressiva.	0.25268 p=0.0940 n=45	0.27399 p=0.0686 n=45
Motilidade não progressiva.	-0.13250 P=0.4029 n=42	-0.14079 p=0.3738 n=42
Imóveis.	-0.18582 p=0.2387 n=42	-0.20611 p=0.1904 n=42
Vitalidade.	0.15719 p=0.3141 n=43	0.18669 p=0.2306 n=43
Morfologia.	0.50741 p=0.0004 n=45	0.60194 p<.0001 n=45

QR= Quantificação relativa.

5 DISCUSSÕES

Os resultados mostraram um aumento significativo dos espermatozoides com morfologia alterada. Esse resultado compactua com os achados mais frequentes no espermograma de homens com varicocele (NAFTULIN *et al.*, 1991; XUE *et al.*, 2012; KADIOGLU; ALIYEV; CELTIK, 2014). O motivo atrelado a esse aumento pode estar relacionado a elevação da temperatura escrotal, proporcionado pela regurgitação do sangue abdominal quente por meio de válvulas não funcionais, aumento a temperatura escrotal dos indivíduos com a doença em 2,6 C° (GOLDSTEIN; EID, 1989; GAROLLA *et al.*, 2015). Esse aumento da temperatura escrotal leva a danos ao DNA e proteínas nucleares espermáticas, gerando apoptose e resultando em hipotrofia testicular e espermatogênese alterada (NAUGHTON; NANGIA; AGARWAL, 2001). O presente trabalho conflitua-se com a literatura ao não apresentar um aumento significativo nas taxas de FDE dos indivíduos com varicocele. É possível que o número amostral do estudo não tenha sido o suficiente para demonstrar uma estatística significativa. Entretanto, o aumento das taxas de FDE é bem caracterizado por outros estudos (SAKKAS; ALVAREZ, 2010; CHO *et al.*, 2016). Diferente de outros trabalhos que correlacionaram o grau mais elevado da doença, com a diminuição progressiva dos parâmetros seminais (LIBMAN *et al.*, 2006; BAAZEEM *et al.*, 2009), os resultados desse estudo não apresentaram estatística significativa que dessem base para essa afirmação. Talvez fosse necessário padronizar o número total de indivíduos coletados por

grau de varicocele, proporcionando assim uma estatística mais assertiva para esse tipo de análise. Outros estudos na população brasileira, contendo um número amostral maior entre os diferentes graus da doença, podem oferecer uma melhor compreensão dos efeitos da progressão da varicocele, levando em consideração a influência das características genéticas e ambientais do Brasil nesse processo.

As causas que levam os homens a desenvolverem a varicocele ainda são controversas, de forma que a doença apresenta características multifatoriais, as quais sofrem influência de fatores tanto epigenéticos como genético. O entendimento desses mecanismos é de grande valia para o melhor entendimento da etiologia da doença (SANTANA *et al.*, 2017; SANTANA *et al.*, 2020). Com o surgimento das plataformas de sequenciamento de nova geração (NGS), associado as análises de bioinformática, vislumbramos uma série de possibilidades de estudos com os mais diversos tipos de aplicações, como: na medicina molecular, na terapia de genes, no desenvolvimento de drogas, na biotecnologia etc. Através dessas tecnologias é possível analisar sequências de DNA e RNA, relações estrutura/função de proteínas, organização do genoma, regulação da expressão gênica, interação de proteínas, mecanismos e funções fisiológicas (MARDIS, 2008). Com o auxílio dessas ferramentas, nosso estudo utilizou-se de uma série de análises de bioinformática, com objetivo de minerar genes que fossem melhores relacionados não só com a fertilidade masculina, mas com a varicocele. Assim, conseguimos reduzir o número total de anotações, antes 50.302, para os 494 genes diferencialmente expressos. Mesmo diante dessa redução significativa no número total, foi necessário estabelecer nossos critérios de seleção, pois nosso objetivo inicial era selecionar apenas os principais genes diferencialmente expressos que tivessem alguma relação com vias e funções relacionadas a fertilidade masculina, bem como na doença. Com o auxílio da literatura, vimos que através das análises de co-expressão gênica e enriquecimento de vias e funções, poderíamos dividir e posterior juntar os genes segundo as suas características de interação gênica (WIREDJA; BEBEK, 2017; YANG *et al.*, 2017). Assim agrupamos os genes em 9 módulos de similaridade e posteriormente dispomos os mesmos em redes de interação e co-expressão gênica. Desse modo, os nós representam os genes e as arestas representam as conexões desse gene, que foram obtidas por meio dos dados de co-expressão e interação entre os genes. Além dos nós e das arestas, temos os genes hubs, que são aqueles que apresentam maior número de conexões, sendo considerados de grande importância para a manutenção da estrutura da rede e conseqüentemente, apresentam maior relevância biológica. Além disso, foi visto que o aumento da expressão de genes hubs, está associado a letalidade do sistema biológico estudado, isso se dá pela ausência da expressão proteínas essenciais para a sobrevivência das células (HORVATH; DONG, 2008). Não o bastante, foi necessário definir as vias, funções biológicas e moleculares que esses

genes hubs participavam, bem como relaciona-las com processos envolvidos na patologia da varicocele e na manutenção da fertilidade masculina. Só através de todo esse processo, somado a busca dos 10 principais genes *up regulated* e *down regulated*, conseguimos cair de 494 genes, para 4 principais genes diferencialmente expressos de maior importância para o estudo da expressão gênica por RTq-PCR em homens com varicocele.

O gene *HDAC2*, selecionado como alvo e validado por RT-qPCR, pertence à família das histonas deacetilases, que atuam formando grandes complexos multiproteicos, tendo como função a deacetilação de resíduos de lisina nas regiões N-terminais das histonas nucleares H2A, H2B, H3 e H4. Também é responsável por formar complexos repressores transcricionais por associação com uma gama de outras proteínas, incluindo a YY1, que é um fator de transcrição de *zinc finger* em mamíferos (CHOUDHARY *et al.*, 2009). Desse modo, desempenha um papel importante na regulação transcricional, na progressão do ciclo celular e nos eventos de desenvolvimento (ZUO *et al.*, 2018). Não obstante, nossos resultados mostraram uma diminuição na expressão do gene *HDAC2*, podendo assim, implicar em alterações na regulação da transcrição de genes importantes para a espermatogênese, bem como influenciar no ciclo celular das células em formação e diferenciação. Esses dados sugerem que poderiam ocorrer falhas na espermatogênese, conduzindo assim a uma diminuição da concentração dos espermatozoides, bem como na vitalidade e no aumento de espermatozoides com morfologia anormal, evidenciados através dos resultados do espermograma. Em consonância com a literatura, o gene *HDAC2* é de extrema importância para a auto-renovação e manutenção de células tronco espermatogoniais (KOFMAN; HUSZAR; PAYNE, 2013) e uma diminuição da expressão do gene implicaria na ativação da via p53 / p21 (LI *et al.*, 2011). A inibição da expressão do gene *HDAC2*, mostrou uma alteração drástica durante a diferenciação das células germinativas primordiais (ZUO *et al.*, 2018). Entretanto, mais estudos são necessários para explicar a relação do gene, com a regulação da p53 na fase pré-meiótica bem como no processo de falha na espermatogênese. Por fim, nossos resultados mostraram que o gene *HDAC2* estava menos expresso não somente nos resultados prévios do sequenciamento de RNA ($\log_2\text{FoldChange}=-1.9319$), mas na análise por RTq-PCR também (QR= 0,542).

As redes de interação gênica nos fornecem uma série de informações sobre as conexões estabelecidas entre os genes. Assim, verificamos que o gene *HDAC2*, apresentou uma conexão com o gene *EHMT2*, o qual também havia sido selecionado como gene *down regulated* alvo. Entretanto, foi necessário fazer uma busca sistemática nas bases de dado de bioinformática, bem como na literatura para identificar processos biológicos e moleculares em comum. Só assim foi possível, correlacionar qual tipo de relação fora estabelecida entre os genes e de que forma eles poderiam se comunicar.

Dessa maneira, diferentes do *HDAC2* que acetila os resíduos de lisina da H3, o gene *EHMT2* (G9a), codifica uma metiltransferase que metila os resíduos de lisina da histona H3. Além disso, aparentemente o gene *EHMT2* (G9a), regula o gene *HDAC2*, pois quando inibido, promove o relaxamento da cromatina através do eixo *HDAC* (NAKAKO *et al.*, 2017). Outra função semelhante entre os dois genes, está na manutenção das células germinativas. Um outro estudo, mas dessa vez utilizando espermatozoides de camundongos, mostrou através de seus resultados que uma deleção na linhagem germinativa do gene G9a conduz a uma perda da H3K9me1 durante a prófase meiótica, resultando em uma diminuição acentuada de células germinativas (LI *et al.*, 2016). Ambos os genes, mesmo possuindo mecanismos diferentes, compartilham funções biológicas e moleculares bem semelhantes, tendo como foco as células de linhagem germinativas. Essa correlação entre os genes *EHMT2* e *HDAC2* é inédita, de modo que os resultados do presente estudo foram fundamentais para o entendimento desse processo. Além disso, como visto nos resultados, é possível que a diminuição da expressão de ambos os genes seja ocasionada pelas alterações no microambiente testicular. Essas alterações impactariam diretamente nos mecanismos epigenéticos e genéticos de regulação da expressão dos genes *EHMT2* e *HDAC2*. Como resultado, é possível associar as perdas nas linhas germinativas, com as falhas na espermatogênese encontradas nos homens com varicocele. Novos trabalhos com o auxílio de nossos resultados, podem oferecer uma maior compreensão da relação de ambos os genes com a manutenção das células de linhagem germinativa no processo da espermatogênese. Dessa forma, correlacionar os efeitos de uma possível alteração do perfil de expressão desses genes, com a diminuição da fertilidade dos indivíduos com varicocele.

Os resultados do sequenciamento de RNA para o gene *PLP2* foram conflitantes com os resultados da expressão gênica por RTq-PCR. O gene aparentemente estava *up regulated* no grupo de estudo, como visualizado nos resultados do sequenciamento. Contudo, os resultados por RT-qPCR mostraram o inverso, de modo que o gene estava *down regulated* no grupo varicocele. As taxas reais de erros do NGS são mínimas, cerca $0,24 \pm 0,06\%$ por base e a porcentagem de sequências mutadas foi de $6,4 \pm 1,24\%$. É possível que o gene tenha apresentado algum erro na leitura de alguma sequência, ao passo que poderia ser corrigido através do uso de programas de correção de sequências. Contudo, seria necessário o reprocessamento dos dados do sequenciamento, o que demandaria o uso de super computadores, bem como de tempo. Assim, dado as circunstâncias atuais impostas pelo COVID-19, não puderam ser realizadas a tempo.

O *PLP2* apresenta duas funções, sendo elas: codificar proteínas multiméricas que funcionam como canais iônicos e regulação do ciclo celular (LONGO; LIBRIZZI; LUPARELLO, 2013; ZIMMERMAN *et al.*, 2012; LEE *et al.*, 2004; ZHU *et al.*, 2015).

Ainda não foram relatados trabalhos que estabelecessem uma ligação entre o gene e sua presença na membrana plasmática de espermatozoides, bem como sua participação no ciclo celular dessas células. Entretanto, se nos atemos aos mecanismos e as vias que o gene *PLP2* participam, podemos estabelecer uma possível relação. Esse gene desempenha um papel importante na regulação positiva da via de sinalização *mTOR* (SONODA *et al.*, 2010). Como sabemos, o gene *mTOR* é expresso em células de Sertoli, Leydig e espermatogônias e tem como função a regulação da proliferação e crescimento celular (OLIVEIRA; CHENG; ALVES, 2017). Já foi visto que o aumento da expressão de *mTOR* está ligado à diminuição da concentração e motilidade dos espermatozoides, e aumento da FDE em indivíduos com varicocele (MAHRAN *et al.*, 2019). Desse modo, como observado nos resultados a diminuição na expressão de *PLP2* pode implicar em alterações na regulação positiva da via *mTOR*, ocasionando assim, um aumento na expressão de *mTOR* em indivíduos com varicocele. Não obstante, à diminuição da concentração e motilidade dos espermatozoides, reflexo do aumento da expressão do gene, também se correlacionam com os nossos achados seminais encontrados no espermograma de indivíduos com varicocele. Esses achados, trazem novas perguntas para o gene *PLP2*, as quais podem melhorar a compreensão do gene, bem como de sua relação com a regulação da via *mTOR*, que é de suma importância para o processo da espermatogênese.

Para a seleção dos 4 principais genes diferencialmente em varicocele, adotamos uma série de critérios, como já relatados anteriormente. Nosso objetivo foi filtrar os resultados brutos provenientes do sequenciamento de RNA, a fim de identificar os genes que mais se aproximassem de vias e funções relacionadas a varicocele. Nesse sentido, selecionamos o gene *SPINT3*, top 3 no ranking dos *up regulated* que também apresentava outra particularidade, de ser especificamente expresso no epidídimo. De acordo com a base de dados Gene Antology (GO), o gene apresenta processo biológico ligado a regulação negativa da via de sinalização do receptor do fator de crescimento transformador beta. Além de ter função molecular relacionada a atividade inibidora da endopeptidase do tipo serina (CLAUSS; LILJA; LUNDWALL, 2005). Em um estudo foi feita uma relação de comparação entre os genes *WFDC* no locus do cromossomo 20q13.1 com os genes que expressam os domínios de Kunitz (*SPINTs*) por ter uma função semelhante. Os genes *WFDC* são importantes durante a maturação espermática e na formação de proteínas que participam da coagulação seminal, além de serem altamente expressos no epidídimo (CLAUSS *et al.*, 2011). Não o bastante, foi visto que os genes *SPINT3* e o *SPINT4* são expressos no epidídimo com alta especificidade também, o que sugere um papel na maturação dos espermatozoides (MCCRUDEN *et al.*, 2008; ROBERTSON *et al.*, 2020). O aumento da expressão de *SPINT3* pode ser reflexo do aumento da temperatura escrotal, conduzindo

assim, a um desequilíbrio das proteínas presentes no sêmen. Já foi visto em alguns estudos de proteômica, utilizando como amostra o plasma seminal de homens com varicocele, a expressão diferencial de diversas proteínas associadas com o estresse oxidativo e resposta inflamatória (SELVAM; AGARWAL; BASKARAN, 2019). Esse desequilíbrio pode influenciar no processo de maturação dos espermatozoides dos indivíduos com a doença, implicando assim na formação de espermatozoides com alterações morfológicas. O gene *SPINT3* apresenta múltiplos splicings, sendo necessário averiguar a região comum nas diferentes variantes, tornando difícil a confecção de primers específicos. Além disso, o ciclo de síntese de um primer de mais de 200 bases apresenta baixíssima eficiência, de modo que acreditamos ser um dos fatores limitantes para análise da expressão do gene *SPINT3* por RT-qPCR.

Os genes validados por RT-q PCR, *HDAC2* e *PLP2* apresentaram uma correlação moderada com o aumento dos espermatozoides com morfologia alterada. Entretanto, o mesmo não ocorreu para os demais parâmetros seminais, os quais acreditávamos também que poderiam estar alterados, dado as características funcionais dos genes. Julgamos ser necessário um número amostral maior do grupo varicocele, inclusive entre os diferentes graus da doença. No entanto, a varicocele costuma ser assintomática, reduzindo assim o número de indivíduos portadores da doença que procuram atendimento médico. Outro fator é que grande parte dos indivíduos que buscam atendimento, restringem-se quase que exclusivamente ao grau III da doença. Isso se deve ao fato dos demais graus quase não apresentarem características clínicas que façam esses indivíduos buscarem ajuda médica, dificultando assim, o entendimento da progressão da doença. Dos 25 pacientes com varicocele coletados para o nosso estudo, 68% tinham varicocele grau III e apenas 22% apresentavam os demais graus. Isso impossibilitou que fosse estabelecido uma correlação dos efeitos gerados pela alteração da expressão dos genes, com a piora dos parâmetros seminais encontrados nos diferentes graus da doença. Outra limitação de nosso estudo está associada a dificuldade de se trabalhar com RNAs extraídos de espermatozoides. As concentrações de RNAs obtidas em geral são baixas, o que fez com que um maior volume das amostras fosse utilizado em nossos experimentos, impossibilitando novos ajustes nos primers dos genes *EHMT2* e *SPINT3*, devido ao seu esgotamento. Além disso, das 50 amostras analisadas, 5 (10%) foram perdidas durante os experimentos por não apresentarem material gênico suficientes para amplificação dos genes ou por estarem fragmentadas. Por fim, apresentamos os 4 principais genes diferencialmente expressos em varicocele, sendo os genes *HDAC2* e *PLP2* validados por RT-qPCR, os quais podem ser utilizados como potenciais biomarcadores que auxiliem na investigação da varicocele, bem como oferecer um prognóstico para os indivíduos com a doença.

6 CONCLUSÃO.

Foi evidenciado através das análises de espermograma que homens com varicocele apresentam um aumento de espermatozoides com morfologia anormal. Os diferentes graus da doença não foram correlacionados com uma piora dos parâmetros seminais. Não foram encontradas alterações nas taxas de fragmentação do DNA espermático.

As análises *in silico* mostraram que homens com varicocele apresentam um total de 494 genes diferencialmente expressos, quando comparado a indivíduos férteis sem a doença. Cerca de 81% desses genes são menos expressos e 19% mais expressos em homens com varicocele. Além disso, as análises de interação e co-expressão gênica, associadas ao enriquecimento funcional apontaram os genes *EHMT2*, *HDAC2*, *PLP2* e *SPINT3* como os principais genes diferencialmente expressos no sequenciamento de RNA de indivíduos com varicocele.

Os genes *HDAC2* e *PLP2* foram validados por RT-qPCR e seu perfil de expressão diferencial, em um primeiro momento, apresentou uma correlação moderada com o aumento dos espermatozoides com morfologia alterada.

REFERÊNCIAS

- ABRAHAM, K.A.; BHARGAVA, P.M. Nucleic acid metabolism of mammalian spermatozoa. **Biochem J.**, London, v. 86, n. 2, p. 298-307, 1963.
- AGARWAL, A. *et al.* Role of oxidative stress in pathogenesis of varicocele and infertility. **Urology**, Cleveland, v. 73, n. 3, p. 461-469, Mar. 2009.
- AITKEN, R.J.; IULIIS, G.N. On the possible origins of DNA damage in human spermatozoa. **Mol Hum Reprod.**, Oxford, v. 16, n. 1, p. 3-13, Jan. 2010.
- AOKI, V.W.; LIU, L.; CARRELL, D.T. A novel mechanism of protamine expression deregulation highlighted by abnormal protamine transcript retention in infertile human males with sperm protamine deficiency. **Mol Hum Reprod.**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 41-50, 2006.
- ALLAMANENI, S.S. *et al.* Increased seminal reactive oxygen species levels in patients with varicoceles correlate with varicocele grade but not with testis size. **Fertil Steril**, Birmingham, v. 82, n. 6, p. 1684-6, Dez. 2004.
- AMER, M. K. *et al.* Ropporin gene expression in infertile asthenozoospermic men with varicocele before and after repair. **Urology**, New York, v. 85, n. 4, p. 805-8, Abr. 2015.
- BAAZEEM, A. *et al.* Varicocele and male factor infertility treatment: a new meta-analysis and review of the role of varicocele repair. **European Urology**, [S.l.], v. 60, n. 4, p. 796-808, Out. 2011.
- BENOFF, S. *et al.* Deletions in L-type calcium channel alpha1 subunit testicular transcripts correlate with testicular cadmium and apoptosis in infertile men with varicoceles. **Fertil Steril**, Birmingham, v. 83, n. 3, p. 622-34, Mar. 2005.
- BLUMER, C. G. *et al.* Sperm nuclear DNA fragmentation and mitochondrial activity in men with varicocele. **Fertil Steril**, New York, v. 90, n. 5, p. 1716-22, Nov 2008.
- BROWN, J.S.; DUBIN, L.; HOTCHKISS, R.S. The varicocele as related to fertility. **Fertil Steril**, Birmingham, v. 18, n. 1, p. 46-56, Jan.- Fev. 1967.
- CARRELL, D.T. Epigenetics of the male gamete. **Fertil Steril.**, Birmingham, v. 97, n. 2, p. 267-74, Fev. 2012.
- COSTA, V. *et al.* RNA-Seq and human complex diseases: recent accomplishments and future perspectives. **Eur J Hum Genet.**, South Yorkshire, v. 21, n. 2, p. 134-42, 2013.
- COWLEY, M.; OAKEY, R.J. Transposable elements re-wire and fine-tune the transcriptome. **PLoS Genet.**, San Francisco, v. 9, n. 1, e1003234, 2013.
- CHO, C.L.; ESTEVES, S.C.; AGARWAL, A. Novel insights into the pathophysiology of varicocele and its association with reactive oxygen species and sperm DNA fragmentation. **Asian J Andrologia**, Xangai, v. 18, n. 2, p. 186-93, Mar.- Abr. 2016.
- CHOI, W.S.; KIM, S.W. Current issues in varicocele management: a review. **World J Mens Health**, Seul, v. 31, n. 1, p. 12-20, Abr. 2013.

CHOUDHARY, C *et al.* Lysine acetylation targets protein complexes and co-regulates major cellular functions. **Science**, New York, v. 325, n. 5942, p. 834-40, 2009.

CLAUSS, A. *et al.* Three genes expressing Kunitz domains in the epididymis are related to genes of WFDC-type protease inhibitors and semen coagulum proteins in spite of lacking similarity between their protein products. **BMC Biochem.**, London, v. 11, n.12, p. 55, 2011.

CLAUSS, A.; LILJA, H.; LUNDWALL, A. The evolution of a genetic locus encoding small serine proteinase inhibitors. **Biochem Biophys Res Commun.**, New York, v. 333, n. 2, p. 383-9, 2005.

DIAMOND, D.A. *et al.* Relationship of varicocele grade and testicular hypotrophy to semen parameters in adolescents. **J Urology**, Massachusetts, v. 178, n. 4S, p. 1584-1588, Oct. 2007.

DUBIN, L.; AMELAR, R.D. Varicocelectomy: 986 cases in a twelve-year study. **Urology**, New York, v. 10, n. 5, p. 446-9, Nov. 1977.

ENCISO, M. *et al.* Infertile men with varicocele show a high relative proportion of sperm cells with intense nuclear damage level, evidenced by the sperm chromatin dispersion test. **J Androl.**, Philadelphia, v. 27, n. 1, p. 106-11, Jan.- Feb. 2006.

FEDOROFF, N. How jumping genes were discovered. **Nat Struct Biol**, [S.l.], v. 8, p.300-301, 2001.

FRYE, M. *et al.* RNA modifications modulate gene expression during development. **Science**, [S.l.], v. 28, n. 361, p. 1346-1349, 2018.

GARCIA-HERRERO, S. *et al.* Differential transcriptomic profile in spermatozoa achieving pregnancy or not via ICSI. **Reprod Biomed Online**, Cambridge, v. 22, n. 1, p. 25-36, 2011.

GAROLLA, A. *et al.* Twenty-four-hour monitoring of scrotal temperature in obese men and men with a varicocele as a mirror of spermatogenic function. **Hum Reprod**, [S.l.], v. 30, n. 5, p. 1006-13, Mai. 2015.

GOLDSTEIN M. Surgical management of male infertility. In: WEIN, A.J.(Ed.). **Campbell-Walsh Urology**. Ed. 11. Philadelphia: Saunders, 2012.

GOLDSTEIN, M.; EID, J. F. Elevation of intratesticular and scrotal skin surface temperature in men with varicocele. **J Urol**, [S.l.], v. 142, n. 3, p. 743-5, Set. 1989.

GUR, Y.; BREITBART, H. Mammalian sperm translate nuclear-encoded proteins by mitochondrial-type ribosomes. **Genes Dev.**, New York, v. 20, n. 4, p. 411-6, 2006.

HAMADA, A.; ESTEVES, S.C.; AGARWAL, A. Insight into oxidative stress in varicocele-associated male infertility: part 2. **Nat Rev Urol.**, Londres, v. 10, n. 1, p. 26-37, Jan. 2013.

HARADA, Y. *et al.* Direct observation of DNA rotation during transcription by Escherichia coli RNA polymerase. **Nature**, [S.l.], v. 409, n. 6816, p. 113-5, 2001.

HENDIN, B.N. *et al.* Varicocele is associated with elevated spermatozoal reactive oxygen species production and diminished seminal plasma antioxidant capacity. **The Journal of Urology**, [S.l.], v. 161, n. 6, p. 1831-1834, Jun. 1999.

HORVATH S.; DONG, J. Geometric interpretation of gene coexpression network analysis. **PLoS Comput Biol.**, San Francisco, v. 4, n. 8, e1000117, 2008.

INCI, K.; GUNAY, L.M. The role of varicocele treatment in the management of non-obstructive azoospermia. **Clinics**, São Paulo, v. 68, supl. 1, p. 89-98, 2013.

JODAR *et al.* The presence, role and clinical use of spermatozoal RNAs. **Hum Reprod Update**, Oxford, v. 19, n. 6, p. 604-24, 2013 Nov-Dec 2013.

JODAR, M. *et al.* Differential RNAs in the sperm cells of asthenozoospermic patients. **Hum Reprod**, Oxford, v.27, n. 5, p.1431-1438, 2012.

KADIOGLU, T.C.; ALIYEV, E.; CELTIK, M. Microscopic varicocelectomy significantly decreases the sperm DNA fragmentation index in patients with infertility. **Biomed Res Int.**, New York, n. 695713, 2014.

KOFMAN, A.E.; HUSZAR, J.M.; PAYNE, C.J. Transcriptional analysis of histone deacetylase family members reveal similarities between differentiating and aging spermatogonial stem cells. **Stem Cell Rev Rep.**, New York, v. 9, n. 1, p. 59-64, Fev. 2013.

KRAWETZ, S.A. *et al.* A survey of small RNAs in human sperm. **Hum Reprod.**, Oxford, v. 26, n. 12, p. 3401-12, 2011.

KRZYŚCIAK, W.; KÓZKA, M. Generation of reactive oxygen species by a sufficient, insufficient and varicose vein wall. **Acta Biochim Pol.**, Warszawa, v. 58, n. 1, p. 89-94, 2011.

LEE, S.M. *et al.* PLP2/A4 interacts with CCR1 and stimulates migration of CCR1-expressing HOS cells. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S.l.], v.324, n. 2, p. 768-772, 2004.

LIBMAN, J. *et al.* Beneficial effect of microsurgical varicocelectomy is superior for men with bilateral versus unilateral repair. **J Urol**, [S.l.] v. 176, n. 6, p. 2602-5, Dez. 2006.

LIMA, S.B. *et al.* Expression of the HSPA2 gene in ejaculated spermatozoa from adolescents with and without varicocele. **Fertil Steril**, New York, v. 86, n. 6, p. 1659-63, Dez. 2006.

LI, M. *et al.* G9a-mediated histone methylation regulates cadmium-induced male fertility damage in pubertal mice. **Toxicology Letters**, v. 252, v. 11, p. 11-21, 2016

LI, W. *et al.* Transient protection from heat-stress induced apoptotic stimulation by metastasis-associated protein 1 in pachytene spermatocytes. **PLoS One.**, San Francisco, v. 6, n. 10, e26013, 2011.

LONGO, A.; LIBRIZZI, M.; LUPARELLO, C. Effect of transfection with PLP2 antisense oligonucleotides on gene expression of cadmium-treated MDA-MB231 breast cancer cells. **Anal Bioanal Chem.**, [S.l.], v. 405, n. 6, p. 1893-901, 2013.

MACLAUGHLIN, J.; TERNER, C. Ribonucleic acid synthesis by spermatozoa from the rat and hamster. **Biochem J.**, [S.l.], v. 133, n. 4, p. 635-9, 1973.

MCCRUDDEN, M.T., *et al.* : Functional domains of the human epididymal protease inhibitor, eppin. **The FEBS Journal**, [S.l.], v. 275, n. 8, p. 1742-1750, 2008.

- MAHRAN, A.M. *et al.* The correlation between mammalian target of rapamycin (mTOR) gene expression and sperm DNA damage among infertile patients with and without varicocele. **Andrologia**, [S.l.], v. 51, n. 9, e13341, Out. 2019.
- MARDIS, E.R. The impact of next-generation sequencing technology on genetics. **Trends Genet.**, Cambridge, v. 24, n. 3, p. 133-41, 2008.
- MASSON, P.; BRANNIGAN, R.E. The varicocele. **Urol Clin North Am**, Philadelphia, v. 41, n. 1, p. 129-44, Fev. 2014.
- MILLER, D.; OSTERMEIER, G.C. Spermatozoal RNA: Why is it there and what does it do? **Gynecol Obstet Fertil.**, Paris, v. 34, n. 9, p. 840-6, 2006.
- MILLER, D. RNA in the ejaculate spermatozoon: a window into molecular events in spermatogenesis and a record of the unusual requirements of haploid gene expression and post-meiotic equilibration. **Mol Hum Reprod.**, Oxford, v. 3, n. 8, p. 669-76, 1997.
- NAFTULIN, B.N. *et al.* Semen quality in varicocele patients is characterized by tapered sperm cells. **Fertil Steril.**, New York, v. 56, n. 1, p. 149-51, 1991.
- NAUGHTON, C. K.; NANGIA, A. K.; AGARWAL, A. Pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum Reprod Update*, v. 7, n. 5, p. 473-81.
- OLESZCZUK, K.; GIWERCMAN, A.; BUNGUM, M. Sperm chromatin structure assay in prediction of in vitro fertilization outcome. **Andrology**, [S. l.] v. 4, p. 290–296, 2016.
- OLIVEIRA, P.F.; CHENG, C.Y.; ALVES, M.G. Emerging Role for Mammalian Target of Rapamycin in Male Fertility. **Trends Endocrinol Metab.**, New York, v. 28, n. 3, p. 165-167, 2017.
- OSTERMEIER, G.C. *et al.* Reproductive biology: delivering spermatozoan RNA to the oocyte. **Nature**, London, v.429, n. 6988, p. 154, 2004.
- PAICK, S.; CHOI, W. S. Varicocele and Testicular Pain: A Review. **World J Mens Health**, [S.l.] v. 37, n. 1, p. 4-11, Jan 2019.
- PELUSO, G. *et al.* The study of spermatic DNA fragmentation and sperm motility in infertile subjects. **Arch Ital Urol Androl.**, Milano, v. 85, n. 1, p. 8-13, Abr. 2013.
- PLATTS A.E. *et al.* Success and failure in human spermatogenesis as revealed by teratozoospermic RNAs. **Hum Mol Genet.**, Oxford, v. 16, n. 7, p. 763-73, Abr. 2007.
- PORTIN, P. The birth and development of the DNA theory of inheritance: sixty years since the discovery of the structure of DNA. **J Genet.**, London, v. 93, n. 1, p. 293-302, 2014.
- ROBERTSON, M. *et al.* Large-scale discovery of male reproductive tract-specific genes through analysis of RNA-seq datasets. **BMC Biology**, [S.l.], v. 18, n. 103, (2020)
- ROMEO, C.; SANTORO, G. Free radicals in adolescent varicocele testis. **Oxid Med Cell Longev.** New York, a. 2014:912878, 2014.
- ROUNDTREE, I.A. *et al.* Dynamic RNA Modifications in Gene Expression Regulation. **Cell.**, Cambridge, v. 169, n. 7, p. 1187-1200, Jun. 2017.

- SAKKAS D, ALVAREZ J.G. Sperm DNA fragmentation: mechanisms of origin, impact on reproductive outcome, and analysis. **Fertil Steril.**, New York, v. 93, n. 4, p. 1027-36, Mar. 2010.
- SALEH, R.A.; AGARWAL, A. Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. **J Androl.**, Philadelphia, v. 23, n. 6, p. 737-52, Nov-Dez. 2002.
- SANTANA, V.P. *et al.* Differential DNA methylation pattern and sperm quality in men with varicocele. **Fertil Steril.**, New York, v. 114, n. 4, p. 770-778, 2020.
- SANTANA, V.P. *et al.* Genetics and epigenetics of varicocele pathophysiology: an overview. **J Assist Reprod Genet.**, New York, v. 34, n. 7, p. 839-847, Jul. 2017.
- SANTORO, M.G. Heat shock factors and the control of the stress response. **Biochem Pharmacol.**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 55-63, Jan. 2000.
- SELVAM, M.K.P.; AGARWAL, A.; BASKARAN, S. Proteomic analysis of seminal plasma from bilateral varicocele patients indicates an oxidative state and increased inflammatory response. **Asian J Androl.** [S.l.], v. 21, n. 6, p. 544-550, 2019.
- SIMERLY, C. *et al.* The paternal inheritance of the centrosome, the cell's microtubule-organizing center, in humans, and the implications for infertility. **Nat Med**, New York v.1, n. 1, p.47-52, 1995.
- SCHLEGEL, P.N.; GOLDSTEIN, M. Alternate indications for varicocele repair: non-obstructive azoospermia, pain, androgen deficiency and progressive testicular dysfunction. **Fertil Steril.**, New York, v. 96, n. 6, p. 1288-93, Dez. 2011.
- SHARP, P.A. The centrality of RNA. **Cell.**, Cambridge, v. 136, n. 4, p. 577-80, Fev. 2009.
- SHEN, H. M. *et al.* Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. **Hum Reprod.**, Washington, v. 17, n. 5, p. 1266-73, Mai. 2002.
- SHENDURE, J. The beginning of the end for microarrays? **Nat Methods**, [S.l.], v. 5, n. 7, p. 585-7, 2008.
- SHI, Y.; MOSSER, D.D.; MORIMOTO, R.I. Molecular chaperones as HSF1-specific transcriptional repressors. **Genes Dev.**, New York, v. 12, n. 5, p. 654-66, Mar. 1998.
- SMITH, R. *et al.* Increased sperm DNA damage in patients with varicocele: relationship with seminal oxidative stress. **Hum Reprod**,[S.l.], v. 21, n. 4, p. 986-93, Apr 2006.
- SIGMAN, M.; JAROW, J.P. Ipsilateral testicular hypotrophy is associated with decreased sperm counts in infertile men with varicoceles. **J Urol.**, Baltimore, v. 158, n. 2, p. 605-7, Ago. 1997.
- SONODA, Y. *et al.* Proteolipid protein 2 is associated with melanoma metastasis. **Oncol Rep.**, Athens, v. 23, n. 2, p. 371-6, 2010.
- TRAVERS, A.; MUSKHELISHVILI, G. DNA structure and function. **FEBS J.**, Oxford, v. 282, n. 12, p. 2279-95, Jun. 2015.

TULLOCH W.S. Varicocele in subfertility; results of treatment. **Br Med J.**, London, v. 6, n. 2, p. 356-8, Ago. 1955.

TUNC, O.; TREMELLEN, K. Oxidative DNA damage impairs global sperm DNA methylation in infertile men. **J Assist Reprod Genet**, [S.l.], v. 26, n. 9-10, p. 537-44, 2009.

URIU, K. Genetic oscillators in development. **Dev Growth Differ**, [S.l.], v. 58, n. 1, p. 16-30, 2016.

VEIGL, S.J.; HARMAN, O.; LAMM, E. Friedrich Miescher's Discovery in the Historiography of Genetics: From Contamination to Confusion, from Nuclein to DNA. **J Hist Biol.**, [S.l.], v. 53, n. 3, p. 451-484, Set. 2020.

WATSON, J.D.; CRICK, F.H. Molecular structure of nucleic acids; a structure for deoxyribose nucleic acid. **Nature**, [S.l.], v. 171, n. 4356, p. 737-8, 1953.

WEIDNER, W.; PILATZ, A.; ALTINKILIC, B. [Andrology: varicocele: an update]. **Urologe A**, [S.l.], v. 49, Suppl 1, p. 163-5, 2010.

WIREDJA, D.; BEBEK, G. Identifying Gene Interaction Networks. **Methods Mol Biol.**, [S.l.], v. 1666, p. 539-556, 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Examination and processing of human semen, 2010.

WYKES, S.M.; VISSCHER, D.W.; KRAWETZ, S.A. Haploid transcripts persist in mature human spermatozoa. **Mol Hum Reprod.**, Oxford, v. 3, n. 1, p. 15-9, 1997.

XUE, J. *et al.* Abnormalities of the testes and semen parameters in clinical varicocele. **Journal of Southern Medical University Nanfang yike daxue xuebao**, Guangzhou, v. 32, n. 4, p. 439-42, Abr. 2012.

YANG, Y.F. *et al.* Genetic Interaction Network as an Important Determinant of Gene Order in Genome Evolution. **Mol Biol Evol.**, [S.l.], v. 34, n. 12, p. 3254-3266, 2017.

YANG, H. In commemoration of completion of the genetic code, and in memory of Prof. Brian Clark. **N Biotechnol.**, [S.l.], n. 38, p. 5-6, 2016.

ZALATA, A. A. *et al.* Androgen receptor expression relationship with semen variables in infertile men with varicocele. **The Journal of Urology**, [S.l.], v.189, n. 6, p. 2243-2247, Jun. 2013.

ZIMMERMAN, J.W. *et al.* Cancer cell proliferation is inhibited by specific modulation frequencies. **Br J Cancer**, [S.l.], v. 106, n. 2, p. 307-13, 2013.

ZHU, H. *et al.* MiR-664 negatively regulates PLP2 and promotes cell proliferation and invasion in T-cell acute lymphoblastic leukaemia. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, [S.l.], v. 459, n. 2, p. 340-345, 2015.

ZUO, Q. *et al.* NICD - mediated notch transduction regulates the different fate of chicken primordial Germ cells and spermatogonial stem cells. **Cell & Bioscience**, [S.l.], v. 8, n. 40, 2018.

APÊNDICE

RESULTADO DOS 494 GENES DIFERENCIALMENTE EXPRESSOS EM VARICOCELE.

gene	gene_type	gene_name
ENSG0000002016	protein_coding	RAD52
ENSG0000005206	protein_coding	SPPL2B
ENSG0000006047	protein_coding	YBX2
ENSG0000007038	protein_coding	PRSS21
ENSG0000007866	protein_coding	TEAD3
ENSG0000008226	protein_coding	DLEC1
ENSG0000008394	protein_coding	MGST1
ENSG0000010404	protein_coding	IDS
ENSG0000010803	protein_coding	SCMH1
ENSG0000011243	protein_coding	AKAP8L
ENSG0000011590	protein_coding	ZBTB32
ENSG0000032444	protein_coding	PNPLA6
ENSG0000033170	protein_coding	FUT8
ENSG0000035499	protein_coding	DEPDC1B
ENSG0000048462	protein_coding	TNFRSF17
ENSG0000049323	protein_coding	LTBP1
ENSG0000051180	protein_coding	RAD51
ENSG0000055147	protein_coding	FAM114A2
ENSG0000064115	protein_coding	TM7SF3
ENSG0000065413	protein_coding	ANKRD44
ENSG0000067798	protein_coding	NAV3
ENSG0000070814	protein_coding	TCOF1
ENSG0000071909	protein_coding	MYO3B
ENSG0000075702	protein_coding	WDR62
ENSG0000075711	protein_coding	DLG1
ENSG0000076770	protein_coding	MBNL3
ENSG0000077327	protein_coding	SPAG6
ENSG0000077454	protein_coding	LRCH4
ENSG0000080298	protein_coding	RFX3
ENSG0000087206	protein_coding	UIMC1
ENSG0000089123	protein_coding	TASP1
ENSG0000090534	protein_coding	THPO
ENSG0000095397	protein_coding	DFNB31
ENSG0000099622	protein_coding	CIRBP
ENSG0000099840	protein_coding	IZUMO4
ENSG0000099953	protein_coding	MMP11
ENSG0000100027	protein_coding	YPEL1
ENSG0000100097	protein_coding	LGALS1
ENSG0000100147	protein_coding	CCDC134
ENSG0000100154	protein_coding	TTC28
ENSG0000100299	protein_coding	ARSA

ENSG00000100359 protein_coding SGSM3

ENSG00000100629	protein_coding	C14orf145
ENSG00000101057	protein_coding	MYBL2
ENSG00000101203	protein_coding	COL20A1
ENSG00000101446	protein_coding	SPINT3
ENSG00000102007	protein_coding	PLP2
ENSG00000102901	protein_coding	CENPT
ENSG00000102924	protein_coding	CBLN1
ENSG00000102981	protein_coding	PARD6A
ENSG00000103222	protein_coding	ABCC1
ENSG00000103254	protein_coding	FAM173A
ENSG00000104044	protein_coding	OCA2
ENSG00000104231	protein_coding	ZFAND1
ENSG00000104731	protein_coding	KLHDC4
ENSG00000104936	protein_coding	DMPK
ENSG00000105088	protein_coding	OLFM2
ENSG00000105409	protein_coding	ATP1A3
ENSG00000105428	protein_coding	ZNRF4
ENSG00000105717	protein_coding	PBX4
ENSG00000105732	protein_coding	ZNF574
ENSG00000105829	protein_coding	BET1
ENSG00000106459	protein_coding	NRF1
ENSG00000106541	protein_coding	AGR2
ENSG00000107864	protein_coding	CPEB3
ENSG00000108474	protein_coding	PIGL
ENSG00000109475	protein_coding	RPL34
ENSG00000109610	protein_coding	SOD3
ENSG00000109680	protein_coding	TBC1D19
ENSG00000109685	protein_coding	NSD2
ENSG00000109736	protein_coding	MFSD10
ENSG00000110002	protein_coding	VWA5A
ENSG00000110031	protein_coding	LPXN
ENSG00000110497	protein_coding	AMBRA1
ENSG00000110693	protein_coding	SOX6
ENSG00000110880	protein_coding	CORO1C
ENSG00000111783	protein_coding	RFX4
ENSG00000111906	protein_coding	HDDC2
ENSG00000112877	protein_coding	CEP72
ENSG00000113319	protein_coding	RASGRF2
ENSG00000115255	protein_coding	REEP6
ENSG00000115257	protein_coding	PCSK4
ENSG00000115364	protein_coding	MRPL19
ENSG00000115425	protein_coding	PECR
ENSG00000115998	protein_coding	C2orf42

ENSG00000116213	protein_coding	WRAP73	
ENSG00000116251	protein_coding	RPL22	
ENSG00000116497	protein_coding	S100PBP	
ENSG00000116670	protein_coding	MAD2L2	
ENSG00000116685	protein_coding	KIAA2013	
ENSG00000116991	protein_coding	SIPA1L2	
ENSG00000117616	protein_coding	RSRP1	
ENSG00000119392	protein_coding	GLE1	
ENSG00000119431	protein_coding	HDHD3	
ENSG00000119650	protein_coding	C14orf179	
ENSG00000119703	protein_coding	ZC2HC1C	
ENSG00000120509	protein_coding	PDZD11	
ENSG00000120533	protein_coding	ENY2	
ENSG00000121413	protein_coding	ZSCAN18	
ENSG00000121716	protein_coding	PILRB	
ENSG00000122033	protein_coding	MTIF3	
ENSG00000124155	protein_coding	PIGT	
ENSG00000124194	protein_coding	GDAP1L1	
ENSG00000125450	protein_coding	NUP85	
ENSG00000125652	protein_coding	ALKBH7	
ENSG00000125912	protein_coding	NCLN	
ENSG00000126216	protein_coding	TUBGCP3	
ENSG00000127220	protein_coding	ABHD8	
ENSG00000128266	protein_coding	GNAZ	
ENSG00000128322	protein_coding	IGLL1	
ENSG00000130449	protein_coding	ZSWIM6	
ENSG00000130590	protein_coding	SAMD10	
ENSG00000130695	protein_coding	CEP85	
ENSG00000131174	protein_coding	COX7B	
ENSG00000131591	protein_coding	C1orf159	
ENSG00000131697	protein_coding	NPHP4	
ENSG00000132170	protein_coding	PPARG	
ENSG00000132357	protein_coding	CARD6	
ENSG00000132958	protein_coding	TPTE2	
ENSG00000133027	protein_coding	PEMT	
ENSG00000133134	protein_coding	BEX2	
ENSG00000133519	transcribed_unprocessed_pseudogene		ZDHHC8P
ENSG00000134056	protein_coding	MRPS36	
ENSG00000134376	protein_coding	CRB1	
ENSG00000135390	protein_coding	ATP5G2	
ENSG00000136011	protein_coding	STAB2	
ENSG00000136856	protein_coding	SLC2A8	
ENSG00000137161	protein_coding	CNPY3	

ENSG00000137266	protein_coding	SLC22A23
ENSG00000137804	protein_coding	NUSAP1
ENSG00000137825	protein_coding	ITPKA
ENSG00000138068	protein_coding	SULT6B1
ENSG00000138606	protein_coding	SHF
ENSG00000139160	protein_coding	C12orf72
ENSG00000140009	protein_coding	ESR2
ENSG00000140297	protein_coding	GCNT3
ENSG00000140675	protein_coding	SLC5A2
ENSG00000140961	protein_coding	OSGIN1
ENSG00000141076	protein_coding	UTP4
ENSG00000141519	protein_coding	CCDC40
ENSG00000141696	protein_coding	P3H4
ENSG00000141994	protein_coding	DUS3L
ENSG00000142528	protein_coding	ZNF473
ENSG00000142634	protein_coding	EFHD2
ENSG00000143476	protein_coding	DTL
ENSG00000143768	protein_coding	LEFTY2
ENSG00000143919	protein_coding	CAMKMT
ENSG00000144214	protein_coding	LYG1
ENSG00000144354	protein_coding	CDCA7
ENSG00000144455	protein_coding	SUMF1
ENSG00000144485	protein_coding	HES6
ENSG00000144589	protein_coding	STK11IP
ENSG00000145088	protein_coding	EAF2
ENSG00000146070	protein_coding	PLA2G7
ENSG00000146215	protein_coding	CRIP3
ENSG00000146411	protein_coding	SLC2A12
ENSG00000146433	protein_coding	TMEM181
ENSG00000146587	protein_coding	RBAK
ENSG00000146670	protein_coding	CDCA5
ENSG00000146707	protein_coding	POMZP3
ENSG00000146842	protein_coding	TMEM209
ENSG00000147481	protein_coding	SNTG1
ENSG00000149179	protein_coding	C11orf49
ENSG00000149599	protein_coding	DUSP15
ENSG00000150403	protein_coding	TMCO3
ENSG00000150540	protein_coding	HNMT
ENSG00000150967	protein_coding	ABCB9
ENSG00000152944	protein_coding	MED21
ENSG00000153443	protein_coding	UBALD1
ENSG00000154710	protein_coding	RABGEF1
ENSG00000156026	protein_coding	MCU

ENSG00000156042	protein_coding	CFAP70	
ENSG00000156299	protein_coding	TIAM1	
ENSG00000156970	protein_coding	BUB1B	
ENSG00000156990	protein_coding	RPUSD3	
ENSG00000157703	protein_coding	SVOPL	
ENSG00000157782	protein_coding	CABP1	
ENSG00000157851	protein_coding	DPYSL5	
ENSG00000158402	protein_coding	CDC25C	
ENSG00000158486	protein_coding	DNAH3	
ENSG00000158526	protein_coding	TSR2	
ENSG00000158555	protein_coding	GDPD5	
ENSG00000158683	protein_coding	PKD1L1	
ENSG00000158966	protein_coding	CACHD1	
ENSG00000159374	protein_coding	M1AP	
ENSG00000159708	protein_coding	LRRC36	
ENSG00000159788	protein_coding	RGS12	
ENSG00000160055	protein_coding	TMEM234	
ENSG00000160298	protein_coding	C21orf58	
ENSG00000160392	protein_coding	C19orf47	
ENSG00000161103	transcribed_processed_pseudogene	AC008132.13	
ENSG00000161798	protein_coding	AQP5	
ENSG00000162670	protein_coding	BRINP3	
ENSG00000162782	protein_coding	TDRD5	
ENSG00000162885	protein_coding	B3GALNT2	
ENSG00000162889	protein_coding	MAPKAPK2	
ENSG00000163374	protein_coding	YY1AP1	
ENSG00000163491	protein_coding	NEK10	
ENSG00000163884	protein_coding	KLF15	
ENSG00000164287	protein_coding	CDC20B	
ENSG00000164346	protein_coding	NSA2	
ENSG00000164669	transcribed_unprocessed_pseudogene		INTS4P1
ENSG00000164708	protein_coding	PGAM2	
ENSG00000164713	protein_coding	BRI3	
ENSG00000164855	protein_coding	TMEM184A	
ENSG00000165071	protein_coding	TMEM71	
ENSG00000165389	protein_coding	SPTSSA	
ENSG00000165555	protein_coding	NOXRED1	
ENSG00000166068	protein_coding	SPRED1	
ENSG00000166359	protein_coding	WDR88	
ENSG00000166435	protein_coding	XRRA1	
ENSG00000166596	protein_coding	CFAP52	
ENSG00000166866	protein_coding	MYO1A	
ENSG00000166886	protein_coding	NAB2	

ENSG00000166965	protein_coding	RCCD1
ENSG00000167114	protein_coding	SLC27A4
ENSG00000167543	protein_coding	TP53I13
ENSG00000167595	protein_coding	PROSER3
ENSG00000167749	protein_coding	KLK4
ENSG00000167925	protein_coding	GHDC
ENSG00000167930	protein_coding	FAM234A
ENSG00000167962	protein_coding	ZNF598
ENSG00000168060	protein_coding	NAALADL1
ENSG00000168298	protein_coding	HIST1H1E
ENSG00000168397	protein_coding	ATG4B
ENSG00000168676	protein_coding	KCTD19
ENSG00000168916	protein_coding	ZNF608
ENSG00000169131	protein_coding	ZNF354A
ENSG00000169221	protein_coding	TBC1D10B
ENSG00000169241	protein_coding	SLC50A1
ENSG00000169255	protein_coding	B3GALNT1
ENSG00000169635	protein_coding	HIC2
ENSG00000169718	protein_coding	DUS1L
ENSG00000169902	protein_coding	TPST1
ENSG00000170085	protein_coding	SIMC1
ENSG00000170456	protein_coding	DENND5B
ENSG00000171033	protein_coding	PKIA
ENSG00000171246	protein_coding	NPTX1
ENSG00000171823	protein_coding	FBXL14
ENSG00000171962	protein_coding	DRC3
ENSG00000172366	protein_coding	FAM195A
ENSG00000172530	protein_coding	BANP
ENSG00000172738	protein_coding	TMEM217
ENSG00000172818	protein_coding	OVOL1
ENSG00000173077	protein_coding	DEC1
ENSG00000173218	protein_coding	VANGL1
ENSG00000173264	protein_coding	GPR137
ENSG00000173421	protein_coding	CCDC36
ENSG00000173715	protein_coding	C11orf80
ENSG00000173915	protein_coding	USMG5
ENSG00000174080	protein_coding	CTSF
ENSG00000174276	protein_coding	ZNHIT2
ENSG00000174501	protein_coding	ANKRD36C
ENSG00000174628	protein_coding	IQCK
ENSG00000174898	protein_coding	CATSPERD
ENSG00000174915	protein_coding	PTDSS2
ENSG00000175267	protein_coding	VWA3A

ENSG00000175573	protein_coding	C11orf68	
ENSG00000175727	protein_coding	MLXIP	
ENSG00000175756	protein_coding	AURKAIP1	
ENSG00000175773	lincRNA	RP11-121M22.1	
ENSG00000176177	protein_coding	ENTHD1	
ENSG00000176248	protein_coding	ANAPC2	
ENSG00000176563	protein_coding	CNTD1	
ENSG00000176978	protein_coding	DPP7	
ENSG00000177133	antisense	RP1-163G9.1	
ENSG00000178467	protein_coding	P4HTM	
ENSG00000178814	protein_coding	OPLAH	
ENSG00000179058	protein_coding	C9orf50	
ENSG00000179526	protein_coding	SHARPIN	
ENSG00000179532	protein_coding	DNHD1	
ENSG00000180198	protein_coding	RCC1	
ENSG00000180884	protein_coding	ZNF792	
ENSG00000181143	protein_coding	MUC16	
ENSG00000181315	protein_coding	ZNF322	
ENSG00000181396	protein_coding	C17orf101	
ENSG00000181513	protein_coding	ACBD4	
ENSG00000181588	protein_coding	MEX3D	
ENSG00000181649	protein_coding	PHLDA2	
ENSG00000182195	protein_coding	LDOC1	
ENSG00000182287	protein_coding	AP1S2	
ENSG00000182979	protein_coding	MTA1	
ENSG00000182985	protein_coding	CADM1	
ENSG00000183048	protein_coding	SLC25A10	
ENSG00000183260	protein_coding	ABHD16B	
ENSG00000183317	protein_coding	EPHA10	
ENSG00000183337	protein_coding	BCOR	
ENSG00000183439	protein_coding	TRIM61	
ENSG00000183570	protein_coding	PCBP3	
ENSG00000183576	protein_coding	SETD3	
ENSG00000183578	protein_coding	TNFAIP8L3	
ENSG00000183666	transcribed_unprocessed_pseudogene		RP11-823P9.1
ENSG00000184144	protein_coding	CNTN2	
ENSG00000184481	protein_coding	FOXO4	
ENSG00000184792	protein_coding	OSBP2	
ENSG00000184867	protein_coding	ARMCX2	
ENSG00000184898	protein_coding	RBM43	
ENSG00000185088	protein_coding	RPS27L	
ENSG00000185338	protein_coding	SOCS1	
ENSG00000185361	protein_coding	TNFAIP8L1	

ENSG00000185813	protein_coding	PCYT2	
ENSG00000185883	protein_coding	ATP6V0C	
ENSG00000185946	protein_coding	RNPC3	
ENSG00000186479	protein_coding	RGS7BP	
ENSG00000187094	protein_coding	CCK	
ENSG00000187189	protein_coding	TSPYL4	
ENSG00000187325	protein_coding	TAF9B	
ENSG00000187741	protein_coding	FANCA	
ENSG00000187953	transcribed_unprocessed_pseudogene		PMS2CL
ENSG00000187954	protein_coding	CYHR1	
ENSG00000188163	protein_coding	FAM166A	
ENSG00000188171	protein_coding	ZNF626	
ENSG00000188352	protein_coding	FOCAD	
ENSG00000188807	protein_coding	TMEM201	
ENSG00000188959	protein_coding	C9orf152	
ENSG00000189045	protein_coding	ANKDD1B	
ENSG00000189283	protein_coding	FHIT	
ENSG00000189423	transcribed_unprocessed_pseudogene		USP32P3
ENSG00000196072	protein_coding	BLOC1S2	
ENSG00000196236	protein_coding	XPNPEP3	
ENSG00000196368	protein_coding	NUDT11	
ENSG00000196511	protein_coding	TPK1	
ENSG00000196547	protein_coding	MAN2A2	
ENSG00000196557	protein_coding	CACNA1H	
ENSG00000196591	protein_coding	HDAC2	
ENSG00000196954	protein_coding	CASP4	
ENSG00000197181	protein_coding	PIWIL2	
ENSG00000197549	transcribed_unprocessed_pseudogene		PRAMEL
ENSG00000197586	protein_coding	ENTPD6	
ENSG00000197826	protein_coding	C4orf22	
ENSG00000198000	protein_coding	NOL8	
ENSG00000198042	protein_coding	MAK16	
ENSG00000198218	protein_coding	QRICH1	
ENSG00000198454	lincRNA	RP11-229P13.5	
ENSG00000198455	protein_coding	ZXDB	
ENSG00000198624	protein_coding	CCDC69	
ENSG00000198633	protein_coding	ZNF534	
ENSG00000198931	protein_coding	APRT	
ENSG00000198939	protein_coding	ZFP2	
ENSG00000203666	protein_coding	EFCAB2	
ENSG00000203690	protein_coding	TCP10	
ENSG00000203729	lincRNA	C1orf120	
ENSG00000204152	protein_coding	TIMM23B	

ENSG00000204177	transcribed_unprocessed_pseudogene		BMS1P1
ENSG00000204371	protein_coding	EHMT2	
ENSG00000204444	protein_coding	APOM	ENSG00000204556
	unprocessed_pseudogene	CTD-2514C3.1	
ENSG00000204616	protein_coding	TRIM31	ENSG00000204764
	protein_coding	RANBP17	ENSG00000204839
	protein_coding	MROH6	ENSG00000204962
	protein_coding	PCDHA8	ENSG00000205078
	protein_coding	SYCE1L	ENSG00000205464
	protein_coding	ATP6AP1L	ENSG00000205861
	processed_transcript	RP11-45B20.3	ENSG00000205923
			protein_coding
		CEMP1	ENSG00000211695
	TR_V_gene	TRGV9	
ENSG00000213096	protein_coding	ZNF254	
ENSG00000213380	protein_coding	COG8	
ENSG00000213892	protein_coding	CEACAM16	
ENSG00000213904	antisense	CTB-50E14.6	
ENSG00000215158	transcribed_unprocessed_pseudogene		RP11-1023L17.1
ENSG00000215630	unprocessed_pseudogene	RP11-1280N14.4	ENSG00000215915
	protein_coding	ATAD3C	
ENSG00000223745	processed_transcript	RP4-717I23.3	
ENSG00000224043	antisense	AC016725.4	
ENSG00000224051	protein_coding	CPTP	
ENSG00000224063	antisense	AC007319.1	
ENSG00000224209	processed_transcript	LINC00466	
ENSG00000224271	lincRNA	RP11-191L9.4	
ENSG00000225449	transcribed_unprocessed_pseudogene		AC079776.7
ENSG00000225657	lincRNA	RP5-843L14.1	
ENSG00000226329	unprocessed_pseudogene	AC005682.6	
ENSG00000226411	unprocessed_pseudogene	CTD-2526L21.2	
ENSG00000226674	lincRNA	AC074093.1	ENSG00000226835
	lincRNA	RP11-148B18.1	
ENSG00000226930	unprocessed_pseudogene	GTF2IP2	
ENSG00000226950	processed_transcript	KIAA0114	
ENSG00000227191	TR_C_gene	TRGC2	
ENSG00000228109	antisense	AC068302.3	
ENSG00000228340	lincRNA	RP5-1043L13.1	
ENSG00000228430	transcribed_unprocessed_pseudogene		RP11-15B24.5
ENSG00000228564	antisense	RP11-3N2.3	
ENSG00000229558	lincRNA	RP11-760M1.1	
ENSG00000229809	protein_coding	ZNF688	
ENSG00000230715	processed_pseudogene	RP11-274B21.4	
ENSG00000230735	sense_intronic	RP11-413E1.4	

ENSG00000230927	transcribed_unitary_pseudogene	AC007566.11	
ENSG00000232000	transcribed_unprocessed_pseudogene	RP11-54D18.3	
ENSG00000232546	unprocessed_pseudogene	RP11-458F8.1	
ENSG00000232677	lincRNA	AC092296.1	
ENSG00000232894	unprocessed_pseudogene	RP11-76K19.1	
ENSG00000233101	antisense	HOXB-AS3	
ENSG00000233437	transcribed_unprocessed_pseudogene		RP13-580B18.1
ENSG00000233515	lincRNA	AL022344.4	
ENSG00000234127	protein_coding	TRIM26	
ENSG00000234585	transcribed_unprocessed_pseudogene		CCT6P3
ENSG00000234667	unitary_pseudogene	AC105935.1	ENSG00000234948
	lincRNA	RP4-723E3.1	
ENSG00000235169	protein_coding	SMIM1	
ENSG00000235173	protein_coding	HGH1	
ENSG00000235438	transcribed_processed_pseudogene	RP11-101P17.5	
ENSG00000235501	antisense	RP4-639F20.1	
ENSG00000235687	transcribed_unprocessed_pseudogene		RP11-20F24.3
ENSG00000235863	protein_coding	B3GALT4	
ENSG00000235944	transcribed_unprocessed_pseudogene		ZNF815P
ENSG00000236532	lincRNA	AL035610.2	
ENSG00000237036	antisense	ZEB1-AS1	
ENSG00000237136	protein_coding	C4orf51	
ENSG00000237899	lincRNA	RP4-739H11.3	
ENSG00000238009	lincRNA	RP11-34P13.7	
ENSG00000238098	transcribed_unitary_pseudogene		ABCA17P
ENSG00000240972	protein_coding	MIF	
ENSG00000241288	processed_transcript	RP11-379B18.5	
ENSG00000241472	processed_transcript	RP11-204J18.3	
ENSG00000241685	protein_coding	ARPC1A	
ENSG00000242753	lincRNA	RP11-716O23.2	
ENSG00000242781	lincRNA	RP11-47P18.2	
ENSG00000242908	antisense	RP11-454C18.2	
ENSG00000243648	processed_pseudogene	RP11-215P8.1	
ENSG00000243708	protein_coding	PLA2G4B	ENSG00000244055
	antisense	AC007566.10	
ENSG00000244509	protein_coding	APOBEC3C	
ENSG00000246225	antisense	RP11-17A1.3	
ENSG00000246596	transcribed_unprocessed_pseudogene		RP11-1277A3.2
ENSG00000247121	antisense	CTD-2260A17.2	
ENSG00000248210	lincRNA	RP11-24I21.1	
ENSG00000248294	lincRNA	CTD-2023N9.2	
ENSG00000248307	lincRNA	RP11-8P17.1	
ENSG00000248408	lincRNA	RP11-452C8.1	

ENSG00000248491	lincRNA	RP11-125O18.1	
ENSG00000248746	protein_coding	ACTN3	
ENSG00000248771	protein_coding	RP11-294O2.2	
ENSG00000248905	protein_coding	FMN1	
ENSG00000249715	protein_coding	FER1L5	
ENSG00000250159	antisense	RP11-381K20.2	
ENSG00000250420	transcribed_unprocessed_pseudogene		RP11-21I4.1
ENSG00000250506	protein_coding	CDK3	
ENSG00000251183	lincRNA	AC091962.3	
ENSG00000251432	lincRNA	RP11-420A23.1	
ENSG00000253816	unprocessed_pseudogene		RP11-1415C14.3
ENSG00000254587	lincRNA	RP11-360K13.1	
ENSG00000254840	transcribed_unprocessed_pseudogene		RP11-574M7.1
ENSG00000257943	transcribed_unitary_pseudogene		RP11-167N24.3
ENSG00000258131	lincRNA	RP11-541G9.1	
ENSG00000258368	unprocessed_pseudogene		ZNF970P
ENSG00000258704	transcribed_unitary_pseudogene		RP11-85K15.2
ENSG00000258754	lincRNA	CTD-3049M7.1	
ENSG00000259116	antisense	RP11-973N13.4	
ENSG00000259469	lincRNA	RP11-227D13.4	
ENSG00000259736	antisense	RP11-387D10.2	
ENSG00000259905	lincRNA	PWRN1	
ENSG00000259917	unprocessed_pseudogene		RP11-1H8.2
ENSG00000260220	protein_coding	CCDC187	
ENSG00000260230	protein_coding	FRRS1L	ENSG00000260232
	lincRNA		RP11-484P15.2
ENSG00000260260	lincRNA	RP11-304L19.5	
ENSG00000260510	antisense	AC004381.7	
ENSG00000260760	lincRNA	RP11-580I1.3	
ENSG00000260777	lincRNA	CTD-2008P7.1	
ENSG00000260780	lincRNA	RP11-580I1.1	
ENSG00000260916	protein_coding	CCPG1	
ENSG00000261008	lincRNA	AC004158.2	
ENSG00000261621	lincRNA	RP11-580I1.2	
ENSG00000261879	antisense	RP11-333E1.1	
ENSG00000262246	protein_coding	CORO7	
ENSG00000263731	lincRNA	RP11-498C9.15	
ENSG00000265688	antisense	MAFG-AS1	
ENSG00000266957	antisense	RP11-49K24.4	
ENSG00000267767	lincRNA	CTC-523E23.4	
ENSG00000267796	protein_coding	LIN37	
ENSG00000268364	antisense	RP11-373A9.3	
ENSG00000270025	transcribed_unprocessed_pseudogene		BMS1P7

ENSG00000270265 lincRNA RP11-731D1.4
 ENSG00000272281 transcribed_unprocessed_pseudogene RP11-64P12.3
 ENSG00000272980 processed_transcript RP11-517H2.6
 ENSG00000274605 lincRNA RP11-12G12.7
 ENSG00000275374 unprocessed_pseudogene RP11-346J10.2
 ENSG00000275437 sense_intronic RP5-908M14.10 ENSG00000275494
 sense_intronic RP11-266L9.8 ENSG00000275793 protein_coding
 RIMBP3
 ENSG00000276124 miRNAMIR6855
 ENSG00000276318 unprocessed_pseudogene RP11-1157N2_A.1 ENSG00000277072
 transcribed_unprocessed_pseudogene AC004166.7 ENSG00000277149
 protein_coding TYW1B
 ENSG00000277369 lincRNA RP11-486I11.2
 ENSG00000277661 antisense XXbac-BPG258E24.10
 ENSG00000278349 miRNAMIR6754
 ENSG00000278709 antisense RP5-1059L7.1
 ENSG00000279605 TEC RP11-661A12.8
 ENSG00000280623 lincRNA PCAT14
 ENSG00000281103 antisense TRG-AS1
 ENSG00000283117 lincRNA CTD-2060L22.1
 ENSG00000283399 unprocessed_pseudogene AC004381.8
 ENSG00000283415 lincRNA RP11-413N10.3

ANEXO 1

APROVAÇÃO DO CEP



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



Ribeirão Preto, 22 de julho de 2015

Ofício nº 2563/2015
CEP/MGV

Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado “ANÁLISE DE TRANSCRIPTOMA EM ESPERMATOZOÍDES DE HOMENS COM VARICOCELE E HOMENS FÉRTEIS E INFÉRTEIS SEM VARICOCELE” – versão 2, de 20/06/2015, foi analisado “AD REFERENDUM” pelo Comitê de Ética em Pesquisa, e enquadrado na categoria: **APROVADO**, bem como o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – versão 2, de 19/06/2015**, o Biorrepositório e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para Guarda de Material Biológico – versão 1, de 15/07/2015, de acordo com o Processo HCRP nº 6438/2015.

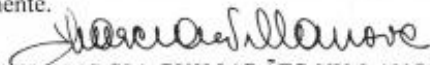
Entretanto, deve-se aguardar a manifestação da CONEP, pois o projeto será encaminhado para apreciação e aprovação.

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

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

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

Atenciosamente.


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

Ilustríssimas Senhoras
PROFª.DRª.ROSANA MARIA DOS REIS(Orientadora)
VIVIANE PAIVA SANTANA
Depto. de Ginecologia e Obstetria

ANEXO 2 PRIMEIRA E ÚLTIMA PÁGINA DE APROVAÇÃO DO CONEP

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DA CONEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise de transcriptoma em espermatozoides de homens com varicocele e homens férteis e inférteis sem varicocele

Pesquisador: Rosana Maria dos Reis

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa na área da genética da reprodução humana (reprogenética));

Reprodução Humana (pesquisas que se ocupam com o funcionamento do aparelho reprodutor, procriação e fatores que afetam a saúde reprodutiva de humanos, sendo que nessas pesquisas serão considerados "participantes da pesquisa" todos os que forem afetados pelos procedimentos delas);

(Reprodução assistida);

(Manipulação de gametas, pré-embriões, embriões e feto);

Versão: 4

CAAE: 44673515.8.0000.5440

Instituição Proponente: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da USP -

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.318.286

Apresentação do Projeto:

INTRODUÇÃO

O termo "varicocele" foi criado por Curling em 1843 e refere-se à dilatações das veias testiculares na porção escrotal do plexo pampiniforme que drena os testículos, devido à dificuldade do retorno venoso nessa região. A doença é encontrada em aproximadamente 20% dos adultos e adolescentes. Na maioria das vezes é assintomática e, quando há sintomas, o mais comum é a dor testicular, encontrada em 2 a 10% dos casos. A varicocele clínica é diagnosticada através de exame físico, enquanto a subclínica pode apenas ser observada via ultrassonografia com Doppler. Do ponto de vista clínico, a varicocele é classificada em três estádios de acordo com o sistema de Dubin e Amelar: grau I, tamanho pequeno, apenas palpável durante manobra de Valsalva; grau II, tamanho médio, palpável em repouso, e grau III, grande, com tamanho visível em repouso. A varicocele é uma das maiores patologias andrológicas relacionadas com o aumento da

COMISSÃO NACIONAL DE
ÉTICA EM PESQUISA



Continuação do Parecer: 1.318.288

Investigador	Projeto VIVIANE - 2.pdf	23/06/2015 11:22:18		Aceito
Outros	comitê de pesquisa.jpg	05/05/2015 19:33:23		Aceito
Folha de Rosto	folha de rosto.pdf	29/04/2015 14:04:36		Aceito
Outros	upc.jpg	27/04/2015 15:14:54		Aceito
Outros	ORÇAMENTO.pdf	27/04/2015 15:14:33		Aceito
Outros	cronograma de sua execução.pdf	27/04/2015 14:17:22		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE Viviane.pdf	27/04/2015 14:16:47		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto VIVIANE.pdf	27/04/2015 14:15:16		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Sim

BRASILIA, 12 de Novembro de 2015

Assinado por:
Jorge Alves de Almeida Venancio
(Coordenador)

Endereço: SEP 516 NORTE, BLOCO A 3º ANDAR, Edifício Ex-IVAN - Unidade II - Ministério da Saúde
Bairro: Asa Norte **CEP:** 70.750-521
UF: DF **Município:** BRASILIA
Telefone: (61)3315-5878 **E-mail:** conep@saude.gov.br