

CENTRO UNIVERSITÁRIO SAGRADO CORAÇÃO

VINICIUS CONTRUCCI DANTAS SEGARRA

ASSOCIAÇÃO DE PARÂMETROS GENÉTICOS E ESPERMÁTICOS: UM ESTUDO
RETROSPECTIVO

BAURU

2020

VINICIUS CONTRUCCI DANTAS SEGARRA

ASSOCIAÇÃO DE PARÂMETROS GENÉTICOS E ESPERMÁTICOS: UM ESTUDO
RETROSPECTIVO

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

2020

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

S454a	<p data-bbox="532 1360 886 1388">Segarra, Vinicius Contrucci Dantas</p> <p data-bbox="532 1436 1278 1524">Associação de parâmetros genéticos e espermáticas: um estudo retrospectivo / Vinicius Contrucci Dantas Segarra. -- 2020. 29f. : il.</p> <p data-bbox="570 1566 1094 1625">Orientadora: Prof.^a Dra. Rita Luiza Peruquetti Coorientadora: Prof.^a M.^a Renata Salvador Fugiwara</p> <p data-bbox="532 1667 1278 1726">Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biomedicina) - Centro Universitário Sagrado Coração - UNISAGRADO - Bauru - SP</p> <p data-bbox="532 1768 1278 1848">1. Reprodução. 2. Infertilidade masculina. 3. Alterações citogenéticas. 4. Alterações espermáticas. I. Peruquetti, Rita Luiza. II. Fugiwara, Renata Salvador. III. Título.</p>
-------	--

VINICIUS CONTRUCCI DANTAS SEGARRA

ASSOCIAÇÃO DE PARÂMETROS GENÉTICOS E ESPERMÁTICOS: UM ESTUDO
RETROSPECTIVO

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 M^a Lívia Nardi Lopes
Laboratório Genos

Dedico esse trabalho a meus avós Elisete e Carlos, com carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e aos meus Guias pela proteção e oportunidades dadas para um aprendizado diário.

À minha mãe, Priscilla, muito obrigado por toda preocupação, carinho e apoio que tem comigo, não consigo descrever em palavras toda minha gratidão e admiração por você. Aos meus avós, Elisete e Carlos, obrigado por tanto amparo desde o início da minha vida e aos meus tios e primo, Danielle, Hugo e Victor Hugo, vocês são extremamente especiais em minha vida, obrigado por tudo! Amo todos vocês.

À minha orientadora, Rita Luiza Peruquetti, muito obrigado pela contribuição em minha jornada como aluno, pelo aprendizado, paciência, compreensão e ensino durante todos os anos de minha graduação. Serei eternamente grato pelas oportunidades dadas a mim, contribuindo para minha carreira.

Agradeço também à Wilson Orcini pela ajuda e ensino de técnicas no Laboratório de Biologia Molecular e Citogenética do UNISAGRADO. Obrigado pelo aprendizado compartilhado e pela paciência em ensinar desde meu primeiro ano.

Ao Laboratório Genos, esse trabalho não seria possível sem toda a equipe envolvida. Vocês fizeram parte crucial nesse trabalho. Muito obrigado à Lívia Nardi pela oportunidade de carreira na área que mais amo em biomedicina, pelo aprendizado compartilhado e pela amizade em todos esses anos. Agradeço também à Nathália e Giovana pela ajuda, aprendizado e amizade nos últimos anos.

À Clínica Fertility e Clínica Integra, que também fizeram parte crucial nesse trabalho. Agradeço especialmente à Renata Salvador, coorientadora desse trabalho, e Juliana Nabuco pela disposição e por toda ajuda prestada. Ao Dr. Aguinaldo Nardi, obrigado pela oportunidade e contribuição nesse trabalho.

Obrigado aos docentes do curso de Biomedicina pelo aprendizado compartilhado. Vocês fazem a diferença para os alunos!

A meus amigos e irmãos de Avaré e Bauru, Douglas, Leonardo, Fabíola, Vitor, Ana Vitória, Fernanda, João Carlos, Diandra, José Victor, Vincenzo e demais obrigado por estarem presentes em minha vida, por me apoiarem e torcerem por mim!

“Em algum lugar, algo incrível está esperando para ser descoberto”. SAGAN, Carl.

RESUMO

A infertilidade masculina é descrita como grande causa do insucesso de concepção entre casais. Sua causa pode ser relacionada à fatores físicos, genéticos, hormonais ou sorológicos e evidencia baixa contagem e/ou motilidade espermática, assim como anormalidades morfológicas nos espermatozoides, parâmetros os quais são analisados no exame de espermograma. Dentre os fatores genéticos relacionados à infertilidade masculina estão alterações numéricas ou estruturais dos cromossomos, presença de polimorfismos, microdeleções e mutações gênicas. As alterações espermáticas mais relacionadas à genética são a azoospermia e oligozoospermia, embora exista também a astenoospermia, teratoospermia, necroospermia e aspermia. A qualidade espermática revela um declínio nos últimos anos, sendo a infertilidade considerada um problema de saúde pública. O objetivo do presente estudo foi de avaliar a correlação descritiva entre alterações citogenéticas e parâmetros espermáticos de pacientes que tiveram exames de cariótipo sanguíneo no Laboratório Genos e espermograma na Clínica Fertility, localizados em Bauru/SP. Chegou-se a um resultado de 62 pacientes que possuíam ambos os exames, os quais foram separados em três grupos: pacientes com alterações genéticas estruturais, pacientes com alterações genéticas numéricas e pacientes com polimorfismos. A maioria dos pacientes tinham polimorfismos (48), principalmente nos cromossomos Y, 9 e 22, representando aumento na região de heterocromatina. Alterações estruturais representaram o segundo grupo com maior número de pessoas (11), com maior relevância a inversão de regiões do cromossomo 9 (inv(9)(p12q13)) e translocação robertsoniana entre os cromossomos 13 e 14 (rob(13;14)(q10;q10)). O grupo de alterações numéricas apareceu em terceiro, com três pacientes (dissomia do Y, dissomia do X e trissomia do 21). Astenoospermia, oligozoospermia e teratoospermia foram as alterações espermáticas mais presentes nos pacientes dos grupos mais relevantes (polimorfismos e alterações estruturais), representando grande frequência em relação à constituição cromossômica estudada e ao tipo de alteração genética. Concluiu-se que a relação entre alterações citogenéticas e espermáticas mostrou-se alta, principalmente entre os cromossomos X e 9. Novos estudos serão realizados a fim de analisar pequenas regiões gênicas para uma melhor elucidação da causa de infertilidade masculina.

Palavras-chave: Reprodução. Infertilidade masculina. Alterações citogenéticas. Alterações espermáticas.

ABSTRACT

Male infertility is described as a major cause of conception failure among couples. Its cause may be related to physical, genetic, hormonal or serological factors and shows low sperm count and/or motility, as well as morphological abnormalities in spermatozoa, parameters that are analyzed in the spermogram examination. Among the genetic factors related to male infertility are numerical or structural alterations of the chromosomes, presence of polymorphisms, microdeletions and gene mutations. The sperm alterations more related to genetics are azoospermia and oligozoospermia, although there is also astenozoospermia, teratozoospermia, necrozoospermia and aspermia. Sperm quality shows a decline in recent years and infertility is considered a public health problem. The objective of the present study was to evaluate the descriptive correlation between cytogenetic alterations and sperm parameters of patients who had blood karyotype tests at Laboratório Genos and spermogram at Clínica Fertility, located in Bauru/SP. A result of 62 patients who had both tests was obtained, which were separated into three groups: patients with structural genetic alterations, patients with numerical genetic alterations and patients with polymorphisms. Most patients had polymorphisms (48), mainly in the Y chromosomes, 9 and 22, representing an increase in the heterochromatin region. Structural changes represented the second group with the highest number of people (11), with more relevance the inversion of chromosome 9 regions ($inv(9)(p12q13)$) and Robertsonian translocation between chromosomes 13 and 14 ($rob(13;14)(q10;q10)$). The group of numerical changes appeared in third, with three patients (Y disomy, X disomy, and 21 trisomy). Astenozoospermia, oligozoospermia and teratozoospermia were the most frequent sperm alterations in patients of the most relevant groups (polymorphisms and structural changes), representing a high frequency in relation to the chromosomal constitution studied and the type of genetic alteration. It was concluded that the relationship between cytogenetic and spermatogenic changes was high, especially between the X and 9 chromosomes. New studies will be carried out in order to analyze small gene regions for a better elucidation of the cause of male infertility.

Keywords: Reproduction. Male Infertility. Cytogenetic alterations. Spermatogenic alterations.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 - Cariótipos contendo polimorfismos correlacionados ao tipo de alteração espermática (se encontrada) e frequência.....	23
Quadro 2 - Cariótipos contendo alterações estruturais correlacionados ao tipo de alteração espermática (se encontrada) e frequência.....	23

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Constituição cromossômica dos pacientes junto ao número de cariótipos e espermogramas alterados.	19
--	----

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	12
2. OBJETIVOS	14
3. JUSTIFICATIVA	15
4. METODOLOGIA	16
4.1. Casuística.....	16
4.2. Cariótipo de sangue periférico.....	16
4.3. Bandeamento G.....	17
4.4. Bandeamento C.....	17
4.5. Espermograma	18
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	19
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	25
REFERÊNCIAS	26
APÊNDICE A – Termo de Aquiescência (Laboratório Genos)	28
APÊNDICE B – Termo de Aquiescência (Clínica Fertility)	29

1. INTRODUÇÃO

A infertilidade humana é a incapacidade de se obter uma gravidez após 12 meses de relações sexuais regulares e desprotegidas, afetando de 15% a 25% de casais em idade reprodutiva (WHO, 2001; GASKINS et al., 2017; LASHKARI et al., 2018). É classificada em primária, representada por casais que nunca conceberam e secundária, em que há fracasso em conceber após uma gravidez bem-sucedida (MADON et al., 2005; CUI, 2010; OLIVEIRA et al., 2011).

Estudos apontam que a infertilidade masculina é identificada em cerca de 50% dos casos de insucesso de concepção entre os casais. É uma condição multifatorial e pode ser diagnosticada por diversos exames como físico, genético, hormonal ou sorológico, embora na maioria dos casos não há uma causa aparente (KIM et al., 2012; KRAUSZ et al., 2018; LASHKARI et al., 2018; ABUR et al., 2019). Geralmente a infertilidade se dá pela baixa contagem de espermatozoides, baixa motilidade espermática e anormalidades morfológicas nos espermatozoides (HWANG et al., 2010; KHIAMI et al., 2019).

O diagnóstico da infertilidade é feito pela avaliação de parâmetros do ejaculado. A análise macroscópica engloba a liquefação, viscosidade, aspecto, coloração e pH. A concentração, motilidade, morfologia e vitalidade dos espermatozoides fazem parte da avaliação microscópica (FEIJÓ et al., [20--]; PASQUALOTTO, 2007; ZHANG et al., 2014). Alguns estudos colocam essas avaliações como uma triagem para a realização de testes mais específicos, como cariótipo, análise do gene CFTR, PCR para microdeleção do Y e análise de FISH do material espermático, avaliando alterações cromossômicas específicas (PASQUALOTTO, 2007; HWANG et al., 2010; KRAUSZ et al., 2018).

Fatores genéticos são comumente descritos dentre as causas da infertilidade masculina, representados por anomalias cromossômicas (numéricas ou estruturais), polimorfismos, microdeleções e mutações gênicas (KRAUSZ et al., 2014; NAASSE et al., 2015; BEYAZ et al., 2017; ABUR et al., 2019; KHIAMI et al., 2019). Ao passo da diminuição da concentração espermática, há uma maior incidência de diagnóstico genético (PASQUALOTTO, 2007).

As alterações espermáticas mais encontradas e relacionadas a alterações genéticas são azoospermia, caracterizada pela ausência de espermatozoides e oligozoospermia, definida pela contagem reduzida do número de espermatozoides (<20 milhões/ml de sêmen). Há também alterações na motilidade, como a astenozoospermia (motilidade <50% de progressivos) e alterações na morfologia, como a teratozoospermia (<14% de formas

normais). A ausência de ejaculado é conhecida como aspermia (FAN; SILBER, 2002; KIM et al., 2012).

Anomalias cromossômicas cada vez mais vêm sendo relacionadas à infertilidade masculina, visto que são identificadas mais frequentemente em homens inférteis (oligoospermicos e azoospermicos) do que na população em geral. Dentre as alterações, a mais frequente é a síndrome de Klinefelter, caracterizada pela dissomia do cromossomo X (47,XXY). A condição pode estar presente em mosaicismo nos indivíduos (46,XY/47,XXY), demonstrando diferentes graus de comprometimento da espermatogênese. A síndrome de Jacob (47,XYY) é também demonstrada em alguns estudos como frequente em homens inférteis, logo após a síndrome de Klinefelter (PASQUALOTTO, 2007; LASHKARI et al., 2018; BOROJENI et al., 2017).

A microdeleção do cromossomo Y é frequentemente discutida e relacionada a alterações espermáticas. O diagnóstico se dá a partir de características clínicas e laboratoriais e é mais frequente em pacientes com azoospermia e oligozoospermia leve, moderada ou grave, dependendo do grau de deleção (FAN; SILBER, 2002; KRAUSZ et al., 2018).

Outras alterações comumente encontradas em homens inférteis são polimorfismos dos cromossomos 1, 9, 16 e Y, conhecidos como blocos de heterocromatina, os quais não alteram características fenotípicas dos indivíduos, mas podem estar relacionados diretamente no processo de meiose e produção de gametas dos mesmos. Além disso, inversões pericêntricas são bastantes estudadas, destacando-se os cromossomos 9, 1 e 16 (OLIVEIRA et al., 2011; XIE et al., 2019).

Alguns estudos sugerem que há um declínio na qualidade espermática nos últimos anos, visto que diversos fatores podem estar relacionados à fertilidade masculina, como a influência do meio externo e o contato direto com produtos químicos que possam interagir com o organismo, o aumento de sobrepeso e obesidade e falta de atividades físicas. A infertilidade, por sua vez, é considerada um problema de saúde pública nesse século (PASQUALOTTO et al., 2004; SERMONDADE et al., 2013; ILACQUA et al., 2018).

2. OBJETIVOS

O objetivo do presente estudo foi de avaliar a correlação descritiva entre alterações citogenéticas e parâmetros espermáticos de pacientes que tiveram exames de cariótipo sanguíneo no Laboratório Genos e espermograma na Clínica Fertility, localizados em Bauru/SP.

3. JUSTIFICATIVA

A infertilidade, atualmente analisada como problema de saúde pública, cresce cada vez mais entre os casais. Os fatores masculinos estão sendo cada vez mais descritos como causadores da falha de concepção do casal, visto que o aumento dos fatores genéticos associado à constante queda da fertilidade masculina. O presente estudo busca ampliar o conhecimento sobre essa relação. Durante a execução desse trabalho, foram avaliados critérios espermáticos de concentração, morfologia, motilidade e vitalidade em relação à pacientes que possuem alterações no cariótipo, buscando a descrição de possíveis indícios de correlação entre os parâmetros.

4. METODOLOGIA

4.1. Casuística

Foram utilizados no presente estudo amostras de pacientes encaminhados ao Laboratório Genos, localizado no Centro de Diagnóstico da Unimed (CDU) na Rua Agenor Meira, 12-34, Bauru/SP para análise citogenética de sangue periférico e amostras dos mesmos pacientes encaminhados à Clínica Fertility, localizada na Clínica Integra (Avenida Comendador José da Silva Martha, 3-30, Bauru/SP) para análise de espermograma. Os laudos datam de 2015 a 2020. Os pacientes estudados foram previamente atendidos por profissionais médicos e possuem indicação de infertilidade. Autorização para análise dos prontuários dos pacientes foram obtidas de ambas as instituições parceiras (Laboratório Genos e Clínica Fertility) e uma cópia desses documentos podem ser encontradas nos Apêndices (Apêndices A e B).

4.2. Cariótipo de sangue periférico

Coletou-se, em tubo heparinizado, pequena quantidade de sangue periférico. Após a coleta, pingou-se de 16 a 18 gotas de sangue em frasco de cultura previamente identificado para cultura de leucócitos. As amostras então foram colocadas em estufa a 37°C por 72 horas. Ao fim desse período, adicionou-se 300uL de colchicina (Gibco®), a qual impede a formação das fibras do fuso e, conseqüentemente, interrompe o processo mitótico em metáfase. A colchicina foi deixada durante 30 minutos nas amostras, em estufa. Posteriormente, os tubos foram centrifugados, o sobrenadante desprezado e adicionou-se 5mL de cloreto de potássio (KCl), uma solução hipotônica a qual provoca a lise da membrana plasmática dos leucócitos. Colocou-se a amostra com KCl na estufa por 30 minutos. Após esse período, adicionou-se 1mL de fixador (solução de metanol e ácido acético na proporção 3:1) como pré-fixação. Os tubos ficaram em geladeira por 5 minutos. Em seguida centrifugou-se os tubos, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se fixador. Essa etapa da fixação é de eliminação de restos celulares e citoplasmáticos e repete-se por 3x. Após a última centrifugação, o sobrenadante foi desprezado e adicionou-se fixador até 2mL. Utilizando um banho-maria a 60°C, pingou-se o material em lâminas, as quais estavam sob um suporte dentro do equipamento. As lâminas foram coradas em coloração convencional (Giemsa) para análise teste. Após a verificação do material em microscópio, os materiais foram pingados em outras lâminas, as quais ficaram armazenadas em geladeira por 7 dias. Após esse período, foi realizado bandeamento G e, se necessário, bandeamento C. Dez metáfases foram cariotipadas

e outras 10 foram contadas a partir do software GeneAll®. Todos os cariótipos foram realizados pelo Laboratório Genos.

4.3. Bandeamento G

As bandas G são determinadas pelos grupos Tiol das proteínas não histônicas, obtidas através do pré-tratamento dos cromossomos com enzimas proteolíticas como a tripsina. As faixas fortemente coradas pelo corante Giemsa seriam aquelas que se mostram muito compactadas juntamente com seu DNA, visto que possuem proteínas apresentando grande número de pontes de dissulfeto. O objetivo do bandeamento G é analisar os cromossomos segundo seu padrão de bandamento, identificando-os de acordo com seu número e grupo, observando alterações em tamanho,

Foi utilizado banho-maria a 37°C e um recipiente para lâminas contendo 40mL de tampão fosfato e 0,005g de tripsina. A lâmina do paciente foi mergulhada de 1 a 3 segundos e imediatamente após, foi imersa em um béquer contendo água destilada. Posteriormente, corou-se a lâmina em coloração convencional com solução de Giemsa por 4 minutos. A lâmina então foi lavada com água destilada e seca à temperatura ambiente. Inicialmente, foi bandado apenas uma lâmina para a observação ao microscópio. A partir disso, foi avaliado se o tempo de imersão na solução contendo tripsina produziu um padrão de bandas satisfatório. Caso não, o tempo foi aumentado ou diminuído.

4.4. Bandeamento C

As bandas C são determinadas por regiões cromossômicas que contém DNA altamente concentrado, as quais oferecem maior resistência ao tratamento alcalino para retirá-las das proteínas não histônicas que estão ligadas. Os cromossomos são tratados com uma solução alcalina (geralmente o hidróxido de bário – $Ba(OH)_2$) e posteriormente são corados com solução de Giemsa, revelando segmentos heterocromáticos ao redor dos centrômeros, na parte distal do cromossomo Y, região do braço menor e satélites dos cromossomos dos grupos D e G e nas constrições secundárias proximais ao centrômero dos cromossomos 1, 9 e 16. Utiliza-se essa técnica quando se suspeita da presença de polimorfismo, variações estruturais dos cromossomos que estão muito disseminados na população humana sem ter nenhum efeito comprovado sobre o fenótipo.

Primeiramente foram aquecidas, em recipientes para lâminas, as soluções de hidróxido de bário e 2xSSC à 60°C em banho-maria. A lâmina foi imersa em solução de $Ba(OH)_2$ por 8 minutos, posteriormente lavou-se em água destilada e imergiu-se em solução 2xSSC por 10

minutos. A lâmina foi então novamente lavada em água destilada e corada utilizando-se solução de Giemsa.

4.5. Espermograma

Para a realização do exame os pacientes deveriam respeitar um período de abstinência sexual de 2 a 7 dias prévios à coleta de amostra de sêmen. Após a coleta, a amostra foi submetida ao processo de liquefação (30 minutos) e, posteriormente realizou-se análise macroscópica aspirando o sêmen para análise de volume, aspecto e coloração. A análise de pH também foi determinada. A análise microscópica da amostra foi realizada em câmara de Makler, determinando-se a concentração de espermatozoides em milhões/mL, a motilidade e a progressão espermática. A motilidade da amostra a partir da análise poderá ser classificada como: motilidade progressiva, motilidade não progressiva e imóveis. Os resultados foram expressos em porcentagem. Posteriormente realizou-se análise de vitalidade, contagem e morfologia dos espermatozoides. A Organização Mundial da Saúde (OMS) preconiza que o volume da amostra deve ser maior que 1,5mL, a concentração de espermatozoides deve ser maior que 15 milhões/mL, sendo a concentração total da amostra maior que 39 milhões. A motilidade deve ser maior que 40% e a motilidade progressiva maior que 32%. A vitalidade deve passar dos 58%. A morfologia espermática deve ser igual ou maior que 4% de formas ovais normais. Todas as análises de espermograma foram realizadas na Clínica Fertility.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A partir de pacientes que possuíam alterações genéticas detectadas em cariótipo sanguíneo, realizou-se busca de dados para detectar se os mesmos tinham espermograma realizado. Chegou-se a um resultado de 62 pacientes. Foram consideradas como padrões de alterações espermáticas a astenozoospermia (baixa motilidade entre os espermatozoides progressivos), azoospermia (ausência de espermatozoides), oligozoospermia (contagem reduzida do nº de espermatozoides), necrozoospermia (baixa porcentagem de espermatozoides vivos) e teratozoospermia (formas normais de espermatozoides reduzida).

Tabela 1 - Constituição cromossômica dos pacientes junto ao número de cariótipos e espermogramas alterados.

Constituição cromossômica	Nº de cariótipos	Nº de espermogramas alterados
Alterações estruturais	total = 11	total = 8
46,XY,inv(9)(p12q13)	4	1
45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	3	3
46,XY,inv(9)(p11q13)	1	1
45,XY,rob(14;21)(q10;q10)	1	1
46,XY,del(22)(q?)	1	1
46,XX,add(14)(p13)	1	1
Alterações numéricas	total = 3	total = 2
47,XXY	1	0
mos 47,XXY(2)/46,XY(48)	1	1
mos 47,XY,+21[3]/46,XY[47]	1	1
Polimorfismos	total = 48	total = 28
46,XYqh+	24	12
46,XY,9qh+	5	2
46,XY,22ps+	3	2
46,XYqh+,22ps+	3	3
46,XY,1qh+	2	1
46,XYqh+,1qh+	2	2
46,XYqh+,9qh+	2	1
46,XYqh+,9qh+,16qh+	1	1
46,XYqh+,9qh+,14cenh+	1	0
46,XY,21ps+	1	1
46,XY,16qh+,22ps+	1	1
46,XY,9qh+,15ps+	1	0
46,XY,16qh-	1	1
46,XYqh-	1	1

Fonte: elaborado pelo autor.

Na Tabela 1 é possível observar todos os padrões de constituições cromossômicas encontrados junto à quantidade de cariótipos e espermogramas alterados.

A maioria das alterações genéticas encontradas no presente estudo foram polimorfismos, seguido de alterações estruturais e numéricas dos cromossomos, respectivamente. O polimorfismo Yq+, identificado como um aumento da heterocromatina do cromossomo Y, foi o mais observado, com maior número de pacientes realizando os dois exames por indicação de infertilidade. Alterações nos cromossomos 9, 22 e 1 seguem logo após. Nas alterações estruturais, a inversão pericêntrica do cromossomo 9 foi a mais presente, seguida da translocação robertsoniana abrangendo os cromossomos 13 e 14.

Em relação ao número de espermogramas alterados que foram encontrados, a maior taxa em relação ao cariótipo se encontra no grupo de alterações estruturais dos cromossomos, com cerca de 72% pacientes apresentando alterações espermáticas. Em pacientes que possuem algum tipo de polimorfismo, aproximadamente 58% apresentam alteração espermática e dos que apresentam alterações numéricas, cerca de 66% têm alteração no espermograma. É importante frisar que há pacientes que apresentam mais de um tipo de alteração em um mesmo espermograma.

O grupo de pacientes que apresentaram polimorfismos representa a maior frequência dentre os tipos de alteração genética. No Quadro 1 é possível visualizar as constituições cromossômicas mais presentes nesse grupo, junto ao número total de espermogramas alterados para cada caso e os tipos de alterações espermáticas e suas frequências. Notou-se que metade dos pacientes que têm cariótipo 46,XYqh+ possuem alteração espermática e que a presença de astenozoospermia é a maior, representando uma frequência de 42% em relação ao total de casos Yqh+ e 29% sobre o total de polimorfismos mais presentes (35). A teratozoospermia é a segunda mais frequente, representando 38% nos casos Yqh+ e 26% sobre os polimorfismos. Por fim, a oligozoospermia tem frequência de 33% em relação aos casos Yqh+ e 23% em relação aos polimorfismos. A necrozoospermia e azoospermia representam baixa frequência.

A constituição cromossômica 46,XY,9qh+ evidencia 5 casos no total, com 2 pacientes apresentando oligozoospermia e teratozoospermia, os quais representam 40% cada do total de casos com essa alteração genética e 6% do total de polimorfismos. O mesmo acontece em pacientes que apresentam 46,XY,22ps+, porém, nessa condição há somente 3 casos, com 2 apresentando oligozoospermia e teratozoospermia. Em pacientes 46,XYqh+,22ps+, todos os casos (3) possuem alteração espermática, a qual é representada por astenozoospermia, em

uma frequência de 67% em relação à constituição cromossômica, olizoospermia, também representando 67% e teratozoospermia, com 33% dos pacientes.

É comum a presença de polimorfismos em exames citogenéticos utilizando métodos de bandeamento. O aumento da heterocromatina está relacionado aos cromossomos 1, 9, 16 e Y e são marcados como qh⁺ ou qh⁻, representando que uma região do cromossomo está aumentada. Essa região é caracterizada por DNA altamente repetitivo que se mostra condensada. Nos cromossomos 1, 9 e 16 há aumento na região centromérica, enquanto que no cromossomo Y é na porção distal do braço longo. Além disso, alterações como satélites e braços curtos proeminentes em cromossomos acrocêntricos são considerados polimorfismos (BABU e VERMA, 1986; BROTHMAN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2011; CHRISTOFOLINI et al., 2012; ŠIPEK JR et al., 2014).

Estudos mostram que homens inférteis apresentam maior frequência de polimorfismos em comparação a outros que possuem boa qualidade reprodutiva. Embora o aumento da heterocromatina não esteja relacionado a alterações fenotípicas na população, há estudos que mostram uma correlação quando se trata de infertilidade, silenciando genes responsáveis pela espermatogênese, por exemplo. Não há, ainda, um mecanismo claro pelo qual é isso evidenciado, por isso cada vez mais estudos são realizados para avaliação de casais (MINOCHERHOMJI et al., 2009; ASKBAŞ et al., 2012; DONG et al., 2013; POKALE, 2015).

Em relação ao cromossomo Y, o aumento ou diminuição da heterocromatina pode se relacionar à microdeleção de algumas áreas do cromossomo, afetando alguns genes importantes para a qualidade reprodutiva do homem. Alguns genes na região AZF são considerados críticos para a espermatogênese e a deleção de algumas áreas podem causar efeitos no processo, ocasionando em infertilidade masculina pela apresentação de alterações espermáticas. A ocorrência e o tamanho do heteromorfismo do cromossomo podem estar relacionados à inibição da transcrição de genes, devido a um efeito de silenciamento (FAN e SILBER, 2002; MINOCHERHOMJI et al., 2009; DONG et al., 2013; ZHANG et al., 2016).

Alterações no cromossomo 9 como o aumento da região de heterocromatina e inversão pericêntrica são constantemente relacionados à infertilidade, visto que diversos estudos mostram uma frequência maior de alteração nesse cromossomo em casais inférteis em relação à férteis. A inversão desse cromossomo é a mais comum dentre a sociedade, sendo frequente entre 1 a 3% da população, além disso ele contém o maior bloco de heterocromatina dentre os cromossomos e é heteromórfico em 6-8% da população. No cromossomo 9 estão alguns genes que são relacionados com o processo de espermatogênese, por isso qualquer alteração em sua

estrutura pode ocasionar alterações em homens. É um grande alvo de estudos, há evidências de alterações na meiose, levando à má formação de gametas, além da correlação entre abortos espontâneos, anomalias congênitas e infertilidade. A presença de satélite pelo cromossomo 22 pode ser correlacionada à alteração de expressão gênica e também se mostra presente na população, ainda mais em homens inférteis, que apresentam alterações espermáticas (HUMPHRAY et al., 2004; LIU et al., 2008; CHRISTOFOLINI et al., 2012; ŠIPEK JR et al., 2014; VIJAY et al., 2016).

No Quadro 2 é possível visualizar as constituições cromossômicas mais relevantes dentre as alterações estruturais, junto aos tipos de alterações espermáticas encontradas e suas respectivas frequências. Há 4 pacientes que apresentam inversão pericêntrica do cromossomo 9, porém apenas 1 possui espermograma alterado, apresentando oligozoospermia e teratozoospermia. Em pacientes 45,XY,rob(13;14)(q10q10), todos os pacientes possuem alteração espermática com frequência de 100% de oligozoospermia, 67% de astenozoospermia e 33% de necrozoospermia e teratozoospermia cada em relação ao número de casos.

Dentre as translocações robertsonianas presentes em Humanos, a envolvendo os cromossomos 13 e 14 é a mais frequente. Não causa alterações fenotípicas aparentes, mas é muito associada a oligozoospermia e azoospermia em homens adultos, além do risco de causar síndromes a partir de gametas não balanceados (CHANG et al., 2012; CHOI et al., 2013).

Quadro 1 - Cariótipos contendo polimorfismos correlacionados ao tipo de alteração espermática (se encontrada) e frequência.

Tipo de alteração genética	Constituição cromossômica	Nº de casos (Total)	Nº de espermogramas alterados	Alterações espermáticas	Nº alterados	Frequência em relação à constituição cromossômica	Frequência em relação ao tipo de alteração genética
Polimorfismos	46,XYqh+	24	12	Astenozoospermia	10	42%	29%
				Azoospermia	1	4%	3%
				Olizoospermia	8	33%	23%
				Necrozoospermia	2	8%	6%
				Teratozoospermia	9	38%	26%
	46,XY,9qh+	5	2	Olizoospermia	2	40%	6%
				Teratozoospermia	2	40%	6%
	46,XY,22ps+	3	2	Olizoospermia	2	67%	6%
				Teratozoospermia	2	67%	6%
	46,XYqh+,22ps+	3	3	Astenozoospermia	2	67%	6%
				Olizoospermia	2	67%	6%
				Teratozoospermia	1	33%	3%

Fonte: elaborado pelo autor.

Quadro 2 - Cariótipos contendo alterações estruturais correlacionados ao tipo de alteração espermática (se encontrada) e frequência.

Tipo de alteração genética	Constituição cromossômica	Nº de casos (Total)	Nº de espermogramas alterados	Alterações espermáticas	Nº alterados	Frequência em relação à constituição cromossômica	Frequência em relação ao tipo de alteração genética
Alterações estruturais	46,XY,inv(9)(p12q13)	4	1	Olizoospermia	1	25%	14%
				Teratozoospermia	1	25%	14%
	45,XY,rob(13;14)(q10;q10)	3	3	Astenozoospermia	2	67%	29%
				Olizoospermia	3	100%	43%
				Necrozoospermia	1	33%	14%
				Teratozoospermia	1	33%	14%

Fonte: elaborado pelo autor.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

No presente estudo a relação entre alterações citogenéticas e espermáticas se mostrou alta, evidenciando, principalmente, a correlação descritiva entre os cromossomos Y e 9 à espermatogênese, evidenciando pacientes com reduzido número de espermatozoides, baixa motilidade e vitalidade espermática. Porém, o cariótipo sanguíneo é um exame genético limitante. Embora seja possível identificar inúmeras alterações nos cromossomos, é impossível a análise de regiões gênicas e modificações ligadas a elas, como microdeleções, por exemplo. Com isso, pequenas alterações que podem alterar parâmetros espermáticos não sofrem avaliação.

Novos estudos serão realizados a fim de avaliar os genes dos pacientes que apresentaram alteração no cromossomo Y, para uma melhor elucidação da causa da infertilidade masculina.

REFERÊNCIAS

- ABUR, U.; GUNES, S.; ASCI, R.; ALTUNDAG, E.; AKAR, O.S.; AYAS, B.; ASPASLAN, M.K.; OGUR, G. Chromosomal and Y-chromosome microdeletion analysis in 1300 infertile males and the fertility outcome of patients with AZFc microdeletions. **Andrologia**, p. 1-8, 2019. DOI: 10.1111/and.13402.
- BEYAZ, C.C.; GUNES, S.; ONEM, K.; KULAC, T.; ASCI, R. Partial Deletions of Y-Chromosome in Infertile Men with Non-obstructive Azoospermia and Oligoasthenoteratozoospermia in a Turkish Population. **International Journal of Experimental and Clinical Pathophysiology and Drug Research**, v. 31, p. 363-371, 2017.
- BOROUJENI, P.B.; SABBAGHIAN, M.; DIZAJI, A.V.; MORADI, S.Z.; ALMADANI, N.; LASHKARI, F.M.; ZAMANIAN, M.R.; MEYBODI, A.M. Clinical aspects of infertile 47,XXY patients: a retrospective study. **Human Fertility**, v. 22, n. 2, p. 88-93, 2017
- CHANG, E.M.; HAN, J.E.; KWAK, I.P.; LEE, W.S.; YOON, T.K.; SHIM, S.H. Preimplantation genetic diagnosis for couples with a Robertsonian translocation: practical information for genetic counseling. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, p. 67-75, 2012.
- CUI, W. Mother or nothing: the agony of infertility. **Bull World Health Organ**, v. 88, n. 12, p. 881-882, 2010.
- FAN, Y.; SILBER, S.J. Y Chromosome Infertility. **GeneReviews**, p. 1-17, 2002.
- FEIJÓ, C.M.; SPAINE, D.M.; TIBALDI, D.S.; ESTEVES, S.C. **Espermograma**, cap. 4, p. 45-53.
- GASKINS, A.K.; CHAVARRO, J.E. Diet and Fertility: A review. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 218, n. 4, p. 379-389, 2018.
- HWANG, K.; YATSENKO, A.N.; JORGEZ, C.J.; MUKHERJEE, S.; NALAM, R.L.; MATZUK, M.M.; LAMB, D.J. Mendelian genetics of male infertility. **New York Academy of Sciences**, p. 1-10, 2010.
- ILACQUA, A.; IZZO, G.; EMERENZIANI, G.P.; BALDARI, C.; AVERSA, A. Lifestyle and fertility: the influence of stress and quality of life on male fertility. **Reproductive Biology and Endocrinology**, v. 16, n. 115, p.1-11, 2018.
- KHIAVI, M.A.; JALILI, A.; SAFARY, A.; GHAREDAGHCHI, Z.; MIRINEZHAD, S.K.; MEHDIZADEH, A.; RAHMANI, S.A. Karyotypic abnormalities and molecular analysis of Y chromosome microdeletion in Iranian Azeri Turkish population infertile men. **Journal Systems Biology in Reproductive Medicine**, p. 1-7, 2019.
- KIM, M.J.; CHOI, H.W.; PARK, S.Y.; SONG, I.O.; SEO, J.T.; LEE, H.S. Molecular and cytogenetic studies of 101 infertile men with microdeletions of Y chromosome in 1,306 infertile Korean men **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, v. 29, p. 539-546, 2012.

KRAUSZ, C.; CIOPPI, F.; RIERA-ESCAMILLA, A. Testing for genetic contributions to infertility: potential clinical impact. **Journal Expert Review of Molecular Diagnostics**, 2018.

LASHKARI, F.M.; GILANI, M.A.S.; GHADERI, A.; ZAMANIAN, M.R.; BOROUJENI, P.B.; MEYBODI, A.M.; SABBAGHIAN, M. Clinical aspects of 49 infertile males with 45,X/46,XY mosaicism karyotype: A case series. **Andrologia**, v. 50, n. 5, p. 1-7, 2018.

MADON, P.F.; ATHALVE, A.S.; PARIKH, F.R. Polymorphic variants on chromosomes probably play a significant role in infertility. **Reproductive BioMedicine Online**, v. 11, n. 6, p. 726-732, 2005.

NAASSE, Y.; CHAROUTE, H.; HOUATE, B.E.; ELBEKKAY, C.; RAZOKI, L.; MALKI, A.; BARAKAT, A.; ROUBA, H. Chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in infertile men from Morocco. **BMC Urology**, v. 15, n. 95, 2015.

OLIVEIRA, M.A.; ANDARI, V.C.M.; FRANCISCO, L.S.; UENO, J.; OLIVEIRA, R.M.; MARTINHAGO, C.D. Alterações no cariótipo que podem gerar infertilidade ou abortamento de repetição. **Femina**, v. 39, n. 2, p. 91-96, 2011.

PASQUALOTTO, F.F. Effects of medical therapy, alcohol, smoking and endocrine disruptors on male infertility. **Revista do Hospital das Clínicas**, v. 59, n. 6, p. 375-382, 2004.

PASQUALOTTO, F.F. Investigação e reprodução assistida no tratamento da infertilidade masculina. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, v. 29, n. 2, p. 103-112, 2007.

SERMONDADE, N.; FAURE, C.; FEZEU, L.; SHAYEB, A.G.; BONDE, J.P.; JENSEN, T.K.; WELY, M.V.; CAO, J.; MARTINI, A.C.; ESKANDAR, M.; CHAVARRO, J.E.; KOLOSZAR, S.; TWIGT, J.M.; RAMLAU-HANSEN, C.H.; BORGES JR, E.; LOTTI, F.; STEEGERS-THEUNISSEN, R.P.M.; ZORN, B.; POLOTSKY, A.J.; VIGNERA, S.L.; ESKENAZI, B.; TREMELLEN, K.; MAGNUSDOTTIR, E.V.; FEJES, I.; HERCBERG, S.; LEVY, R.; CZERNICHOW, S. BMI in relation to sperm count: an updated systematic review and collaborative meta-analysis. **Human Reproduction Update**, v. 19, n. 3, p. 221-231, 2013.

VIJAY, S.; NARAYANAN, G.; SAROJAM, S.; RAVEENDRAN, S.K.; HARIHARAN, S. Enigmatic Inv(9): A Case Report on Rare Findings in Hematological Malignancies. **Iranian Red Crescent Medical Journal**, v. 18, n. 4, abr. 2016. DOI: <http://10.5812/ircmj.25062>.

XIE, X.; GUO, X.; LI, F.; TAN, W.; YIN, W.; CHEN, R. Genetic and sex hormone analysis of infertile men. **Retrospective Clinical Research Report**, p. 1-7, 2019.

ZHANG, E.; TAO, X.; XING, W.; CAI, L.; ZHANG, B. Effect of sperm count on success of intrauterine insemination in couples diagnosed with male factor infertility. **Materia Socio Medica**, v. 26, n. 5, p. 321-323, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **The epidemiology of infertility: Report of WHO Scientific Group on the Epidemiology of Infertility**. Geneva: World Health Organization WHO/RHR, 2001.

APÊNDICE A – Termo de Aquiescência (Laboratório Genos)**TERMO DE AQUIESCÊNCIA**

Eu, Livia Nardi Lopes, farmacêutica, sócia-proprietária e responsável técnica do Laboratório Genos, da Cidade de Bauru, autorizo o aluno Vinicius Contrucci Dantas Segarra, RG 548205802, a realização e utilização das informações obtidas no laboratório para o trabalho de conclusão de curso, intitulado “Associação de parâmetros genéticos e espermáticos: um estudo retrospectivo” do curso de Biomedicina do Centro Universitário do Sagrado Coração/UNISAGRADO, orientado pela Prof.ª Dra. Rita Luiza Peruquetti.

Esta autorização está sendo concedida desde que as seguintes premissas sejam respeitadas: as informações serão utilizadas unicamente e exclusivamente para a execução do presente trabalho; o aluno se compromete a preservar as demais informações obtidas, garantindo sigilo e privacidade, assim como o nome deste laboratório.

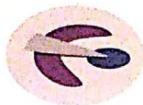
De acordo,

Bauru, 18 de Setembro de 2020.

Livia Nardi Lopes
Sócia-proprietária e responsável técnica – Laboratório Genos

Vinicius Contrucci Dantas Segarra
Aluno responsável pelo trabalho –
UNISAGRADO

Rita Luiza Peruquetti
UNISAGRADO

APÊNDICE B – Termo de Aquiescência (Clínica Fertility)**FERTILITY**
MEDICAL GROUPAVENIDA COMENDADOR JOSÉ DA SILVA MARTHA, 3-30
JD. ESTORIL I - CEP 17016.080 - BAURU/SP
FONE (14) 3223-2544e-mail: fertility@fertility.com.br
web site: http://www.fertility.com.br**TERMO DE AQUIESCÊNCIA**

Eu, Aguinaldo Cesar Nardi, médico, diretor clínico da Clínica Integra e Fertility Bauru, da Cidade de Bauru, autorizo o aluno Vinicius Contrucci Dantas Segarra, RG 548205802, a realização e utilização das informações obtidas no laboratório para o trabalho de conclusão de curso, intitulado “Associação de parâmetros genéticos e espermáticos: um estudo retrospectivo” do curso de Biomedicina do Centro Universitário do Sagrado Coração/UNISAGRADO, orientado pela Prof.^a Dra. Rita Luiza Peruquetti.

Esta autorização está sendo concedida desde que as seguintes premissas sejam respeitadas: as informações serão utilizadas unicamente e exclusivamente para a execução do presente trabalho; o aluno se compromete a preservar as demais informações obtidas, garantindo sigilo e privacidade, assim como o nome deste laboratório.

De acordo,

Bauru, 18 de Setembro de 2020.

Aguinaldo Cesar Nardi
Diretor Clínico – Clínica Integra e Fertility Bauru

Vinicius Contrucci Dantas Segarra
Aluno responsável pelo trabalho –
UNISAGRADO

Rita Luiza Peruquetti
UNISAGRADO