

CENTRO UNIVERSITÁRIO SAGRADO CORAÇÃO – UNISAGRADO

MARINA BRASIL MATTOS

O AUMENTO DA REGIÃO DA HETEROCROMATINA NO CROMOSSOMO 9
ASSOCIADO A HÁBITOS DE VIDA MODIFICA A EXPRESSÃO DE GENES
DETERMINANTES DA FERTILIDADE MASCULINA

BAURU

2022

MARINA BRASIL MATTOS

O AUMENTO DA REGIÃO DA HETEROCROMATINA NO CROMOSSOMO 9
ASSOCIADO A HÁBITOS DE VIDA MODIFICA A EXPRESSÃO DE GENES
DETERMINANTES DA FERTILIDADE MASCULINA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção do
título de bacharel em Biomedicina - Centro
Universitário Sagrado Coração.

Orientadora: Prof.^a Dra. Rita Luiza Peruquetti

BAURU

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) de acordo com ISBD

M435a	<p>Mattos, Marina Brasil</p> <p>O aumento da região da heterocromatina no cromossomo 9 associado a hábitos de vida modifica a expressão de genes determinantes da fertilidade masculina / Marina Brasil Mattos. -- 2022. 44f. : il.</p> <p>Orientadora: Prof.^a Dra. Rita Luiza Peruquetti</p> <p>Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO - Bauru - SP</p> <p>1. Infertilidade masculina. 2. Heterocromatina. 3. Cromossomo 9. I. Peruquetti, Rita Luiza. II. Título.</p>
-------	---

MARINA BRASIL MATTOS

O AUMENTO DA REGIÃO DA HETEROCROMATINA NO CROMOSSOMO 9
ASSOCIADO A HÁBITOS DE VIDA MODIFICA A EXPRESSÃO DE GENES
DETERMINANTES DA FERTILIDADE MASCULINA

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
como parte dos requisitos para obtenção do
título de bacharel em Biomedicina - Centro
Universitário Sagrado Coração.

Aprovado em: ___/___/___.

Banca examinadora:

Prof.^a Dra. Rita Luiza Peruquetti (Orientadora)
Centro Universitário Sagrado Coração

Prof.^a Me. Thainá Valente Bertozzo (Banca examinadora)
Centro Universitário Sagrado Coração

Dedico este trabalho aos meus avós, que não mediram esforços para que eu fosse feliz.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço à Deus pela minha vida e pela permissão de chegar até aqui. Mesmo com as dificuldades de uma nova vida fora de casa, Sua presença sempre foi primordial para a garantia do meu conhecimento e experiência no ambiente universitário.

À minha orientadora, Prof^ª. Dra. Rita Luiza Peruquetti, por todo apoio e paciência durante esses quatro anos de convivência, desde o início da minha iniciação científica até o fim do meu trabalho de conclusão de curso. Sua contribuição científica para comigo foi essencial para a elaboração deste trabalho me auxiliando a compreender ainda mais sobre o tema e me fazendo ficar apaixonar pela reprodução e genética humana.

Ao Prof. Dr. Leandro de Andrade Holgado por me apresentar o lado mais lindo da genética em sua aula de embriologia clínica ministrado ainda em meu primeiro ano de faculdade. Suas aulas ficarão para sempre em minha memória, serei eternamente grata.

Aos meus familiares, em particular, aos meus avós maternos Sr. Mario Antônio Brasil e Sra. Neusa Renda Brasil, que lutaram e batalharam para que eu fosse a pessoa mais feliz do mundo e tivesse todo apoio, seja ele psicológico ou financeiro. Agradeço imensamente por nunca deixarem de acreditar em mim, até quando eu mesma já não acreditava. Sem vocês dois eu não seria nada.

Aos meus avós paternos, especialmente a Sra. Nair da Silva Mattos que mesmo de longe sei que orava por mim e pela minha vitória.

Agradeço também à minha mãe Fabiana Renda Brasil Mattos, à minha irmã mais nova Clara Brasil Mattos e aos meus tios, em especial, minhas tias Fernanda, Karoline e Nádia, e meus tios Mario Jr. e Roberto por todo apoio e auxílio durante essa pequena jornada.

Aos meus primos Laura e Rafael que por muitas vezes me tiraram boas risadas quando tudo parecia estar ruim, a minha linda afilhada Livia, que a cada sorriso me deixava ainda mais forte para continuar e à um membro que irá chegar no fim de fevereiro, Vinicius, estou ansiosa para te conhecer.

À uma amiga irreparável com um amor inigualável. Obrigada minha cachorra Jade, pela sua fiel companhia em todas as madrugadas em claro redigindo esse projeto e por sempre me receber com alegria quando finalmente volto para casa, sem a sua presença tudo seria completamente sem graça.

À todas as minhas amigas da UNISAGRADO, que fizeram parte dessa trajetória e souberam com muita destreza me acalmar e me orientar quando as coisas ficavam difíceis.

Carolina, Caroline, Geovana, Giovana, Laura J. e Laura S., meus sinceros agradecimentos a vocês.

Ao meu namorado Igor, por estar presente mesmo que indiretamente na escrita desse trabalho me incentivando sempre a ser uma boa estudante e futura profissional biomédica.

E por fim agradecer a todos os funcionários da UNISAGRADO que de alguma forma me auxiliaram na vida universitária, em especial à minha coordenadora Prof.^a Dr.^a Andrea Mendes Figueiredo e a minha banca Prof.^a Ma. Thainá Valente Bertozzo, permitindo assim que todos os meus conhecimentos teóricos e práticos tenham sido adquiridos com eficiência e fidedignidade.

“Depois de um tempo você aprende
a sutil diferença entre segurar uma mão
e acorrentar uma alma
e você aprende que amar não significa apoiar-
se
e companhia não quer sempre dizer segurança.
E você começa a aprender que beijos não são
contratos e presentes não são promessas
e você começa a aceitar suas derrotas
com sua cabeça erguida e seus olhos adiante
com a graça de mulher
não a tristeza de uma criança
e você aprende
a construir todas as estradas hoje
porque o terreno de amanhã é demasiado
incerto para planos
e o futuro têm o hábito de cair no meio do voo.
Depois de um tempo você aprende
que até mesmo a luz do sol queima
se você a tiver demais
então você planta seu próprio jardim e enfeita
sua própria alma
ao invés de esperar que alguém lhe traga
flores.
E você aprende que você realmente pode
resistir
você realmente é forte
você realmente tem valor
e você aprende
e você aprende
com cada adeus, você aprende.”
(SHOFFSTALL, Veronica, 1971).

RESUMO

A infertilidade vem atingindo aproximadamente 15% dos casais de diversas regiões do mundo, trazendo prejuízos crescentes para a saúde da população. Os fatores masculinos representam as causas mais frequentes em centros de diagnóstico. Devido a isso, os homens são submetidos a diversos exames para detectar causas de infertilidade, e em muitos destes homens tem sido identificado um aumento da região de heterocromatina no cromossomo 9, estrutura a qual armazena alguns genes responsáveis pela regulação da espermatogênese. A formação da heterocromatina é fortemente regulada por eventos epigenéticos, os quais podem ser influenciados por fatores ambientais e hábitos de vida, como a exposição a agentes tóxicos, desregulação dos ciclos circadianos e hábitos de vida não saudáveis. Deste modo, este trabalho procurou relacionar o aumento da região heterocromática, de um cromossomo não sexual (9), com fatores determinantes associados a fertilidade masculina por meio de questionários no que se refere a hábitos de vida e através da caracterização da expressão gênica de cinco genes envolvidos no processo da espermatogênese que estão ou não codificados na região de heterocromatina (*Vcp*; *Hsd/Aep1*; *Dmrt1*; *Spata/Hsd17b3* e *Nr5a1*). De acordo com as amostras obtidas os pacientes foram separados em três grupos para a realização dos questionários e análise de dados, sendo estes: Grupo Controle (GC – espermograma normal; 46,XY) (n=7); Grupo Oligozoospermia (GO – espermograma alterado; 46,XY) (n=10) e Grupo Heterocromatina (GH – espermograma normal ou alterado; 46,XY,9qh+) (n=4). Quanto a expressão genica, não foi observada uma diferença relevante entre os grupos GO e GC, apenas havendo diferença entre GO e GH, uma vez que os indivíduos que possuem um diagnóstico de aumento da heterocromatina apresentaram históricos mais fortemente associados a infertilidade masculina. Essas evidências apontam uma possível relação entre os hábitos de vida e o aumento da heterocromatina, comprovando que fertilidade possui determinação multifatorial.

Palavras chaves: infertilidade masculina; heterocromatina; cromossomo 9.

ABSTRACT

Infertility has been reaching roughly 15% of couples from different regions of the world, bringing increasing losses to the health of population. Male factors represent the most frequent causes on diagnosis centers. Due to that, men are submitted to several exams in order to detect infertility causes, and in many of these men has been detected an increase in the heterochromatin region at chromosome 9, structure which stores some genes responsible for the regulation of spermatogenesis. The shaping of heterochromatin is strongly regulated by epigenetic events, which can go under the influence of environmental factors and life habits, such as the exposure to toxic agents, deregulation of circadian cycles and unhealthy lifestyles. Therefore, this piece sought to relate the heterochromatin region's increase to a non-sexual chromosome (9), with determining factors associated to male fertility through questionnaires refereeing lifestyle habits and through the characterization of gene expression of five involved genes in the process of spermatogenesis whether or not coded in the heterochromatin region (Vcp; Hsd/Aep1; Dmrt1; Spata/Hsd17b3 e Nr5a1). According to the samples obtained, the patients were separated into three groups for the questionnaires performance and data analysis, these being: Control Group (CH - normal spermogram; 46XY) (n=7); Oligozoospermia Group (OG - altered spermogram; 46,XY) (n=10) and Heterochromatin Group (HG - normal or altered spermogram; 46,XY,9qh+) (n=4). As for the gene expression, no relevant difference was observed between the OG and CG groups, only a difference between OG and HG, once individuals that have a diagnosis of increased heterochromatin presented stronger history of male infertility. These evidences points a possible relation between life habits and heterochromatin increase, proving that fertility has multifactorial determination.

Keywords: male infertility; heterochromatin; chromosome 9.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1: Representação da distribuição dos genes de interesse do presente projeto nas regiões pericentroméricas e não pericentroméricas do cromossomo 9..... 16
- Figura 2: Representação da expressão gênica relativa, obtida por PCR-RT, dos respectivos grupos de estudo deste trabalho..... 29

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Separação dos grupos amostrais.	21
Tabela 2: Levantamento do histórico relativo à atividade sexual do casal e saúde reprodutiva masculina, dos indivíduos integrantes dos respectivos grupos de estudo deste trabalho.	25
Tabela 3: Levantamento do histórico de doenças prévias e hábitos de vida do casal, dos indivíduos integrantes dos respectivos grupos de estudo deste trabalho.	26

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
1.1	INFERTILIDADE MASCULINA	13
1.2	HETEROCROMATINA	14
1.3	CROMOSSOMO 9	15
2	JUSTIFICATIVA	18
3	OBJETIVOS	19
4	METODOLOGIA	20
4.1	CASUÍSTICA	20
4.2	ESPERMOGRAMA	21
4.3	DETERMINAÇÃO DO CARIÓTIPO ATRAVÉS DA TÉCNICA CONVENCIONAL DE SANGUE PERIFÉRICO	21
4.4	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL	22
5	RESULTADOS E DISCUSSÕES	24
5.1	ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO QUESTIONÁRIO DE HÁBITOS DE VIDA	24
5.2	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES LOCALIZADOS DENTRO E FORA DA REGIÃO DA HETEROCROMATINA	28
6	CONSIDERAÇÕES FINAIS	32
	REFERÊNCIAS	33
	APÊNDICE	38
	APÊNDICE B	40
	ANEXOS	43

1 INTRODUÇÃO

Uma das doenças que vem apresentando altas crescentes perante à saúde da população masculina, é a infertilidade, que além de se tornar uma grande preocupação de saúde pública é também uma situação dolorosa para casais que buscam uma gravidez regular (BARROS; SANTOS; CARVALHO, 2020).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (2020), a infertilidade pode ocorrer tanto nas mulheres quanto nos homens, e só pode ser definida após um ano ou mais de vida sexual regular sem o uso de qualquer proteção. É uma manifestação universal, isto é, que atinge aproximadamente 15% dos casais de diversas regiões do mundo, sejam elas de alto ou baixo desenvolvimento socioeconômico e cultural (PASQUALOTTO, 2007).

Por mais que essa condição acometa ambos os sexos, os fatores masculinos são as alterações que mais aparecem em centros de diagnóstico, sendo estes uma contribuição de normalmente 50% de infertilidade perante os casais tentantes (ALVES *et al.*, 2021). Em um estudo Santos *et al.* (2013) relatam que cerca de 6% dos homens com menos de 45 anos são inférteis, e quase 100% dos casos o problema se encontra na morfologia espermática.

Todavia, existem diversas vertentes das quais podem indicar um diagnóstico para a infertilidade do homem, podendo ser através de uma análise dos hábitos de vida não saudáveis do indivíduo (como o uso de drogas, tabagismo, obesidade e má nutrição); avaliação psicológica e como principal ponto a avaliação genética (ARRUDA; LIMA, 2012; BARROS; SANTOS; CARVALHO, 2020). Borghet e Wyns (2018), relatam que a infertilidade masculina influenciada por defeitos genéticos está diretamente ligada a fatores de estilo de vida modificáveis, visto que estes aspectos possuem propriedade em modificar a integridade do DNA espermático.

De acordo com Abreu, Sartorelli e Pereira (2008), as alterações genéticas são originadas devido a fatores cromossômicos ou mutações genéticas, das quais normalmente só são detectadas após uma sequência de abortos ou até mesmo após o nascimento de filhos portadores de deficiência. Com esse potencial de fatores, procurar mecanismos para a realização de exames genéticos se torna indispensável, dado que estes possuem tal relevância na investigação clínica que podem evitar procedimentos invasivos ou até mesmo tratamentos inadequados (LOPES, 2015; KRAUSZ *et al.*, 2018).

Para a obtenção de um diagnóstico precoce, o primeiro exame a ser realizado deverá ser o espermograma, o qual avalia características morfológicas dos espermatozoides,

incluindo sua motilidade, tamanho e número. Por conseguinte, para que assim haja uma conclusão de diagnóstico, o exame de maior relevância genética é indicado para a pontuação da análise, o cariótipo (ALVES *et al.*, 2021).

1.1 INFERTILIDADE MASCULINA

O processo da espermatogênese é um sistema complexo de diferenciação celular, que possui como principal objetivo a maturação das células germinativas masculinas, usando fatores genéticos e epigenéticos que influenciam diretamente na qualidade e na quantidade dos espermatozoides (BARROS; SANTOS; CARVALHO, 2020).

O exame de espermograma é considerado o padrão ouro para a investigação de infertilidade e tem como princípio descrever os aspectos da análise seminal, sendo as mais recorrentes a oligozoospermia (baixa quantidade de espermatozoides), astenozoospermia (motilidade inadequada) e/ou teratozoospermia (espermatozoides com morfologia anormal) (FEIJÓ *et al.*, 2012; OMS, 2010).

Outro conceito associado a infertilidade masculina, é de que a idade está diretamente relacionada as doenças genéticas, como por um exemplo as aneuploidias, as mutações e as anomalias cromossômicas. O surgimento desta observação se dá pelas diversas replicações mitóticas que as células germinativas sofrem durante pelo menos 50 anos, tendo assim uma grande probabilidade de erros no momento da duplicação do DNA (SILVA *et al.*, 2012).

Além do mais, os fatores ambientais e os hábitos de vida estão diretamente relacionados a infertilidade masculina associada ao envelhecimento, devido aos ritmos biológicos presentes no organismo que são de extrema importância para a sobrevivência humana, atuando no controle homeostático de funções fisiológicas e metabólicas. (PEREIRA; TUFIK; PEDRAZZOLI, 2008; SANTOS; ANDRADE; BUENO, 2009).

Vitaterna, Takahashi e Turek (2001) denominam o evento citado acima como os ciclos circadianos, os quais são controlados por fatores extrínsecos como a luz, alimentação e exercícios físicos, e possuem como os seus principais componentes, as proteínas CLOCK (*circadian locomotor output cycle proteins kaput*) e BMAL1 (*brain and muscle ARNT-Like 1*). Estudos apontam que baixos níveis ou até mesmo a ausência destas proteínas no organismo geram desequilíbrios na espermatogênese, uma vez que já foi comprovado esterilidade e um fenótipo de envelhecimento precoce em experiências com camundongos

deficientes da proteína BMAL1 (ALVAREZ *et al.*, 2008; PERUQUETTI; MATEO; SASSONE-CORSI, 2012).

1.2 HETEROCROMATINA

Devido ao alto índice de procura de assistência médica para o diagnóstico e tratamento de problemas de infertilidade, o fator genético é logo apontado como uma probabilidade muito relevante, submetendo assim casais ao exame citogenético para a avaliação de alterações cromossômicas (MUSTACCHI; PERES, 2000).

De acordo com Oliveira *et al.* (2011), a heterocromatina foi um termo introduzido na genética por Heitz em 1928, utilizado para descrever a cromatina ou os segmentos de cromossomos, que ao fim da mitose não passavam pelo processo de descondensação, permanecendo assim durante a interfase e obtendo propriedades heteropicnóticas como resultado. Em outras palavras, essa estrutura era tida como um lixo cromossômico antes do conhecimento científico sobre o seu papel fundamental na genética, tendo sua principal função na coesão entre as cromátides irmãs por meio da ligação da cromatina e a proteína coesina (GARTENBERG, 2009).

A heterocromatina está ligada a uma ausência de genes, ou seja, possui inatividade das informações genéticas presentes no DNA cromossômico. Com base nisso, a heterocromatina foi classificada em dois grupos, sendo estes a heterocromatina facultativa a qual apresenta condensação e uma inatividade parcial em um dos cromossomos do par, e a heterocromatina constitutiva a qual está permanentemente condensada e inativa, estando próxima das regiões do centrômero e do nucléolo (VALADARES; ARAUJO; PANTALEÃO, 2011).

As regiões de permanência de condensação dos cromossomos durante a interfase, normalmente não possuem a mesma quantidade de heterocromatina, tendo os cromossomos 1, 9 e 16 os maiores blocos heteropicnóticos na região dos centrômeros. Sabe-se que a heterocromatina se encontra na maioria das espécies e é fundamental para o bom funcionamento celular em eucariontes, isto é, os genes responsáveis pela fertilidade e pela herança cromossômica normalmente se encontram nesta região (OLIVEIRA *et al.*, 2011).

O bandejamento C e G é a técnica utilizada para a melhor visualização de polimorfismo cromossômico nas regiões da heterocromatina constitutiva, no entanto mesmo estando em suas formas mais graves são consideradas variações normais, visto que estas não

aparentam afetar o fenótipo, indicando assim que as diferenças qualitativas no bandejamento são consequências da deriva genética (JI *et al.*, 2007, p.14; BROGLIA *et al.*, 2011).

Déjardin (2015) relata que a composição da heterocromatina localizada na região pericentromérica dos cromossomos é altamente dinâmica, tendo altos níveis de metilação de DNA que por sua vez é o responsável pela inatividade genética nestas regiões. Este fator pode se apresentar desregulado devido a várias condições patológicas, no entanto pode ser comprometido pela influência de fatores ambientais e hábitos de vida, como a exposição a agentes tóxicos, desregulação dos ciclos circadianos e hábitos de vida não saudáveis (PARNELL *et al.*, 2017).

1.3 CROMOSSOMO 9

A citogenética é o estudo que visa compreender a morfologia, a funcionalidade e o comportamento dos cromossomos, uma vez que estes estão organizados por sua morfologia e tamanho do cariótipo. A espécie humana possui 46 cromossomos em suas células, formando 22 pares classificados como autossômicos e um par como sexual (COROMINAS, 2020).

O equilíbrio do material genético cromossômico é um fator de suma importância para o bom funcionamento dos genes encontrados nos cromossomos, os quais dão características e instruções às células do corpo. Uma alteração quantitativa ou qualitativa, isto é, da organização da informação genética pode provocar problemas para o desenvolvimento humano, podendo ser estas alterações numéricas, estruturais ou polimorfismos (GRIFFITHS *et al.*, 2008).

A estrutura do cromossomo 9 é altamente polimórfica, contendo o maior bloco de heterocromatina que afeta de 6-8% dos seres humanos e além disso sua sequência final de eucromatina compreende 109.044.351 pares de bases representando mais que 99,6% da região. Foram descritos aproximadamente 1.149 genes codificados neste cromossomo, dentre eles genes relacionados à determinação do sexo masculino e feminino, e reversão sexual (HUMPHRAY *et al.*, 2004).

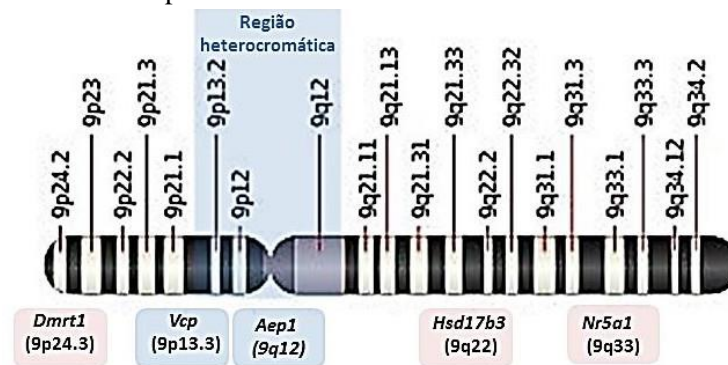
Os estudos feitos por Sahin *et al.* (2008) mostram que o heteromorfismo possui uma alta frequência em homens inférteis, sendo considerado assim uma anormalidade cromossômica. Entretanto, outras pesquisas contrapõem esse conceito justificando que não há

provas concretas que representem esse fato, considerando o aumento da região heterocromática do cromossomo 9 uma variante normal (ANTONELLI *et al.*, 2000).

Evidências apontam que a região heterocromática do cromossomo 9 é a responsável por carregar os genes associados a fertilidade masculina, sendo assim a estrutura crucial para a determinação de uma prole normal, abortos ou mortes neonatais (OLIVEIRA *et al.*, 2011; CAMPANHOL *et al.*, 2011).

É possível citar cinco genes codificados de interesse a investigar problemas associados a fertilidade masculina, que estão de alguma forma envolvidos no processo da espermatogênese, sendo estes: (a) *Aep1*; (b) *Vcp*; (c) *Dmrt1*; (d) *Hsd17b3*; (e) *Nr5a1*.

Figura 1: Representação da distribuição dos genes de interesse do presente projeto nas regiões pericentroméricas e não pericentroméricas do cromossomo 9.



Fonte: Elaborado pela autora.

O gene *Aep1*, ou também conhecido como, *Spata31A7*, *Spata31A4*, *C9orf36*, *Fam75A4*, *Fam75A7* ou *C9orf36A*, foi analisado pela primeira vez em testículos de ratos que apresentavam deficiência de vitamina A (VAD) tratados com retinol, sendo expresso na região do acrossomo das espermátides a partir da 25ª dia pós-natal, indicando estar diretamente relacionado com a formação desta estrutura (ZUO *et al.*, 2010). Por sua vez, Luk *et al.* (2006) definiram que a proteína *Aep1* é fundamental no processo da morfogênese do acrossomo, uma vez que os defeitos que podem ocorrer durante essa etapa resultam em infertilidade.

O *Vcp*, podendo também ser conhecido por *Cdc48*, *Ibmpfd*, *p97* ou *Tera*, é um gene localizado mais precisamente no braço curto do cromossomo 9 na posição 13.3 (9p13.3) e é responsável por fornecer informações para a produção da enzima valosina. Esta proteína codificada possui baixa especificidade tecidual, podendo ser encontrada em todas as células

nucleadas do organismo, onde desempenha inúmeras funções como resposta a danos e replicação de DNA, degradação de proteínas e regulação do nível de proteínas envolvidas no tempo de divisão celular e crescimento (VCP PROTEIN EXPRESSION SUMMARY, [2022]).

O terceiro gene de grande importância encontrado no cromossomo 9, associado a fertilidade masculina, o *Dmrt1* ou também chamado de *Dmt1* ou *Ct154*, desempenha um papel fundamental na determinação e diferenciação do sexo masculino, controlando o desenvolvimento dos testículos e a proliferação das células gaméticas masculinas. Também é o responsável na manutenção do sexo pós-natal, mantendo a determinação dos testículos e prevenindo a feminização, uma vez que deleções do braço curto do cromossomo 9 são muito associadas à disgenesia gonadal XY (DMRT1 PROTEIN EXPRESSION SUMMARY, [2022]); TÛTTELMANN; RUCKERT; RÖPKE, 2018). Além disso, estimula a produção abundante e contínua de espermatozoides devido gerar uma inibição da meiose nas espermatogônias indiferenciadas, permitindo assim maior funcionamento do ciclo mitótico (MATSON *et al.*, 2010).

O gene *Hsd17b3/Spata*, localizado no braço longo do cromossomo 9 na posição 22 (9q22), tem como princípio a conversão de androstenediona em testosterona por meio da expressão da enzima 17 beta-hidroxiesteróide desidrogenase (17 β -HSD) nos testículos, usando preferencialmente o NADP como cofator. Pode ser também conhecido como *Edh17b3* ou *Sdr12c2* (SILVIA; MELLO; SCALLET, 2019; HSD17B3 PROTEIN EXPRESSION SUMMARY, [2022]).

O último gene, *Nr5a1* (*Elp; Sf1; Ftz1; Pof7; Sf-1; Ad4bp; Ftzf1; Spgf8; Srxx4; Srx3* ou *hSF-1*) está localizado na região 9q33 e codifica a proteína 1 do fator esteroideogênico (SF1), a qual está envolvida na determinação e diferenciação sexual, e na descendência testicular. (TÛTTELMANN; RUCKERT; RÖPKE, 2018). Além disso, o *Nr5a1* é um regulador transcricional chave para regulação de outros genes envolvidos no desenvolvimento e na função reprodutiva, uma vez que defeitos neste gene é causa de reversão sexual XY gerando formas graves de infertilidade masculina (FERLIN *et al.*, 2015).

2 JUSTIFICATIVA

Devido ao aumento do número de casais inférteis influenciados por fatores masculinos, o presente estudo busca analisar alguns genes determinantes da fertilidade masculina, tendo em vista que, tanto como a infertilidade masculina como a infertilidade em geral são considerados problemas de saúde pública no Brasil (WHO, 2020). Para a execução deste trabalho serão avaliados parâmetros que buscam correlacionar os hábitos de vida da população masculina com o aumento da região da heterocromatina no cromossomo 9 e a prevalência da infertilidade.

3 OBJETIVOS

Relacionar o aumento da heterocromatina no cromossomo 9, por meio de análises de hábitos de vida, com a infertilidade masculina e caracterizar a expressão de dois genes envolvidos com a espermatogênese presentes na região heterocromática desta estrutura.

4 METODOLOGIA

4.1 CASUÍSTICA

Foram utilizadas amostras de pacientes encaminhados ao Laboratório Fertility Medical Group, na cidade de Bauru – São Paulo. Este grupo de pacientes foi constituído por homens com suspeita de infertilidade, com idade entre 22 e 57 anos, que possuíam espermograma e cariótipo agendados ou que apenas possuíam espermograma agendado, mas que estavam dispostos a realizar o cariótipo, no Laboratório Genos, localizado no mesmo endereço.

Os pacientes foram informados sobre os objetivos da pesquisa e, quando aceitavam participar, foi procedida a leitura e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE. (APÊNDICE A). Nesta etapa o paciente foi auxiliado e todas as suas dúvidas foram esclarecidas por pesquisadores treinados para os devidos fins. Os pacientes também receberam o Questionário de Levantamento de Hábitos de Vida (APÊNDICE B) para levantamento de informações que foram relevantes à presente pesquisa. O período de coleta de amostras de sêmen e sangue para a determinação do diagnóstico ocorreu entre março de 2017 e agosto de 2018. O presente trabalho e questionário foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP/USC) sob parecer número 1.935.805. (ANEXO A).

Os grupos foram separados de acordo com os resultados do espermograma e do cariótipo, sendo que o número total de pacientes que passaram pela clínica para realização de espermograma neste período foram de 178 pacientes (N total = 178) e apenas 76 destes poderiam ser enquadrados em cada grupo, pois possuíam cariótipo ou aceitaram realizar o cariótipo (N total de amostras completas = 76) e por fim, 21 pacientes aceitaram participar da pesquisa (N utilizado = 21). Podemos observar a separação dos grupos na Tabela 1.

Tabela 1: Separação dos grupos amostrais.

Grupos	Espemograma	Cariótipo	Nº total de amostras completas coletadas	Nº total utilizado nas análises	Idade
Grupo Controle (GC)	Normal	46,XY	28	10	22-47
Oligozoospermia (GO)	Oligozoospermia	46,XY	39	10	31-57
Heterocromatina (GH)	Normal/ Oligozoospermia	46,XY, 9qh+	9	4	36-42

Fonte: Elaborado pela autora.

4.2 ESPERMOGRAMA

Para realização do espermograma os pacientes devem respeitar um período de abstinência sexual de 2 a 7 dias antes de coletarem a amostra de sêmen. Após a coleta, o sêmen foi submetido ao processo de liquefação (30 minutos) e, posteriormente, todo o volume de sêmen foi aspirado para checagem da viscosidade, coloração e volume, além de ser determinado o pH da amostra. A concentração de espermatozoides foi determinada em câmara de Mackler e anotado em milhões/mL. A motilidade espermática percentual, bem como a progressão espermática, é avaliada utilizando-se a câmara de Makler. Os valores de referência para análise seminal (Motilidade progressiva, Motilidade não progressiva e Imóvel), seguiram os parâmetros preconizados pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 2010). Após realização da análise seminal completa pela Clínica Fertility, o material excedente foi encaminhado para protocolo de extração de RNA.

4.3 DETERMINAÇÃO DO CARIÓTIPO ATRAVÉS DA TÉCNICA CONVENCIONAL DE SANGUE PERIFÉRICO

Para determinar o cariótipo do paciente, deve ser coletado aproximadamente 5mL de sangue venoso do paciente em tubo heparinizado para a cultura de leucócitos. O sangue foi colocado em cultura e incubou-se na estufa a 37°C por 72 horas. Ao fim do período de

incubação, adicionou-se a Colcemid (Gibco)®, substância que impede a formação do fuso acromático e conseqüentemente bloqueio das células em metáfase, esta age por 1 hora em estufa. Centrifugaram-se os tubos, desprezou-se o sobrenadante e adicionou-se uma solução hipotônica (KCl), deixando 30 minutos em estufa, sendo essa a etapa que provoca a lise da membrana plasmática dos leucócitos. Após esse tempo, adicionou-se o fixador (metanol e ácido acético, na proporção 3:1), sendo a etapa de pré-fixação. Confirmada o bom resultado da cultura, foram pingadas lâminas por paciente. As lâminas ficaram armazenadas em geladeira por 1 semana para posterior realização da técnica de bandeamento G e C.

O processo analítico realizado pelo Laboratório Genos consistiu na análise de 20 células, sendo 10 cariotipadas com o suporte do software Geneall e 10 contadas pela equipe de citogeneticistas.

4.4 ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA POR PCR EM TEMPO REAL

Todo o volume remanescente do sêmen não utilizado para análise do espermograma, foi ressuspêndido em PBS1x à 37°C, centrifugado e o *pellet* formado foi novamente ressuspêndido em PBS1x à 37°C, homogeneizado e centrifugado. O *pellet* formado foi ressuspêndido em RNAlater, homogeneizado, armazenado a -4°C por 24 horas e, posteriormente, à -20°C até o momento do uso.

O RNA total foi extraído das amostras utilizando o Kit miRNeasy® Mini Kit (QIAGEN - Cat Nº 217004), segundo instruções do fabricante. Todas as amostras foram tratadas com RNase-FreeDNase set (QIAGEN, Alemanha) como determinado pelo fabricante. A concentração de RNA de cada amostra e a razão de absorbância (A260/A280) foram medidas pelo equipamento NanoDrop 2000 (spectrophotometer ND – 2000 – NANODROP, EUA) e somente amostras com valor de razão entre 1,85 e 2,2 foram utilizadas. A integridade das amostras foi mensurada pelo equipamento Bioanalyzer Agilent 2100 e apenas amostras com RIM superior a 5 foram utilizadas.

A síntese do DNA complementar (cDNA) a partir do RNA total foi realizada utilizando os kits: High-CapacitycDNA Reverse Transcription Kits e TaqMan® MicroRNA Reverse Transcription Kit, (Applied Biosystems™, EUA), segundo protocolo estabelecido pelo fabricante.

Após ajuste das concentrações de RNA e síntese do cDNA, a reação de PCR quantitativa (qPCR) foi realizada no equipamento ABI Prism 7500 Fast Sequence Detection System, utilizando ensaio de expressão gênica TaqMan e sondas específicas.

A quantificação relativa da expressão é calculada usando o método $2^{-\Delta\Delta Ct}$ de acordo com Livak and Schmittgen (2001).

Para a análise da expressão do RNAm foram utilizados os ensaios para detecção e quantificação dos seguintes genes de interesse: (a) *Hsd/Aep1*; (b) *Vcp*; (c) *Dmrt1*; (d) *Hsd17b3/Spata*; (e) *Nr5a1* (Applied Biosystems). O gene constitutivo para normalização dos RQs dos genes de interesse analisados no presente projeto foi o *Hprt1*, segundo Eghbali *et al.* (2014).

A análise estatística para os resultados de expressão dos genes entre os grupos foi realizada pelo teste de Kruskal-Wallis ANOVA. As análises foram realizadas utilizando o software StatSoft, Inc. (2011). STATISTICA (data analysis software system), version 10. As análises estatísticas foram baseadas em Zar (1999) e a diferença estatística foi considerada quando $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 ANÁLISE EXPLORATÓRIA DO QUESTIONÁRIO DE HÁBITOS DE VIDA

Para termos um panorama geral do histórico reprodutivo bem como dos hábitos de vida dos participantes de estudo, distribuídos em seus respectivos grupos de estudo, (n=21), analisamos as respostas dadas ao instrumento ‘Questionário de Levantamento de Hábitos de Vida’, sendo que as respostas estão distribuídas nas Tabelas 2 e 3. O agrupamento de dados nestas tabelas segue a seguinte ordem: (a) histórico relativo à atividade sexual do casal (Tabela 2) e (b) histórico de doenças prévias e hábitos de vida do casal (Tabela 3). As respostas consideradas importantes nas tabelas foram as que apareceram em frequência maior que 75%, estando assim destacadas com a coloração cinza escuro para a representação dos resultados dos grupos que estavam sendo considerados (GC, GO ou GH). Algumas respostas que apareceram em frequências entre 65% e 74%, destacadas em coloração cinza claro, foram marcadas como resultados potencialmente relevantes para fins interpretativos.

A primeira evidencia observada foi que a maioria dos casais que estão tentando engravidar apontam baixa frequência sexual, sendo esta observação mais evidente no grupo GO, onde é possível observar baixas práticas sexuais programadas o que pode comprometer a taxa de fertilização nesse grupo de indivíduos possui alterações espermáticas. Há um consenso de que a taxa de fecundidade do ovócito cai drasticamente a partir do dia da ovulação, sendo que uma janela de 5 dias antes da ovulação é altamente propícia para a fecundação. Casais que planejam as relações sexuais somente quando identificam os sinais de ovulação podem comprometer de maneira severa as chances de fertilização, baseado nas evidências da alta taxa de sobrevivência de espermatozoides viáveis no trato reprodutivo feminino por pelo menos 5 dias após ser ejaculado (WILCOX *et al.*, 1995). Todos os outros dados avaliados na Tabela 2 não apontam correlação entre histórico reprodutivo do casal com os problemas de fertilidade que estão tentando solucionar.

Em relação histórico de doenças prévias e hábitos de vida do casal, apresentados na Tabela 3, indivíduos de todos os grupos comem poucos vegetais e frutas, indicando assim uma má qualidade de alimentação, a qual é um fator de extrema importância quando associada a fertilidade masculina (CARSON; KALLEN, 2021). Diversas pesquisas relatam que a alta ingestão de gorduras saturadas e gorduras ômega-3 estão negativamente relacionadas respectivamente à concentração e a morfologia espermática, tendo uma dieta

saudável um potencial positivo na qualidade do sêmen (ATTAMAN *et al.*, 2012; GIAHI *et al.*, 2015).

Tabela 2: Levantamento do histórico relativo à atividade sexual do casal e saúde reprodutiva masculina, dos indivíduos integrantes dos respectivos grupos de estudo deste trabalho.

Questões	Respostas	GC (n=7)		GO (n=10)		GH (n=4)	
		(n)	%	(n)	%	(n)	%
Qual é a frequência de sua atividade sexual?	↑ 1x por semana	6	86	3	30	2	50
	1x por semana	1	14	5	50	2	50
	Quinzenal	0	0	1	0	0	0
	Mensal	0	0	1	0	0	0
Está a mais de um ano tentando ter um filho com sua companheira praticando sexo sem proteção?	Sim	5	71	8	80	3	75
	Não	2	29	2	20	1	25
Praticam sexo programado?	Sim	1	14	5	50	1	50
	Não	6	86	5	50	3	75
Tem problemas de ereção ou ejaculação?	Sim	0	0	1	10	1	50
	Não	7	100	9	90	3	75
Submeteu-se a alguma operação por testículos não descidos?	Sim	1	14	0	0	0	0
	Não	6	86	10	100	4	100
Submeteu-se a alguma técnica de extração espermática epididimal ou testicular (TESE; microTESE)?	Sim	0	0	0	0	0	0
	Não	7	100	10	100	4	100
Já contraiu algum tipo de DST (doenças sexualmente transmissíveis)?	Sim	0	0	0	0	0	0
	Não	7	100	10	100	4	100
Submeteu-se a alguma reversão de vasectomia?	Sim	0	0	0	0	0	0
	Não	7	100	10	100	4	100

Nota: GC = Grupo controle (sem alterações seminais e sem aumento de heterocromatina no cromossomo 9); GO = Grupo Oligozoospermia (oligozoospermia confirmada por espermograma e sem aumento de heterocromatina no cromossomo 9); GH = Grupo Heterocromatina (aumento da área de heterocromatina do cromossomo 9 confirmada por cariótipo e com ou sem oligozoospermia confirmada por espermograma).

Fonte: Elaborada pela autora.

Quanto a saúde dos indivíduos, o grupo GO tem um grande histórico de colesterol familiar (80%) e o grupo GH uma tendência de aumento, pois pelo menos metade do grupo apresenta o determinado histórico (Tabela 3). Em homens, o metabolismo do colesterol é fundamental para funções testiculares e quando há níveis alterados pode haver baixos níveis de testosterona e até infertilidade (DIMOPOULOU *et al.*, 2018; SÈDES *et al.*, 2018).

Tabela 3: Levantamento do histórico de doenças prévias e hábitos de vida do casal, dos indivíduos integrantes dos respectivos grupos de estudo deste trabalho.

Questões	Respostas	GC (n=7)		GO (n=10)		GH (n=4)	
		(n)	%	(n)	%	(n)	%
Toma medicação de forma regular?	Sim	1	14	1	10	2	50
	Não	6	86	9	90	2	50
Sofre de alguma doença como diabetes ou hipertensão?	Sim	0	0	1	10	2	50
	Não	7	100	9	90	2	50
Trabalha num local muito quente ou está em contato frequente com materiais tóxicos?	Sim	1	14	1	10	2	50
	Não	6	86	9	90	2	50
Você afirmaria que sua principal atividade remunerada é exercida em turnos ou em período noturno?	Sim	0	0	2	20	0	0
	Não	7	100	8	80	4	100
Tem uma alimentação saudável?	Sim	5	71	5	50	2	50
	Não	2	29	5	50	2	50
Come menos de cinco unidades de frutas ou verduras por dia?	Sim	6	86	10	100	4	100
	Não	1	14	0	0	0	0
Bebe menos de 1 litro de água por dia, sem contar com chás e café?	Sim	2	29	3	30	1	25
	Não	5	71	7	70	3	75
Faz dieta para controlar o peso?	Sim	4	57	2	20	1	25
	Não	3	43	8	80	3	75

Tabela 3: Levantamento do histórico de doenças prévias e hábitos de vida do casal, dos indivíduos integrantes dos respectivos grupos de estudo deste trabalho.

Quantas refeições você realiza por dia?	↑ 3 refeições	2	29	5	50	0	0
	3 refeições	5	71	5	50	4	100
Você ou alguém em sua família (pai, mãe, irmãos, avós) possui colesterol elevado?	Sim	4	58	8	80	1	25
	Não	3	42	2	20	3	75
Você pratica exercício físico?	Sim	7	100	7	70	2	50
	Não	0	0	3	30	2	50
Você fuma?	Sim	0	0	3	30	0	0
	Não	7	100	7	70	4	100
Faz uso de drogas ilícitas?	Sim	0	0	2	20	0	0
	Não	7	100	8	80	4	100
Você ingere bebida alcoólica? Se sim, qual a frequência?	Diária	0	0	1	10	0	0
	Semanal	2	29	7	70	1	25
	Quinzenal	2	29	1	10	1	25
	Mensal	1	14	0	0	1	25
	Não ingiro	2	29	1	10	1	25
Você dorme em média quantas horas diariamente?	↓ 5 horas	0	0	1	10	0	0
	Entre 5 e 7 horas	4	58	6	60	4	100
	Entre 7 e 9 horas	3	43	3	30	0	0
	Entre 22h e 7h	4	58	5	50	2	50
Essas horas de sono são gozadas preferencialmente em que período do dia?	Entre 24h e 9h	2	29	5	50	2	50
	Outro	1	14	0	0	0	0

Nota: GC = Grupo controle (sem alterações seminais e sem aumento de heterocromatina no cromossomo 9); GO = Grupo Oligozoospermia (oligozoospermia confirmada por espermograma e sem aumento de heterocromatina no cromossomo 9); GH = Grupo Heterocromatina (aumento da área de heterocromatina do cromossomo 9 confirmada por cariótipo e com ou sem oligozoospermia confirmada por espermograma).

Fonte: Elaborado pela autora.

Além disso, metade do grupo com o aumento da heterocromatina no cromossomo 9 (GH) faz uso frequente de medicação regulada, trabalha em locais quentes e/ou com exposição a produtos tóxicos, dorme menos horas do que o recomendado, não pratica atividade física e possui incidência de diabetes e/ou hipertensão, sendo que todas essas informações podem estar relacionadas com a produção de infertilidade nos homens deste grupo (CARSON; KALLEN, 2021). Além disso, esses resultados sugerem uma possível relação entre a exposição a alguns estressores ambientais/fisiológicos com a produção das alterações epigenéticas, e consequente aumento da área de heterocromatina do cromossomo 9, que podem levar a redução de fertilidade em indivíduos a elas expostos (BECKER *et al.*, 2016; CAVALIERI; SPINELLI, 2017; SKINNER, 2014).

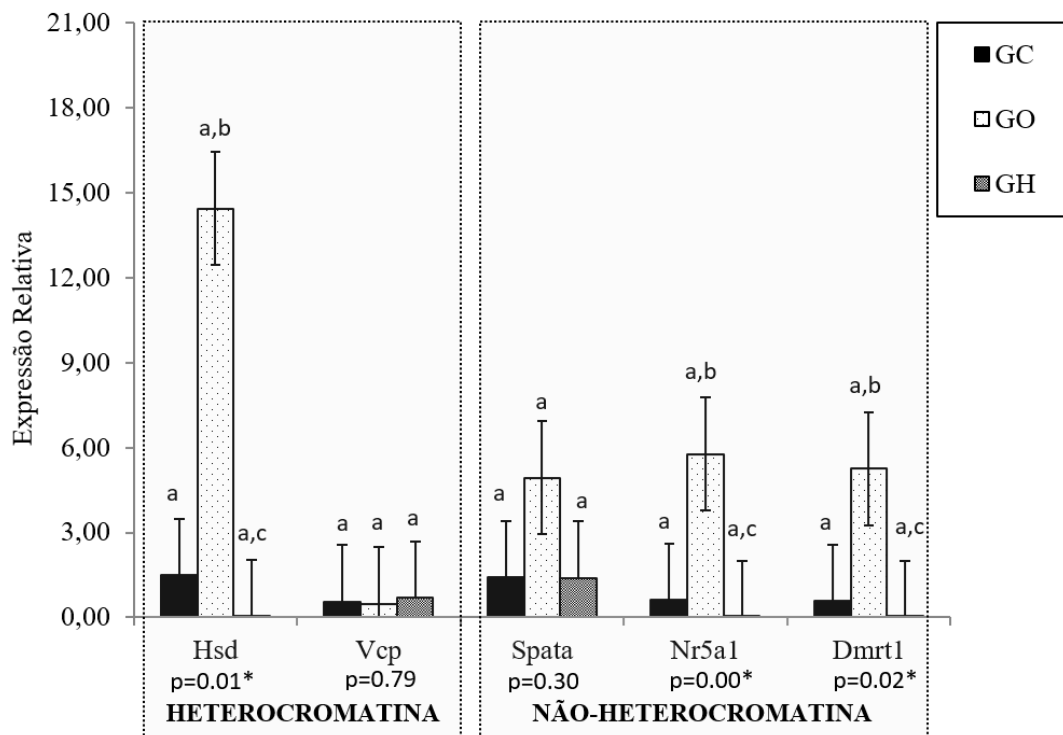
5.2 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE GENES LOCALIZADOS DENTRO E FORA DA REGIÃO DA HETEROCROMATINA

A expressão gênica relativa dos genes que estão localizados na região da heterocromatina do cromossomo 9 (*Vcp* e *Hsd/Aep1*) e a expressão de genes fora da região heterocromática (*Spata/Hsd17b13*, *Nr5a1* e *Dmrt1*) foram detectadas em amostras de sêmen de todos os pacientes dos grupos GC (n= 7), GO (n= 10) e GH (n= 4), pela técnica de RT-PCR e os resultados estão demonstrados na Figura 1.

Em relação ao gene *Hsd/Aep1* encontrado na região heterocromatina, foi possível observar um aumento expressivo em sua expressão no grupo GO associada a uma redução expressiva (praticamente silenciamento gênico) no grupo GH (Figura 1). O gene *Hsd/Aep1*, também conhecido como, *Spata31A7*, *C9orf36*, *Fam75A4*, *Fam75A7*, *C9orf36A*, *Spata31A4*, foi o primeiro isolado de um modelo de ratos com deficiência de vitamina A (VAD) tratado com retinol. O produto deste gene encontra-se expresso na região acrossomal das espermatídes a partir do 25º dia pós-natal. A imunorreatividade está presente em espermatídes e espermatozoides de ratos, humanos, macacos e suínos, o que sugere sua participação na formação do acrossomo. (ZUO *et al.*, 2010; LUK *et al.*, 2006). A proteína *Aep1* também pode estar ligada à espermatogênese que é regulada por fatores específicos e mecanismos mediados por um conjunto de proteínas e fatores transcricionais que necessitam amplo controle molecular (KIMMINS *et al.*, 2004; MATZUK; LAMB, 2002). Portanto, o desbalanço não equivalente na expressão desse gene observado nos grupos GO e GH podem estar associados com problemas de fertilidade experienciados por esses grupos. No grupo GH, o aumento da heterocromatina, provavelmente provocado por hábitos de vida (como demonstrado na análise exploratória anterior para esse grupo) podem ter causado o silenciamento desse gene.

Todavia, a análise da expressão pertencente ao gene *Vcp* não apresentou diferenças estatísticas significantes entres os grupos analisados (Figura 1). O gene *Vcp*, também conhecido como *p97*; *Tera*; *Cdc48* fornece instruções para fazer uma enzima chamada valosina. Esta proteína codificada é encontrada em todo o corpo e desempenha uma grande variedade de funções dentro das células, como um papel na degradação de proteínas, fusão de membranas intracelulares, reparo e replicação de DNA, regulação do ciclo celular e ativação da via NF-kappa B, forma um complexo homohexamérico que interage com uma variedade de co-fatores e extrai proteínas ubiquitinadas de membranas lipídicas ou complexos proteicos. (NCBI Gene, 2018a). Este gene também regula o nível de proteínas envolvidas em várias atividades de células críticas, tais como o tempo de divisão celular e crescimento. Porém, a expressão relativa deste gene não parece produzir efeitos sobre as variáveis analisadas no presente estudo.

Figura 2: Representação da expressão gênica relativa, obtida por PCR-RT, dos respectivos grupos de estudo deste trabalho.



Notas: GC = Grupo controle (sem alterações seminais e sem aumento de heterocromatina no cromossomo 9); GO = Grupo Oligozoospermia (oligozoospermia confirmada por espermograma e sem aumento de heterocromatina no cromossomo 9); GH = Grupo Heterocromatina (aumento da área de heterocromatina do cromossomo 9 confirmada por cariótipo e com ou sem oligozoospermia confirmada por espermograma).

Fonte: Elaborado pela autora.

Quanto aos genes que não fazem parte da heterocromatina, nota-se que o gene *Spata/Hsd17b3* não apresentou uma diferença estatística significativa em sua expressão relativa quando os três grupos foram comparados, mas por outro lado os outros dois genes, *Nr5a1* e *Dmrt1*, apresentaram o mesmo padrão de expressão do gene *Hsd/Aep1* descrito anteriormente, onde o grupo GO teve um brusco aumento de expressão comparado com uma importante redução de expressão (praticamente silenciamento gênico) no grupo GH (Figura 1).

O gene *Hsd17b3/Spata*, também conhecido como *Edh17b3* ou *Sdr12c2*, cuja expressão não foi encontrada alterada entre os grupos do presente estudo, está relacionado com pseudohermafroditismo masculino, com ginecomastia. (HUMPHRAY *et al.*, 2004). Uma de suas isoformas de 17 beta-hidroxiesteróide desidrogenase é expressa predominantemente nos testículos e catalisa a conversão de androstenediona em testosterona, portanto amplamente associado com determinação de fertilidade. (NCBI Gene, 2018c).

Entre os genes que não estão localizados na região de heterocromatina e que foram encontrados diferencialmente expressos neste estudo, o *Dmrt1*, conhecido também como *Dmt1* ou *Ct154*, codifica outro fator de transcrição que desempenha um papel fundamental na diferenciação testicular e é expresso principalmente nos testículos. *Dmrt1* bloqueia a via meiótica de células germinativas masculinas e faz com que células germinativas masculinas sofram mitose. (MATSON *et al.*, 2010). Deleções do braço curto do cromossomo 9, incluindo a *Dmrt1*, são bem conhecidas por estarem associadas à síndrome de deleção 9p e à disgenesia gonadal XY. Este gene é encontrado em um cluster com dois outros membros da família de genes, tendo em comum um motivo de ligação de DNA semelhante a um dedo de zinco (domínio DM). (TÜTTELMANN; RUCKERT; RÖPKE, 2018). Este gene exibe um padrão de expressão específico de gônadas e sexualmente dimórfico. O desenvolvimento testicular defeituoso e a feminização XY ocorrem quando esse gene é hemizigoto. (NCBI Gene, 2018b).

Já o gene *Nr5a1* (*Elp; Sfl; Ftz1; Pof7; Sf-1; Ad4bp; Ftzfl; Spgf8; Srxx4; Srx3; hSF-1*), subfamília 5 do receptor nuclear, grupo A, membro 1, OMIM 184757, codifica a proteína 1 do fator esteroideogênico (SF1) que é um ativador transcricional envolvido na determinação do sexo, participando da regulação da determinação e diferenciação do sexo, descendência testicular. (TÜTTELMANN; RUCKERT; RÖPKE, 2018). A proteína codificada liga o DNA como um monômero. Além disso, estudos demonstram que defeitos neste gene é uma causa

de reversão sexual XY com ou sem insuficiência adrenal, bem como insuficiência adrenocortical sem defeito ovariano, portanto, associadas com formas graves de infertilidade masculina. (FERLIN *et al.*, 2015).

Nossos resultados não nos permitem afirmar que a baixa expressão de *Dmrt1* e de *Nr5a1* em amostras seminais dos indivíduos do grupo GH esteja diretamente relacionada com o processo de heterocromatinização do cromossomo 9, visto que os mesmos não se encontram localizados em regiões de aumento de heterocromatina. Porém, a relativa alta frequência da existência de fatores como histórico de atividade laboral em locais quentes e/ou com exposição a produtos tóxicos, pequena quantidade de horas diárias de sono, falta de prática de atividade física regular, maior incidência de diabetes e/ou hipertensão, associada a maus hábitos alimentares, que são todos fatores associados à produção de modificações epigenéticas, além de fatores comprometedores de fertilidade, pode ser indicativo dos mecanismos fisiológicos que estão sendo observados neste grupo. Além do mais, sugerimos a investigação de que se algum gene presente na região de heterocromatina aumentada pode ser um agente promotor da transcrição de *Dmrt1* e de *Nr5a1*, cuja ausência também poderia explicar a redução da expressão dos mesmos.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Com base nas evidências relatadas nesse trabalho é possível observar que indivíduos com oligozoospermia que procuraram o serviço de reprodução assistida possuem em seu histórico fatores que comprometem a qualidade do processo reprodutivo como maus hábitos alimentares, histórico familiar de elevação de colesterol, alta frequência de ingestão de bebida alcoólica que associados com uma elevada expressão dos genes *Hsd17b3/Spata*, *Dmrt1* e *Nr5a1*, localizados no cromossomo 9 e com a baixa frequência de atividade sexual, podem explicar a problemas de fertilidade enfrentados por esses indivíduos.

Já em relação a indivíduos que procuraram o mesmo serviço, que apresentavam ou não oligozoospermia, mas que tiveram um diagnóstico de aumento de regiões de heterocromatina no cromossomo 9 foi possível observar uma associação com hábitos e históricos mais fortemente associados com determinação de fertilidade como atividade laboral em locais quentes e/ou com exposição a produtos tóxicos, pequena quantidade de horas diárias de sono, falta de prática de atividade física regular, maior incidência de diabetes e/ou hipertensão e prevalência de maus hábitos alimentares. Esses indivíduos também apresentaram uma drástica redução na expressão dos genes *Hsd17b3/Spata*, *Dmrt1* e *Nr5a1*, localizados no cromossomo 9. Essa redução de expressão pode ser explicada pelo aumento da área de heterocromatina para o gene *Hsd17b3/Spata*, que se localiza na região heterocromática, porém não diretamente para os demais.

Conclui-se, portanto, que a fertilidade é uma característica multifatorial e que investigações de causas de infertilidade devem levar em consideração aspectos genéticos/epigenéticos, ambientais, fisiológicos e comportamentais para a escolha da melhor abordagem de intervenção na busca da concepção natural ou assistida.

REFERÊNCIAS

ABREU, L. S. de; SARTORELLI, E. M. P.; PEREIRA, E. T. Citogenética de casais inférteis. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, Florianópolis, v. 37, n. 1, p. 11-17, jan. 2008. Disponível em: <http://www.acm.org.br/revista/pdf/artigos/529.pdf>. Acesso em: 10 maio 2022.

ALVAREZ, J.D. *et al.* The Circadian Clock Protein BMAL1 Is Necessary for Fertility and Proper Testosterone Production in Mice. **Journal Of Biological Rhythms**, [s.l.], v. 23, n. 1, p. 26-36, Feb. 2008. Disponível em: <http://doi.org/10.1177/0748730407311254>. Acesso em: 09 jul. 2022.

ALVES, R. Z. *et al.* Alterações citogenéticas associadas a infertilidade humana/Cytogenetic alterations associated with human infertility. **Brazilian Applied Science Review**, Curitiba, v. 5, n. 1, p. 542-557, 2021. Disponível em: <http://doi.org/10.34115/basrv5n1-034>. Acesso em: 15 ago. 2022.

ANTONELLI, A. *et al.* Chromosomal alterations and male infertility. **Journal Of Endocrinological Investigation**, Milan, v. 23, p. 677-683. 2000. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s40618-022-01819-1>. Acesso em: 31 Jan. 2022.

ARRUDA, C. P.; LIMA, M. T. A. O fruto inatingível: uma análise simbólica da infertilidade masculina. **O Mundo da Saúde**, São Paulo, v. 36, n. 2, p. 284-290. 2012. Disponível em: <https://revistamundodasaude.emnuvens.com.br/mundodasaude/article/view/493/434>. Acesso em: 18 mai. 2022.

ATTAMAN, *et al.* Dietary fat and semen quality among men attending a fertility clinic. **Human Reproduction**, Oxford, v. 27, n. 5, p.1466–1474, 2012. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/humrep/des065>. Acesso em: 22 Jun. 2022.

BARROS, B. M.; SANTOS, T. S. dos; CARVALHO, C. de. Infertilidade Masculina de Origem Genética: uma revisão sistemática. **Revista Ciência e Saúde**, Pindamonhangaba, v. 5, n. 2, p. 20-27. 2020. Disponível em: <https://www.revistaeletronicafunvic.org/index.php/c14ffd10/article/view/181/158>. Acesso em: 7 set. 2022.

BECKER, B. J., MCCLELLAN M. L., REED, B. G. Sex differences, gender and addiction. **Journal Neuroscience Research**, [s.l.], v. 95, p. 136-147. 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/jnr.23963>. Acesso em: 5 mar. 2022.

BORGHT, M. V.; WYNS, C. Fertility and infertility: Definition and epidemiology. **Elsevier**, [s.l.], v. 62, n. 1, p. 2-10, mar. 2018. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0009912018302200?via%3Dihub>. Acesso em: 5 abr. 2022.

BROGLIA, V. G. *et al.* Polimorfismos con valor selectivo en ambientes de altura. **Lhawet: Nuestro entorno**, Salta, v. 1, n. 1, p. 30-33, dez. 2011. Disponível em: http://eprints.natura.unsa.edu.ar/626/1/Brogliia_Polimorfismos_con_valor_selectivo.pdf. Acesso em: 10 fev. 2022.

CARSON, S. A.; KALLEN, A. N. Diagnosis and Management of Infertility: A Review. **JAMA**, Chicago, v. 326, n. 1, p. 65-76, Jul. 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1001/jama.2021.4788>. Acesso em: 01 out. 2022.

CAVALIERI, V.; GERACI, F.; SPINELLI, G. Diversification of spatiotemporal expression and copy number variation of the echinoid *hbox12/pmar1/micro1* multigene family. **PloS one**, San Francisco, v. 12, n. 3, p. e0174404, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0174404>. Acesso em: 3 nov. 2022.

DEJARDIN, J. Switching between epigenetic states at pericentromeric heterochromatin. *In*: Elsevier Inc. **Trends in genetics**, [s.l.], v. 31, n. 11, p. 661-672, 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tig.2015.09.003>. Acesso em: 9 out. 2022.

DIMOPOULOU, C.; GOULID, D.G.; CORONA, G.; MAGGI, M. The complex association between metabolic syndrome and male hypogonadism. **Male Reproductive Endocrinology**, *In*: Elsevier Inc. Amsterdam, v. 86, p. 61-68, 2018. Disponível em: <https://doi:10.1016/j.metabol.2018.03.024>. Acesso em: 20 jul. 2022.

DMRT1 PROTEIN EXPRESSION SUMMARY. *In*: **The Human Protein Atlas**, Stockholm: Knut & Alice Wallenberg Foundation, [2022]. Disponível em: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000137090-DMRT1>. Acesso em: 29 out. 2022.

FEIJÓ, C. M. *et al.* Espermograma. *In*: DZIK, Artur *et al.* **Atlas de Reprodução Humana**, Campinas, 2012. Cap. 4. p. 45-54. Disponível em: <https://androfert.com.br/arquivos/Espermograma.pdf>. Acesso em: 14 jan. 2022.

FERLIN, A. *et al.* Mutational screening of NR5A1 gene encoding steroidogenic factor 1 in cryptorchidism and male factor infertility and functional analysis of seven undescribed mutations. *In*: Elsevier Inc. **Fertility And Sterility**, Amsterdam, v. 104, n. 1, p. 163-169, Jul. 2015. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.04.017>. Acesso em: 29 out. 2022.

GARTENBERG, Marc. Heterochromatin and the cohesion of sister chromatids. *In*: Springer. **Chromosome Research**, [s.l.], v. 17, n. 2, p. 229-238, Feb. 2009. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1007/s10577-008-9012-z>. Acesso em: 28 jul. 2022.

GIAHI, L., MOHAMMADMORADI, S., JAVIDAN, A., SADEGHI, M. Nutritional modifications in male infertility: a systematic review covering 2 decades. **Nutrition Reviews**, Oxford, v. 74, ed. 2, p. 118–130, 2015. Disponível em: <https://doi: 10.1093/nutrit/nuv059>. Acesso em: 06 ago. 2022.

GRIFFITHS, A. J. F. *et al.* **Introdução à Genética**. 9. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

HSD17B3 PROTEIN EXPRESSION SUMMARY. *In*: **The Human Protein Atlas**. Stockholm: Knut & Alice Wallenberg Foundation, [2022]. Disponível em: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000130948-HSD17B3>. Acesso em: 29 out. 2022.

HUMPHRAY, S. J. *et al.* DNA sequence and analysis of human chromosome 9. *In: Springer Nature. Nature*, [s.l.], v. 429, p. 369-374, 27 maio 2004. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nature02465>. Acesso em: 9 mar. 2022.

Jl, F. Y. *et al.* Ag-staining pattern, FISH and ISH with rDNA probes in the rice field eel (*Monopterus albus* Zuiew) chromosomes. *Hereditas*, [s.l.], v. 138, n. 3, p. 207-212, 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1034/j.1601-5223.2003.01643.x>. Acesso em: 22 abr. 2022.

KRAUSZ, C.; CIOPPI, F.; RIERA-ESCAMILLA, A. Testing for genetic contributions to infertility: potential clinical impact. *In: Taylor & Francis Group, Expert Review Of Molecular Diagnostics*, [s.l.], mar. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1080/14737159.2018.1453358>. Acesso em: 4 mar. 2022.

LOPES, Rafaella Duarte. **Aspéctos genéticos da infertilidade masculina**. 2015. 21 f. Graduação (Bacharelado em Biomedicina) - Centro Universitário de Brasília, Brasília, 2015.

MATSON, C. K. *et al.* The mammalian doublesex homolog DMRT1 is a transcriptional gatekeeper that controls the mitosis versus meiosis decision in male germ cells. *In: Elsevier Inc. Dev Cell*, Amsterdam, v.19, p.612–624, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2010.09.010>. Acesso em: 02 mai. 2022.

MUSTACCHI, Z.; PERES, S. *Genética baseada em evidências: síndromes e heranças*. 1. ed. **Cid Editora**, 2000.

PARNELL, L. D., ORDOVAS, J. M., LAI, C. Environmental and epigenetic regulation of postprandial lipemia. *In: BioMed Central. Nutrition and metabolism*, [s.l.], v. 28, n.00, p. 1-6, 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1097/MOL.0000000000000469>. Acesso em: 6 nov. 2022.

PASQUALOTTO, F. F. Investigação e reprodução assistida no tratamento da infertilidade masculina. *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia*, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 103-112. 2007. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S0100-72032007000200008>. Acesso em: 12 mar. 2022.

PEREIRA, D. S.; TUFIK, S.; PEDRAZZOLI, M. Moléculas que marcam o tempo: implicações para os fenótipos circadianos. *Revista Brasileira de Psiquiatria*, São Paulo, v. 31, n. 1, p. 63-71. 2009. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/S1516-44462009000100015>. Acesso em: 25 abr. 2022.

PERUQUETTI, R. L.; MATEO, S. de; SASSONE-CORSI, P. Circadian Proteins CLOCK and BMAL1 in the Chromatoid Body, a RNA Processing Granule of Male Germ Cells. *Plos One*, San Francisco, v. 7, n. 8, p. 1-10, 10 Aug. 2012. Public Library of Science (PLoS). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0042695>. Acesso em: 3 abr. 2022.

SAHIN, F. I. *et al.* Chromosome heteromorphisms: an impact on infertility. *In: Springer. Journal Of Assisted Reproduction And Genetics*, [s.l.], v. 25, n. 5, p. 191-195, May. 2008. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s10815-008-9216-3>. Acesso em: 08 nov. 2022.

SANTOS, F. H. dos; ANDRADE, V. M.; BUENO, O. F. A. Envelhecimento: um processo multifatorial. **Psicologia em Estudo**, Maringá, v. 14, n. 1, p. 3-10, jan./mar. 2009. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/pe/a/FmvzytBwzYqPBv6x6sMzXFq/?format=pdf&lang=pt>. Acesso em: 27 nov. 2022.

SANTOS, T. R. M. *et al.* Considerações sobre infertilidade masculina. **Ciências Biológicas e da Saúde**, Aracaju, v. 1, n. 16, p. 21-26, mar. 2013. Cadernos de Graduação. Disponível em: <https://periodicos.set.edu.br/cadernobiologicas/article/view/254/280>. Acesso em: 19 abr. 2022.

SÈDES, L.; THIROUARD, L.; MAQDASY, S.; GARCIA, M.; CAIRA, F.; LOBACCARO, J.A.; BEAUDOIN, C.; VOLLE, D.H. Cholesterol: A Gatekeeper of Male Fertility?. **Frontiers in Endocrinology**, [s.l.] v. 9, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fendo.2018.00369>. Acesso em: 18 nov. 2022.

SILVA, L. F. *et al.* Idade masculina: qualidade do sêmen e fertilidade. **Jornal Brasileiro de Reprodução Assistida**, Brasília, v. 16, n. 3, p. 91-95, jan. 2012. Disponível em: https://www.researchgate.net/profile/Joao-Oliveira-68/publication/287324912_Male_age_Semen_quality_and_fertility_Age_X_male_semen_quality/links/5ffe0f29299bf140888f8668/Male-age-Semen-quality-and-fertility-Age-X-male-semen-quality.pdf. Acesso em: 5 set. 2022.

SILVA, T. da; MELLO, M. P. de; SCALLET, H.; MELLO, M. de. Busca de novas variantes no gene HSD17B3 em pacientes com distúrbios da diferenciação do sexo. **Revista dos Trabalhos de Iniciação Científica da Unicamp**, Campinas, v. 27. 30 nov. 2019. Universidade Estadual de Campinas. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.20396/revpibic2720192319>. Acesso em: 29 out. 2022.

TÜTTELMANN, F.; RUCKERT, C.; RÖPKE, A. Disorders of spermatogenesis: Perspectives for novel genetic diagnostics after 20 years of unchanged routine. **Medizinische Genetik**, [s.l.], Feb. 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s11825-018-0181-7>. Acesso em: 27 set. 2022.

VALADARES, B. L. B.; ARAUJO, E. D. de; PANTALEÃO, S. de M. **Genética Básica**. São Cristóvão. In: Universidade Federal de Sergipe, 2011. 16 p. Núcleo de Material Didático. Disponível em: https://cesad.ufs.br/ORBI/public/uploadCatalogo/15350516022012Genetica_Basica_Aula_1.pdf. Acesso em: 21 nov. 2022.

VCP PROTEIN EXPRESSION SUMMARY. In: **The Human Protein Atlas**. Stockholm: Knut & Alice Wallenberg Foundation, [2022]. Disponível em: <https://www.proteinatlas.org/ENSG00000165280-VCP>. Acesso em: 29 out. 2022.

VITATERNA, M. H.; TAKAHASHI, J. S.; TUREK, F. W. Overview of Circadian Rhythms. **Alcohol Research & Health**, Washington, v. 25, n. 2, p. 85-93. 2001. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6707128/pdf/arcr-25-2-85.pdf>. Acesso em: 6 ago. 2022.

WALTON, E. L., FRANCASTEL, C., VELASCO, G. Dnmt3b prefers germ line genes and centromeric regions: lessons from the icf syndrome and cancer and implications for diseases. **Biology**, Basel, v. 3, p. 578-605, 2014. Disponível em: <https://doi.org/10.3390/biology3030578>. Acesso em: 20 jan. 2022.

WILCOX A. J., WEINBERG C. R., BAIRD D. D. Timing of sexual intercourse in relation to ovulation. Effects on the probability of conception, survival of the pregnancy, and sex of the baby. **N Engl J Med**. Massachusetts. v. 333, n. 23, p. 1517-1521. 7 Dec. 1995. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1056/NEJM199512073332301>. Acesso em: 3 ago. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Infertility. **WHO**, Geneva, 2020. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/infertility>. Acesso em: 15 jan. 2022.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Laboratory Manual for the Examination of Human Semen. 5. ed. **WHO**, Geneva, 2010. Disponível em: https://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44261/9789241547789_eng.pdf?sequence=1&isAllowed=y. Acesso em: 2 jun. 2022.

APÊNDICE

APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Conselho Nacional de Saúde, Resolução CNS 466/12)

Você está sendo convidado a participar como voluntário do projeto de pesquisa “**RELAÇÃO ENTRE O AUMENTO DA REGIÃO DE HETEROCROMATINA DO CROMOSSOMO 9 E A INFERTILIDADE MASCULINA**”, sob responsabilidade da pesquisadora Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti, e das discentes Renata Pereira de Amorim (Mestranda do Programa de Pós-graduação em Odontologia – Saúde Coletiva) e Amanda Gonçalves Martins da Costa (Graduanda em Biomedicina).

O principal objetivo deste trabalho será encontrar algumas alterações cromossômicas (ou genéticas) que podem estar relacionadas com a redução da produção de espermatozoides e, conseqüentemente, comprometer o processo de reprodução em humanos. Também será objetivo deste estudo avaliar se fatores ambientais condicionados pelos hábitos de vida de cada participante (hábitos de alimentação, rotina de sono diária, tabagismo, alcoolismo, prática de atividade física, etc) podem ter relação com essas alterações genéticas, ou com outros fatores da vida sexual, sendo uma das causas da infertilidade detectada.

Você poderá consultar as pesquisadoras responsáveis em qualquer época, pessoalmente ou pelo telefone da Instituição, para esclarecimento de qualquer dúvida. Você está livre para, a qualquer momento, deixar de participar da pesquisa. Todas as informações por você fornecidas e os resultados obtidos só serão utilizados para divulgação em reuniões e revistas científicas, e sua identidade NUNCA será divulgada, ou seja, todas as amostras utilizadas no presente projeto são ANÔNIMAS. Você será informado de todos os resultados obtidos, independentemente do fato destes poderem mudar seu consentimento em participar da pesquisa. Você não terá quaisquer benefícios ou direitos financeiros sobre os eventuais resultados decorrentes da pesquisa. O material biológico cedido será armazenado e você poderá ser chamado para dar a sua autorização para novo(s) projeto(s). Caso isso seja impossível, seu material biológico somente será utilizado mediante aprovação pelo CEP ou pela CONEP, em cumprimento à Resolução CNS 466/12. (*caso envolva armazenamento de material biológico*). Não haverá risco algum referente à pesquisa e o estudo contribuirá na prevenção e no tratamento de homens inférteis

Diante das explicações, se você concorda em participar deste projeto, coloque sua assinatura a seguir e forneça os dados solicitados.

Nome: _____ R.G. _____

Endereço: _____ Fone: _____

_____, _____ de _____ de 20__

Usuário ou responsável legal

Pesquisador responsável

OBS.: Termo apresenta duas vias, uma destinada ao usuário ou seu representante e a outra ao pesquisador

Nome Pesquisador(a): Rita Luiza Peruquetti	Cargo/Função: Professora
Instituição: Universidade do Sagrado Coração (USC)	
Endereço: Rua Irmã Arminda, 10-50, Bloco L, Bauru-SP.	
Projeto submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Sagrado Coração - USC Bauru – fone 14 21077112 Fax: 14 21077254	

APÊNDICE B – Questionário de levantamento de hábitos de vida

Este questionário é destinado ao levantamento de informações dos voluntários participantes do projeto de pesquisa “*RELAÇÃO ENTRE O AUMENTO DA REGIÃO DE HETEROCROMATINA DO CROMOSSOMO 9 E A INFERTILIDADE MASCULINA*”, sob responsabilidade da pesquisadora Profa. Dra. Rita Luiza Peruquetti. Aprovação CEP-USC no. 1.935.805, em 21/02/2017.

ATIVIDADE SEXUAL

1. Qual é a frequência de sua atividade sexual?
2. Mais que 1 vez na semana
 1 vez na semana
 Quinzenal
 Mensal
3. Está a mais de um ano tentando ter um filho com sua companheira praticando sexo sem proteção?
 Sim Não
4. Praticam sexo programado?
 Sim Não
5. Tem problemas de ereção ou ejaculação?
 Sim Não
6. Submeteu-se a alguma operação por testículos não descidos?
 Sim Não
7. Submeteu-se a alguma técnica de extração espermática epididimal ou testicular (TESE; microTESE)?
 Sim Não
8. Já contraiu algum tipo de DST (doenças sexualmente transmissíveis)?
 Sim Não

HÁBITOS DE VIDA

9. Toma medicação de forma regular?
 Sim Não
Qual?.....
10. Sofre de alguma doença como diabetes ou hipertensão?
 Sim Não
Qual?.....
11. Submeteu-se a alguma reversão de vasectomia?
 Sim Não

12. Trabalha num local muito quente ou esta em contato frequente com materiais tóxicos?

13. Você afirmaria que sua principal atividade remunerada é exercida em turnos ou em período noturno?

Sim Não

Se sim, qual o horário de mais frequente em que costuma executar sua atividade laboral?

.....

14. Tem uma alimentação saudável?

Sim Não

15. Come menos de cinco unidades de frutas ou verduras por dia?

Sim Não

16. Bebe menos de 1 litro de água por dia, sem contar com chás e café?

Sim Não

17. Faz dieta para controlar o peso?

Sim Não

18. Quantas refeições você realiza por dia?

3 refeições ou mais e 1 lanche

intermediário 3 refeições

19. Você ou alguém em sua família (pai, mãe, irmãos, avós) possui colesterol elevado?

Sim, eu

Sim, parente

Eu e

familiares

Não

20. Você pratica exercício físico? Se sim, qual?

Não

Sim, esporadicamente

2 a 3 vezes por semana

4 vezes ou mais por semana

19. Você

fuma?

Não

Sim Quantos cigarros por dia?.....

Parei

Fumante passivo

20. Faz uso de drogas ilícitas?

Sim Não

21. Você ingere bebida alcoólica? Se sim, qual a frequência?

Diária

- Semanal
- Quinzenal
- Mensal
- Não ingiro

22. Você dorme em média quantas horas diariamente?

- Menos de 5 horas.
- Entre 7 e 9 horas.
- Entre 5 e 7 horas.
- Mais de 9 horas.

23. Essas horas de sono são gozadas preferencialmente em que período do dia?

- Entre 22h e 7h.
- Entre 0h e 9h.
- Entre 3h e 12h.
- Outro. Qual?-----

ANEXOS

ANEXO A - PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE DO SAGRADO
CORAÇÃO



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: RELAÇÃO ENTRE O AUMENTO DA REGIÃO DE HETEROCROMATINA DO CROMOSSOMO 9 E A INFERTILIDADE MASCULINA.

Pesquisador: RITA LUIZA PERUQUETTI

Área Temática: Genética Humana:

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

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 Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP);

Versão: 1

CAAE: 64882017.3.0000.5502

Instituição Proponente: Universidade do Sagrado Coração - Bauru - SP

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.935.805

Apresentação do Projeto:

apresenta documentação suficiente para a análise da proposta em termos éticos

Objetivo da Pesquisa:

Relacionar os hábitos de vida da população masculina, o aumento de regiões heterocromáticas no cromossomo 9 e os perfis de expressão gênica de alguns genes relacionados com determinação sexual, tanto das regiões heterocromáticas como não heterocromáticas, do cromossomo 9 em indivíduos que apresentem ou não distúrbios na produção espermática diária

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

os riscos estão relatados claramente e não são superiores aos benefícios. Este, por seu lado, podem auxiliar no melhor entendimento da área em estudo com contribuição pertinente e valiosa.

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação

Bairro: Rua Irmã Arminda Nº 10-50

CEP: 17.011-160

UF: SP

Município: BAURU

Telefone: (14)2107-7051

E-mail: comiteeeticadehumanos@uac.br

Continuação do Parecer 1.026.005

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

estudo com construção adequado e coerente, ainda que o texto apresentado não contemple a integralidade da proposta no que se refere a metodologia.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Texto bem construído.

Recomendações:

Sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A proposta pode ser aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	FB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_868438.pdf	16/02/2017 17:09:24		Aceito
Outros	FRPreenchida.pdf	16/02/2017 16:21:39	RITA LUIZA PERUQUETTI	Aceito
Folha de Rosto	FRAssinada.pdf	16/02/2017 16:20:02	RITA LUIZA PERUQUETTI	Aceito
TCE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Amorim2017Anexol.doc	16/02/2017 14:59:27	RITA LUIZA PERUQUETTI	Aceito
Cronograma	Amorim2017Cronograma.docx	16/02/2017 14:58:12	RITA LUIZA PERUQUETTI	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Amorim2017.pdf	16/02/2017 14:57:23	RITA LUIZA PERUQUETTI	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
 Bairro: Rua Imã e Aminda Nº 10-50 CEP: 17.011-160
 UF: SP Município: BALSU
 Telefone: (14)2107-7051 E-mail: comiteeteticadefuneroc@uc.br