

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Caracterização Molecular do Gene *TEX11* em Homens Azoospermicos

Inês Palma de Oliveira

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:
Doutor João Gonçalves
Professora Doutora Deodália Dias

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA ANIMAL



Ciências
ULisboa

Caracterização Molecular do Gene *TEX11* em Homens Azoospermicos

Inês Palma de Oliveira

Mestrado em Biologia Humana e Ambiente

Dissertação orientada por:

Doutor João Gonçalves

Departamento de Genética Humana – Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge

Professora Doutora Deodália Dias

Departamento de Biologia Animal - Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa

Ao meu Pai, ao meu Avô Alberto e ao meu Primo Chico, para sempre no meu coração...

As referências bibliográficas nesta dissertação estão de acordo com as normas da *American Psychological Association 6th Edition*.

AGRADECIMENTOS

“Aqueles que passam por nós, não vão sós, não nos deixam sós. Deixam um pouco de si, levam um pouco de nós.”

Antoine de Saint-Exupéry

Embora uma dissertação seja, pela sua finalidade académica, um trabalho individual, há contributos de natureza diversa que não podem e nem devem deixar de ser realçados. Por essa razão, desejo expressar os meus sinceros agradecimentos **a todas as pessoas** que da sua maneira contribuíram para que alcançasse mais uma etapa da minha vida.

“O maior amor do mundo é o amor de mãe. A maior riqueza que temos no mundo é a nossa família. E o maior diamante que temos na alma é Deus.”

Quero em primeiro lugar, sem dúvida, agradecer à minha **mãe**, porque apesar de muitas vezes eu não ter dado o devido valor és uma guerreira, és a mulher mais corajosa que alguma vez conheci e que tenho o prazer de ter na minha vida, porque por maiores que tivessem sido as adversidades que Deus colocou nas nossas vidas sempre estiveste e sei que estarás aqui para mim, para me apoiar. Sem ti nunca teria chegado onde cheguei, nem me teria tornado na pessoa que sou hoje, só posso agradecer-te por tudo.

Mais que uma mãe, és uma SUPER MÃE!

Aos meus avós, Teresa e José e à minha avó Gracinda, pelo apoio incondicional, tenho a maior sorte em ter uns avós como vocês e só quero que se orgulhem sempre em me ter como vossa neta. Sabem o quanto vos adoro e o quão triste seria a minha vida sem vocês.

À minha tia Sónia, por estar sempre disponível para os meus desabafos e para os meus ataques de pânico, obrigada por conseguires acalmar-me e por estares lá para me ouvir. Sabes que a minha vida não teria o mesmo sabor sem ti, sabes também que tenho em ti não só uma tia como uma segunda mãe e melhor amiga. És tudo o que uma sobrinha pode querer e muito mais!

À minha priminha linda, Francisca, só porque também mereces e porque és um dos amores da minha vida. És a princesa mais linda da prima! Por favor, não cresças mais...

Aos meus tios São e Pedro e aos meus primos Pedro e Carlitos, porque apesar de não estarem sempre presentes, sei que estiveram sempre a torcer por mim!

À minha melga gigante pelo apoio incondicional, sabes que a minha vida nem seria a mesma sem ti.

Ao meu primo João por seres mais do que um irmão para mim, esta dissertação tem também um bocadinho do teu coração por ser dedicada não só ao meu pai, como também ao teu.

À minha prima Nita, sei que estes últimos anos não foram fáceis e que a vida é traiçoeira, mas és uma guerreira como a minha mãe, sabes que *ele* está lá em cima a olhar por nós!

Por fim, e ainda nos agradecimentos familiares, não podia deixar de agradecer às minhas estrelinhas que desde que partiram estiveram sempre a olhar por mim, sei que são os meus anjos da guarda e que nunca deixarão de me proteger.

Às minhas melhores amigas de sempre (e para sempre), por todos os anos de amizade e por me ajudarem a esquecer um pouco do stress que foi escrever esta dissertação, por estarem lá para mim sempre que precisei do vosso apoio. Maria, Andreia, Marta Santos, Marta Abreu, Mafalda e Patrícia, sabem que serão sempre o meu porto de abrigo. Sem vocês a minha vida não seria a mesma!

Ao meu melhor amigo, que é e será sempre uma das pessoas mais importantes na minha vida e ao qual devo muito, não podia deixar de te agradecer pela maravilhosa pessoa que tu és e pela pessoa que me fazes ser. Sabes que a nossa amizade é única e insubstituível e que venha quem vier, nós estaremos juntos, para tudo! Obrigada por tudo meu querido Simão.

Ao Fred, porque ao longo do tempo te tornaste uma pessoa muito importante e apesar de não serem muitas as verdadeiras amizades, tu és uma delas.

Ao meu Miguelito por todos os anos de amizade incondicional, também tu és uma peça fundamental desta longa caminhada que foi e é a minha vida e eu não podia deixar de te agradecer.

Às minhas afilhadas, Rita, Cati e Sofia por sempre me apoiarem e estarem ao meu lado. Sei que com vocês eu posso sempre contar. Obrigada mais uma vez por me terem escolhido.

Aos dois outros membros do Trio Maravilha, Mariana e Tiago, por todos os momentos que passámos juntos e pela vossa amizade, que apesar de não ser de sempre, sei que é para sempre. Sabem o quanto significam para mim e quanto o vosso apoio foi essencial.

À professora Didi porque sem si este mestrado não teria a mesma vida! Um obrigada GIGANTE!

À Iris Caetano, à Susana Gomes e ao José Ferrão e a todos os elementos do Departamento de Genética Humana (DGH) do Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge (INSA), por todo o apoio, sem vocês não teria sido o mesmo! A todos os elementos da Unidade de Tecnologia e Inovação do DGH, em especial, à Joana Mendonça e ao Luís Vieira, sem vocês este projeto não teria sido possível! Um obrigado não chega.

Agradeço ainda a todos os médicos da Unidade de Medicina da Reprodução do Hospital de Santa Maria e do Centro de Medicina Reprodutiva da Maternidade Dr. Alfredo da Costa, o encaminhamento dos doentes e a disponibilização da informação clínica. A todos os doentes o meu muito obrigado pela amostra biológica disponibilizada para análise.

Por fim, mas não menos importante, um agradecimento que não podia faltar, quero expressar um agradecimento muito especial ao Doutor João Gonçalves pela orientação científica, pelos conhecimentos transmitidos e pelos comentários e sugestões na revisão desta dissertação, que foram essenciais para a minha formação e para o desenvolvimento deste trabalho. Agradeço igualmente a sua disponibilidade, a amizade, o apoio constante e a confiança que depositou em mim.

*“Não sou nada.
Nunca serei nada.
Não posso querer ser nada.
À parte isso, tenho em mim todos os sonhos do mundo.”*

Fernando Pessoa

RESUMO

A investigação dos determinantes genéticos da fertilidade masculina nos últimos anos tem-se concentrado principalmente na análise do genoma humano por *microarray* e, mais recentemente, na sequenciação do exoma por sequenciação de nova geração (NGS). Apesar dos esforços realizados, não têm sido detetadas alterações genómicas específicas nem alterações pontuais patogénicas, com elevada frequência, associadas à patologia em causa. Recentemente foi identificado o gene *TEX11* localizado em Xq13.1, no âmbito do qual um número reduzido de estudos demonstra a sua importância para a fecundidade/gametogénese masculina. Esses estudos moleculares, realizados em amostras de homens inférteis, selecionados de acordo com parâmetros espermáticos, identificaram alterações com frequências que variam entre de 1 a 15%. Complementarmente, foi também demonstrado que certas alterações estão associadas a paragem da meiose no estágio de paquíteno, não tendo sido observados espermátídios redondos ou espermatozóides maduros nos túbulos seminíferos. A proteína TEX11 intervém na formação do complexo sinaptonémico e no estabelecimento dos pontos de quiasma no *crossing-over* cromossómico durante a meiose.

Dado o conhecimento atual e a importância/função do gene em questão e porque não há estudos na população portuguesa sobre este gene, este projeto visou analisar a nível molecular o gene *TEX11* em homens azoospermicos e avaliar as suas consequências para a fertilidade masculina. Para este fim, a estratégia de análise molecular compreendeu: i) otimização da PCR simples para os 29 exões do gene em questão; ii) otimização de PCR múltiplas para os diversos exões do *TEX11* visando a pesquisa de deleções; iii) pesquisa de alterações moleculares no gene em causa por sequenciação de nova geração (usando os produtos das PCR múltiplas), visando a identificação de alterações moleculares que possam afetar a função do gene/proteína; iv) avaliação das consequências funcionais de alterações detetadas através de análise *in silico*; v) estabelecimento de correlações genótipo/fenótipo; vi) pesquisa das alterações potencialmente patogénicas em homens férteis, detetadas no âmbito ponto iii); vii) confirmação destas alterações através da PCR simples e posterior sequenciação de Sanger.

Através desta abordagem foi possível analisar 80 homens azoospermicos, tendo sido também incluídas três amostras controlo, dois homens normozoospermicos e uma mulher. Detetaram-se 27 alterações em sequências flanqueadoras dos exões ou nos próprios exões, as quais, após análise *in silico* e avaliação da sua frequência em bases de dados e publicações científicas (*HGMD; 1000 Genomes*), culminaram com a seleção de 5 alterações presumivelmente patogénicas/provavelmente patogénicas devido a poderem afetar o processamento (*splicing*) do respetivo mRNA. Embora três destas alterações possam perturbar o *splicing*, dada a sua frequência na população é possível que não estejam associadas a consequências funcionais graves correspondendo a polimorfismos. Obteve-se assim, uma taxa de deteção de alterações com potencial patogénico de 2,5% (2/80), sendo ambas alterações sinónimas: c.924C>T (p.Gly314=) e c.450C>T (p.Ala150=), que ocorrem com baixa frequência (<1%) na população. Futuramente, a realização de estudos complementares poderá comprovar a patogenicidade destas alterações, nomeadamente, estudos *in vitro* ou em modelos animais, a análise da segregação das mesmas em famílias com homens inférteis, estudos de imunohistoquímica em biópsias testiculares, a análise de uma amostra significativa de homens férteis (normozoospermicos) e de um maior número de homens azoospermicos.

Palavras-chave: Infertilidade masculina, azoospermia, cromossoma X, *TEX11*

ABSTRACT

Research on the genetic determinants of male fertility in recent years has focused mainly on the analysis of the human genome by microarray and, more recently, on the sequencing of the exoma by Next Generation Sequencing (NGS). Despite the efforts made, no specific genomic alterations or pathogenic alterations have been detected with high frequency, associated with the pathology in question. Recently the *TEX11* gene located in Xq13.1 has been identified, in which a small number of studies demonstrated its importance for male gametogenesis/fecundity. These molecular studies, performed on samples of infertile men, selected according to sperm parameters, identified alterations with frequencies ranging from 1 to 15%. In addition, it has also been shown that certain alterations are associated with the arrest of meiosis in the pachytene stage, with no round spermatozoa or mature spermatozoa being observed in the seminiferous tubules. The *TEX11* protein intervenes in the formation of the synaptonemal complex and in the establishment of the chiasma points in the chromosomal crossing-over during meiosis.

Given the current knowledge and importance/function of the gene in question and because there are no studies in the Portuguese population about this gene, this project aimed to analyse, at the molecular level the *TEX11* gene in azoospermic men and evaluate its implications for male fertility. To reach this goal, the molecular strategy comprised: i) establishment of the PCR conditions for the 29 exons of this gene; ii) optimization of multiplex-PCRs for the *TEX11* exons to search for deletions; iii) search for molecular alterations in this gene by next generation sequencing (using the multiplex PCR products), aiming to identify molecular alterations that may affect the gene/protein function; iv) assessment of the functional consequences of the alterations by *in silico* analysis; v) establishment of genotype/phenotype correlations; vi) search of the potential pathogenic alterations in fertile men detected on point iii); vii) confirmation of these alterations using PCR followed by Sanger sequencing.

Through this approach it was possible to analyse 80 azoospermic men and 3 controls, two normozoospermic men and one woman. We detected 27 alterations/variants in introns or in exons t, which, after *in silico* analysis and evaluation of their frequency in scientific databases and publications (HGMD; 1000 genomes), culminated in the selection of 5 alterations that could be pathogenic/probably pathogenic affecting most probably the splicing. Although three of these changes may disrupt splicing, given their frequency in the population it is possible that they are not associated with severe functional consequences and most probably are polymorphisms. A rate of most probably pathogenic variants of 2,5% (2/80) was detected, both mutations being synonymous: c.924C>T (p.gly314=) and c.450C>T (p.Ala150=), occurring with low frequency (<1%) in the population. In the future, additional studies may prove the pathogenicity of these alterations, namely, *in vitro* or animal studies, segregation analysis in families with infertile men, immunohistochemical studies of testicular biopsies, analysis of a large number of fertile men (normozoospermic) and azoospermic men.

Keywords: Male Infertility, Azoospermia, X chromosome, *TEX11*

ÍNDICE

Agradecimentos.....	i
Resumo.....	iii
Abstract	iv
Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas.....	viii
Lista de Abreviaturas.....	x
Capítulo 1 - Introdução.....	1
1. Meiose e espermatogénese	1
1.1 Controlo endócrino da espermatogénese.....	5
2. Infertilidade masculina e principais causas	6
2.1 Principais causas da infertilidade masculina	8
2.1.1 Causas pré-testiculares	8
2.1.2 Causas testiculares.....	9
2.1.3 Causas pós-testiculares	16
2.1.4 Outros fatores: epigenética.....	16
3. Importância de estudar o cromossoma X: Gene <i>TEX11</i>	18
Capítulo 2 - Objetivos	22
Capítulo 3 - Materiais e Métodos.....	23
1. Estratégia de Análise Molecular.....	23
1.1 Amostras biológicas	23
1.2 Extração automática do DNA.....	24
1.2.1 Tecnologia de isolamento de DNA	24
1.3 Amplificação enzimática do DNA <i>in vitro</i> (PCR)	25
1.3.1 Conceito básico da PCR.....	25
1.3.2 Passos da PCR	25
1.3.3 Amplificação enzimática do DNA <i>in vitro</i> – PCR simples	26
1.3.4 Amplificação enzimática do DNA <i>in vitro</i> – PCR múltipla	27
1.4 Sequenciação nucleotídica de DNA	30
1.4.1 Sequenciação nucleotídica de DNA segundo o método de Sanger	30
1.4.2 Sequenciação nucleotídica de DNA: Sequenciação de Nova Geração	31
1.5 Restrição enzimática.....	34
1.6 Análise de resultados.....	36
1.6.1 PCRs múltiplas	36
1.6.2 Sequenciação de Nova Geração.....	36
1.6.3 Sequenciação de Sanger.....	40
1.6.4 Restrição Enzimática.....	40

Capítulo 4 - Resultados	41
1. Resultados	41
1.1 PCRs múltiplas	41
1.2 Sequenciação de Nova Geração	41
1.3 Restrição Enzimática.....	46
1.4 Sequenciação de Sanger	47
Capítulo 5 - Discussão de Resultados	50
1. Discussão de Resultados	50
1.1 Deleções em <i>TEX11</i> (PCRs múltiplas).....	50
1.2 Alterações pontuais detetadas no gene <i>TEX11</i> (Sequenciação de Nova Geração).....	51
Capítulo 6 - Conclusão e Prospetivas Futuras.....	57
Capítulo 7 - Bibliografia	58
Capítulo 8 - Anexos	64

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1. – Esquema dos diferentes passos da meiose	3
Figura 1.2. - Formação de células germinais masculinas	5
Figura 1.3. – Representação esquemática do locus AZF em Yq11	12
Figura 1.4. – Representação esquemática do gene <i>TEX11</i>	19
Figura 1.5. – Previsão dos domínios do gene <i>TEX11</i>	19
Figura 3.1. – Esquema adaptado do <i>Magna Pure 2.0 Instrument Operator's Manual</i> do Isolamento Automático de DNA.....	24
Figura 3.2. – Passos da purificação dos produtos de PCR - tecnologia de separação por <i>beads</i> magnéticas da Agentcourt AMPure XP	31
Figura 3.3. - Passos do Procedimento Experimental <i>Nextera XT</i>	32
Figura 3.4. - Fundamento da Sequenciação por Síntese	33
Figura 3.5. – Representação do que é possível visualizar no programa IGV	37
Figura 4.1. – Representação dos géis de agarose referentes aos multiplex	41
Figura 4.2. – Resultado da restrição enzimática com a enzima HaeIII	46
Figura 4.3. – Resultado da restrição enzimática com a enzima HphI	46
Figura 4.4. – Eletroferogramas resultantes da sequenciação de Sanger.....	48
Figura 5.1. – Representação esquemática das alterações provavelmente patogénicas no <i>TEX11</i> detetadas em homens com azoospermia.....	55
Figura 5.2. – Representação esquemática da possível consequência da alteração c.942C>T a nível do splicing e da proteína <i>TEX11</i>	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.1. – Resumo dos genes testados para o hipogonadismo hipogonadotrófico isolado: causas genéticas mais comuns	9
Tabela 1.2. – Classificação dos fenótipos da AIS	14
Tabela 1.3. – Genes cujas alterações estão associadas a criptorquidismo	15
Tabela 1.4. – Alterações patogénicas conhecidas no gene <i>TEX11</i>	21
Tabela 3.1. – Condições das PCRs simples para os 29 exões do gene <i>TEX11</i>	27
Tabela 3.2. – Temperatura de emparelhamento (T.E.) em graus Celsius (°C) para os 29 exões do gene <i>TEX11</i>	27
Tabela 3.3. – Condições da PCRs múltipla para o multiplex M5 do gene <i>TEX11</i>	28
Tabela 3.4. – Condições das PCRs múltiplas para os multiplex M3 a M10 exceto M5 do gene <i>TEX11</i>	29
Tabela 3.5. – Temperatura de emparelhamento (T.E.) em graus Celsius (°C), distribuição dos exões para os respetivos multiplex	29
Tabela 3.6. – Condições das Reações de Purificação dos produtos das PCRs simples	30
Tabela 3.7. – Condições das Reações de Sequenciação	31
Tabela 3.8. - Condições da sequenciação	33
Tabela 3.9. – Informações do NEBCutter para escolha das enzimas de restrição (exão 5-6)	35
Tabela 3.10. – Informações do NEBCutter para escolha das enzimas de restrição (exão 11)	35
Tabela 3.11. – Condições do ensaio de restrição enzimática para a enzima HaeIII	35
Tabela 3.12. – Condições do ensaio de restrição enzimática para a enzima HphI.	36
Tabela 4.1. – Alterações encontradas por NGS e o seu impacto a nível do splicing e da proteína. Resultados do programa HSF	42
Tabela 4.2. – Alterações encontradas por NGS e o seu impacto a nível do splicing e da proteína. Resultados do programa VEP	43
Tabela 4.3. – Alterações encontradas por NGS e o seu impacto ao nível do splicing e da proteína. Resultados do programa <i>Alamut Visual Software</i>	44
Tabela 4.4. – Classificação das alterações encontradas através da NGS	44
Tabela 4.5. - Alterações encontradas por NGS classificadas como potencialmente patogénicas	45
Tabela 4.6. – Descrição e frequência alélica das alterações conhecidas	45
Tabela 4.7. – Confirmação das alterações por sequenciação de Sanger	47
Tabela 5.1. – Predições dos algoritmos do HSF para os ESE e ESS para a alteração c.389A>G.	54
Tabela 5.2. – Predições dos algoritmos do HSF para os ESSE e ESS para a alteração c.1351G>A.	54
Tabela 5.3. – Predições dos algoritmos do HSF para os ESE para a alteração c.2541T>C	54
Tabela 5.4. – Predições dos algoritmos do HSF para os ESE e ESS para a alteração c.450C>T	54
Tabela 5.5. – Predições dos algoritmos do <i>Alamut Visual Software</i> para os sítios aceitadores de splicing para a alteração c.2541T>C	54
Tabela 5.6. – Predições dos algoritmos do <i>Alamut Visual Software</i> para os sítios dadores de splicing para a alteração c.942C>T e para o sítio dador wild-type (c.970)	54
Tabela 5.7. – Predições dos algoritmos do <i>Alamut Visual Software</i> para os sítios dadores de splicing para a alteração c.450C>T	54
Tabela 8.1. – Iniciadores usados no contexto do trabalho experimental	64
Tabela 8.2. – Informações sobre os reagentes	65
Tabela 8.3. – Constituição dos tampões de PCR utilizados no decorrer do trabalho experimental	65
Tabela 8.4. – Constituição dos tampões de restrição enzimática utilizados no decorrer do trabalho experimental	65

Tabela 8.5. – Coberturas médias por exão	65
Tabela 8.6. – Alterações detetadas e respetivo total de amostras e frequência por alteração.....	67
Tabela 8.7. – Amostras e respetivas alterações e localização das mesmas no gene TEX11	72

LISTA DE ABREVIATURAS

AFR: População Africana
AIS: Síndrome da insensibilidade aos androgénios
ALL: População Global
ALT: Alelo Alterado
AR: Gene do recetor de androgénios
AZF: *Azoospermia Factor*
BTB: Barreira hemato-testicular
CAIS: Síndrome da insensibilidade completa aos androgénios
CAVD: Ausência congénita dos vasos deferentes
CF: Fibrose quística
DNA: Ácido Desoxirribonucleico
DNMTs: DNA Metil Transferases
DSB: Quebras de dupla cadeia
ESE: *Exonic Splicing Enhancer*
ESS: *Exonic Splicing Silencer*
EUR: População Europeia
FSH: Hormona folículo-estimulante
GnRH: Hormona libertadora de gonadotrofinas
HSF: *Human Splicing Finder*
IBS: População da Península Ibérica
IGV: *Integrative Genomics Viewer*
IHH: Hipogonadismo hipogonadotrófico isolado
KS: Síndrome de Kallmann
LH: Hormona luteinizante
MAIS: Síndrome da insensibilidade suave aos androgénios
MGPs: Partículas magnéticas de vidro
NESE: Novo *Exonic Splicing Enhancer*
NESS: Novo *Exonic Splicing Silencer*
NGS: *Next Generation Sequencing*/Sequenciação de Nova Geração
NOA: Azoospermia não-obstrutiva
NSAS: Novo sítio aceitador de *splicing*
NSDS: Novo sítio dador de *splicing*
OMS: Organização Mundial de Saúde
PAIS: Síndrome da insensibilidade parcial aos androgénios
PAS: Potencial alteração do *splicing*
PCR: *Polimerase Chain Reaction*
PD/SEIS: Predição difícil/Sem evidência de impacto no *splicing*
PSIS: Provavelmente sem impacto no *splicing*
PTM: Células mioides peritubulares
QESE: *Exonic Splicing Enhancer* quebrado
QESS: *Exonic Splicing Silencer* quebrado
REF: Alelo de Referência
RNA: Ácido Ribonucleico
SC: Complexo sinaptonémico
SCOS: Síndrome de *Sertoli-Cell-Only*

SIC: Complexo de iniciação de sinapses

SIFT: *Sorting Intolerant From Tolerant*

SIS: Sem impacto no *splicing*

SK: Síndrome de Klinefelter

SSCs: Células tronco

SYCP2: *Synaptonemal Complex Protein 2*

T.E.: Temperatura de emparelhamento

TPRs: Repetições de tetratricopéptidos

UTI-INSa: Unidade de Tecnologia e Inovação do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge

VEP: *Variant Effect Predictor*

Yq: Braço longo do cromossoma Y

CAPÍTULO 1 - INTRODUÇÃO

1. Meiose e Espermatogênese

A formação de óvulos e de espermatozoides inicia-se de forma semelhante, com as respectivas células germinativas a progredirem para meiose (Alberts et al., 2002), a gametogênese requer, portanto, em última instância, que as células germinais diploides sofram este processo de redução genómica por forma a originar gametas funcionais (Griswold, 2016 e Lenormand, Engelsta, Johnston, Wijnker, & Haag, 2016).

O conjunto de cromossomas de um organismo que realiza reprodução sexuada consiste em autossomas, que são comuns a todos os membros da espécie e em cromossomas sexuais, que são distribuídos de forma diferente de acordo com o sexo do indivíduo. Um núcleo diploide contém duas versões muito parecidas de cada cromossoma. Para cada um dos pares de cromossomas autossómicos, um cromossoma foi inicialmente herdado do progenitor masculino (cromossoma paterno) e o outro inicialmente foi herdado do progenitor feminino (cromossoma materno). Estes cromossomas são muito semelhantes, mas não idênticos na sequência de DNA, são chamadas de homólogos e, na maioria das células, mantêm uma existência completamente separada como cromossomas independentes (Alberts et al., 2002).

Depois de um cromossoma ser duplicado pela replicação do DNA, as cópias gêmeas do cromossoma permanecem, em primeiro lugar, ligadas ao longo do seu comprimento e são chamadas de cromatídeos irmãos. Numa divisão celular mitótica, os cromatídeos irmãos alinham-se no equador do fuso acromático com os seus cinetocoros (complexos de proteínas associados aos centrómeros) e microtúbulos a apontar para polos opostos. Os cromatídeos irmãos separam-se completamente uns dos outros na anáfase para se tornarem cromossomas individuais. Desta forma, cada célula filha formada por uma divisão celular mitótica herda uma cópia de cada cromossoma paterno e uma cópia de cada cromossoma materno e, portanto, não é alterada na sua composição genética a partir da célula original (Alberts et al., 2002).

Pelo contrário, um gameta haploide produzido a partir de uma célula diploide através da meiose deve conter metade do número original de cromossomas. Deve conter apenas um cromossoma em vez de cada par de cromossomas homólogos, por isso é dotado da cópia materna ou paterna de cada gene, mas não de ambos. O mecanismo que evoluiu para realizar esta função adicional exige que os homólogos se reconheçam e se tornem fisicamente ligados lado a lado ao longo de todo o seu comprimento antes de se alinharem no fuso acromático (Alberts et al., 2002). O emparelhamento dos homólogos ocorre mediante a formação de inúmeras quebras na dupla cadeia de DNA (O'Connor, 2008 e Lenormand et al., 2016).

Antes deste acontecimento, cada cromossoma na célula diploide replica-se para produzir dois cromatídeos irmãos, como numa divisão celular mitótica. É somente após a conclusão da replicação do DNA que as características especiais da meiose se tornam evidentes. Cada par de cromossomas emparelha com o seu homólogo duplicado, formando uma estrutura chamada bivalente, que contém quatro cromatídeos (O'Connor, 2008). O emparelhamento ocorre durante uma longa profase meiótica (os estádios desta fase encontram-se descritos abaixo), que muitas vezes dura vários dias e até pode durar anos. O emparelhamento permite que a recombinação genética ocorra, pelo que um fragmento do cromatídeo materno pode ser trocado por um fragmento correspondente do cromatídeo paterno homólogo. Na metafase subsequente, todos os bivalentes se alinham no fuso e, na anáfase, os dois homólogos duplicados (cada um constituído por dois cromatídeos irmãos) separam-se um do outro, deslocam-se para polos opostos do fuso e a célula divide-se. Para produzir gametas haploides, no

entanto, é necessária outra divisão celular (Alberts et al., 2002, O'Connor, 2008 e Lenormand et al., 2016).

A divisão celular meiótica que descrita acima é referida como divisão I da meiose e não produz células com uma quantidade haploide de DNA. Como os cromátídeos irmãos se comportam como uma unidade, cada célula filha desta divisão herda duas cópias de um dos dois homólogos. As duas cópias são idênticas, exceto onde a recombinação genética ocorreu. As duas células filhas, portanto, contêm um número haploide de cromossomas, mas uma quantidade diploide de DNA. Estes diferem das células diploides normais de duas maneiras. Primeiro, as duas cópias de DNA de cada cromossoma derivam de apenas um dos dois cromossomas homólogos da célula original (exceto para os fragmentos trocados por recombinação genética). Em segundo lugar, essas duas cópias de DNA são herdadas como cromátídeos irmãos juntos (Alberts et al., 2002).

A formação dos núcleos haploides finais de cada gameta prossegue através de uma segunda divisão celular, a divisão II da meiose, sem replicação adicional do DNA. Os cromossomas duplicados alinham-se num segundo fuso, e os cromátídeos irmãos separam-se para produzir células com um conteúdo haploide de DNA. A meiose consiste, portanto, numa única fase de replicação de DNA seguida de duas divisões celulares. São assim produzidas quatro células haploides a partir de cada célula que entra em meiose (O'Connor, 2008).

Uma série de eventos complexos ocorre durante a longa profase da divisão meiótica I: os cromossomas homólogos duplicados emparelham, a recombinação genética é iniciada entre os cromátídeos não-irmãos e cada par de homólogos duplicados reúne-se numa estrutura elaborada, altamente conservada, chamada complexo sinaptonémico (SC) (Hillers, Jantsch, Martinez-perez, & Yanowitz, 2005). Em todos os organismos, o processo de recombinação é completado enquanto o DNA é mantido no complexo sinaptonémico, o que serve para espaçar os eventos de cruzamento ao longo de cada cromossoma (Alberts et al., 2002).

A profase da divisão meiótica I é tradicionalmente dividida em cinco estádios sequenciais - leptoteno, zigoteno, paquíteno, diploteno e diacinese (ver figura 1.1.) - definidos pelas mudanças morfológicas associadas à montagem (sinapse) e desmontagem (desinapse) do complexo sinaptonémico (Lenormand et al., 2016). A profase começa com o leptoteno, quando os homólogos emparelhados duplicados se condensam. No zigoteno, o complexo sinaptonémico começa a desenvolver-se entre os dois conjuntos de cromátídeos irmãos em cada bivalente. O paquíteno começa quando a sinapse está completa, e geralmente persiste por dias, até que a desinapse comece no estádio de diploteno, no qual os pontos de quiasma são vistos pela primeira vez (Alberts et al., 2002).

Os acontecimentos de *crossover* ocorrem durante a profase I, e embora possam ter lugar quase em qualquer ponto ao longo de um cromossoma, não são distribuídos uniformemente. Há *hot spots* de recombinação, onde as quebras na dupla cadeia de DNA parecem ser preferencialmente induzidas. Além disso, há indícios de que a ocorrência de um evento de *crossover* diminui a probabilidade de um segundo evento ocorrer num local próximo deste. Esta "interferência" parece garantir que o número limitado de *crossovers* esteja distribuído, de modo a que mesmo os cromossomas pequenos recebam pelo menos um *crossover*, ocorrência exigida para que os homólogos segreguem normalmente. Embora a base molecular da interferência seja desconhecida, pensa-se que o complexo sinaptonémico medeia esse processo (Alberts et al., 2002).

A profase I pode ocupar 90% ou mais do tempo da meiose (O'Connor, 2008). Embora seja tradicionalmente chamada de profase, esta assemelha-se realmente à fase G2 de uma divisão celular mitótica (Lenormand et al., 2016). O envelope nuclear permanece intacto e desaparece apenas quando o fuso meiótico começa a formar-se, pois a profase I cede lugar à metafase I e conseqüentemente à anafase I e telofase I (ver figura 1.1.) (Alberts et al., 2002 e Lenormand et al., 2016).

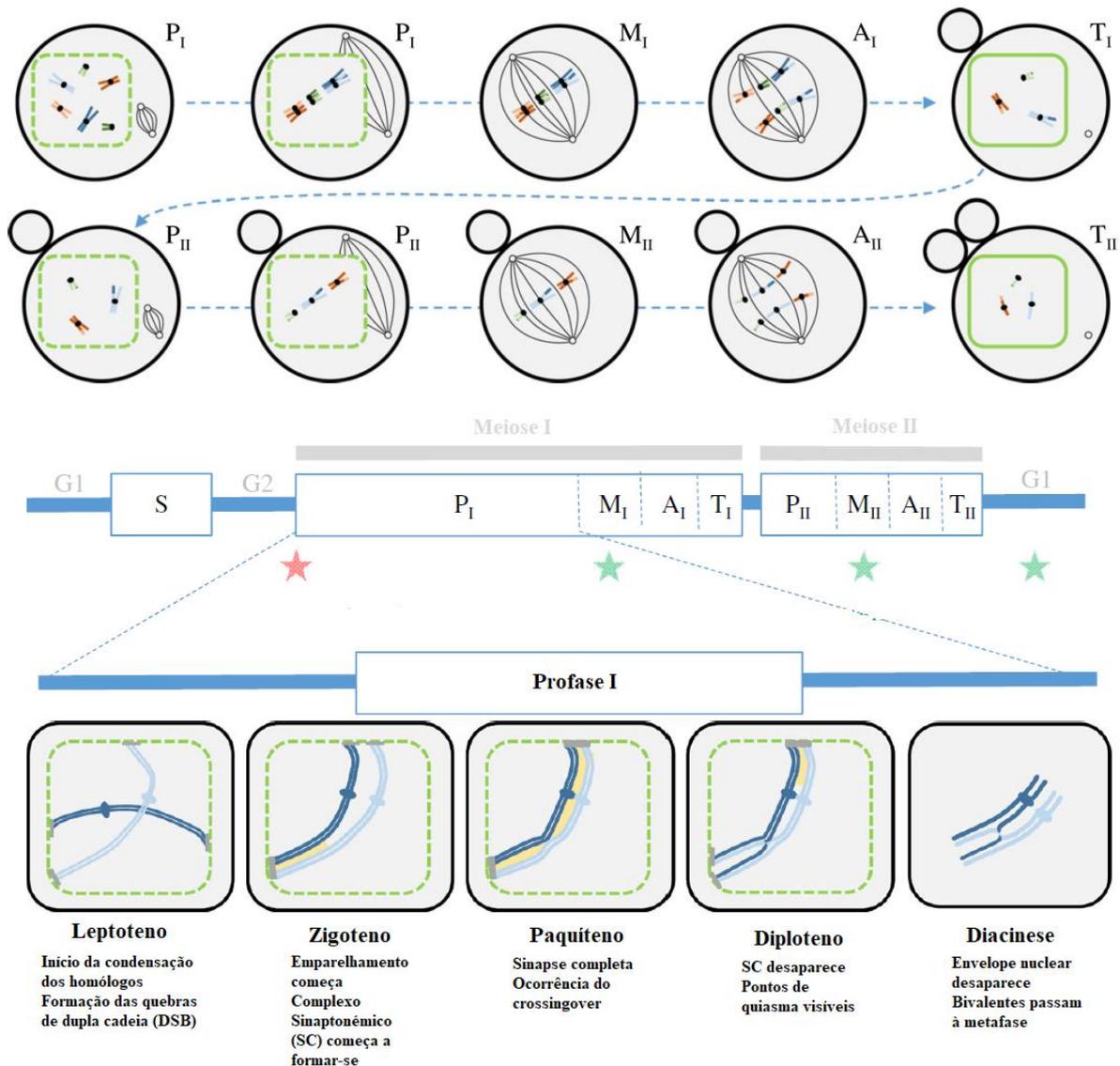


Figura 1.1. – Esquema dos diferentes passos da meiose. O painel superior ilustra as diferentes fases de uma típica meiose para cada uma das duas divisões meióticas: profase (P, com profase precoce e tardia distintas), metafase (M), anafase (A) e telofase (T). A membrana nuclear é indicada pelo contorno verde (tracejado quando começa a fragmentar-se). Os pequenos círculos pretos representam centros organizadores de microtúbulos e as linhas pretas representam microtúbulos do fuso acromático. Os cromossomas homólogos são representados com a mesma cor com tonalidades ligeiramente diferentes (por exemplo laranja e laranja claro). Os homólogos emparelham-se e segregam na meiose I, e os cromátídeos irmãos segregam na meiose II. O momento da paragem meiótica primária é indicado por uma estrela vermelha, enquanto o momento das paragens secundárias mais comuns em diferentes organismos é indicado por estrelas verdes. O painel inferior indica os passos importantes (formação de quebras na dupla cadeia de DNA, *crossingovers*) que ocorrem durante a profase I. O complexo sinaptonémico está representado a amarelo. A cromatina condensa nos cromossomas ao longo da profase I (apenas um par de homólogos é ilustrado). Adaptado de Lenormand et al., 2016.

A gametogénese nos mamíferos requer que as células germinais diploides passem pela meiose para serem obtidos gametas funcionais, como referido anteriormente. Nos homens, a meiose não se inicia até à puberdade e o seu papel é o de formar milhões de gametas necessários para a fertilidade masculina (Griswold, 2016). A fertilidade masculina depende, portanto, da produção diária e contínua de milhões de espermatozoides através da espermatogénese (Schlatt & Ehmcke, 2014).

A espermatogénese é então um processo fisiológico no qual as espermatogónias (diploides, 2n) se transformam em espermatozoides (haploides, n) através de divisões mitóticas, meióticas e espermiogénese, de modo a que um espermatozoide possa fertilizar um óvulo para gerar prole, que é essencial para a perpetuação da espécie (Xiao, Mruk, Wong, & Yan Cheng, 2014).

Este processo ocorre no epitélio do túbulo seminífero, a unidade funcional do testículo. O epitélio seminífero é dividido fisicamente pela barreira hemato-testicular (BTB) em dois compartimentos, os compartimentos basal e adluminal (apical) (Xiao et al., 2014).

Os túbulos seminíferos são constituídos por três tipos principais de células: as células mioides peritubulares (PTM), as células de Sertoli e as células germinais. As células PTM circundam a parede exterior do túbulo e contraem-se de modo a impulsionar os espermatozoides através do túbulo. As células de Sertoli transmitem sinais externos e fornecem fatores necessários para a proliferação e diferenciação das células germinativas. As células PTM cooperam com as células de Sertoli para produzir a membrana basal do túbulo seminífero e fornecem o nicho para as células tronco (SSCs) que produzem as células germinativas que se desenvolverão em espermatozoides. O citoplasma das células de Sertoli estende-se da membrana basal até o lúmen do túbulo que envolve as células germinativas em desenvolvimento. As células de Leydig estão presentes no espaço intersticial entre os túbulos e produzem testosterona, que se difunde nos túbulos seminíferos, bem como nos vasos sanguíneos no espaço intersticial (Smith & Walker, 2014).

A divisão das SSCs ao longo da membrana basal do túbulo seminífero inicia a espermatogénese. A proliferação das SSCs pode resultar na produção de duas novas células-tronco para manter a *pool* de células-tronco ou em espermatogónias indiferenciadas que estão destinadas a transformar-se em espermatozoides. As espermatogónias indiferenciadas sofrem uma série de divisões mitóticas com citocinese incompleta para formar cadeias de espermatogónias. Uma vez que as cadeias atingem um comprimento de 16 ou 32 células, sofrem diferenciação em massa para se tornarem espermatogónias diferenciadas que estão destinadas a tornarem-se espermatozóides. As espermatogónias diferenciadas passam por uma série de divisões, de tipo A₁ a A₄, passando por espermatogónias intermediárias e posteriormente a tipo B, com uma mitose final resultando na produção de espermatócitos pré-leptoteno (ou espermatócitos primários) que iniciam o processo de meiose (figura 1.2). Na conclusão da meiose, são produzidos espermatídios arredondados haploides que passam por diferenciação a espermatídios alongados e, finalmente, a espermatozoides (Smith & Walker, 2014, Xiao et al., 2014 e Stukenborg et al., 2014).

A espermatogénese é suportada por células de Sertoli somáticas que envolvem e nutrem as células germinativas em desenvolvimento. As células de Sertoli contribuem para o nicho necessário que mantém a renovação das células-tronco, como acima referido, de modo a que o desenvolvimento de células germinativas possa ser contínuo. As células de Sertoli também fornecem fatores de crescimento e nutrientes para o desenvolvimento de células germinativas. Durante o estadio inicial de pré-leptoteno, os espermatócitos atravessam a BTB, movendo-se do compartimento basal para o compartimento adluminal. Uma vez atravessada a BTB, as células germinativas continuam a transformar-se em espermatozoides num microambiente definido e protegido (Smith & Walker, 2014).

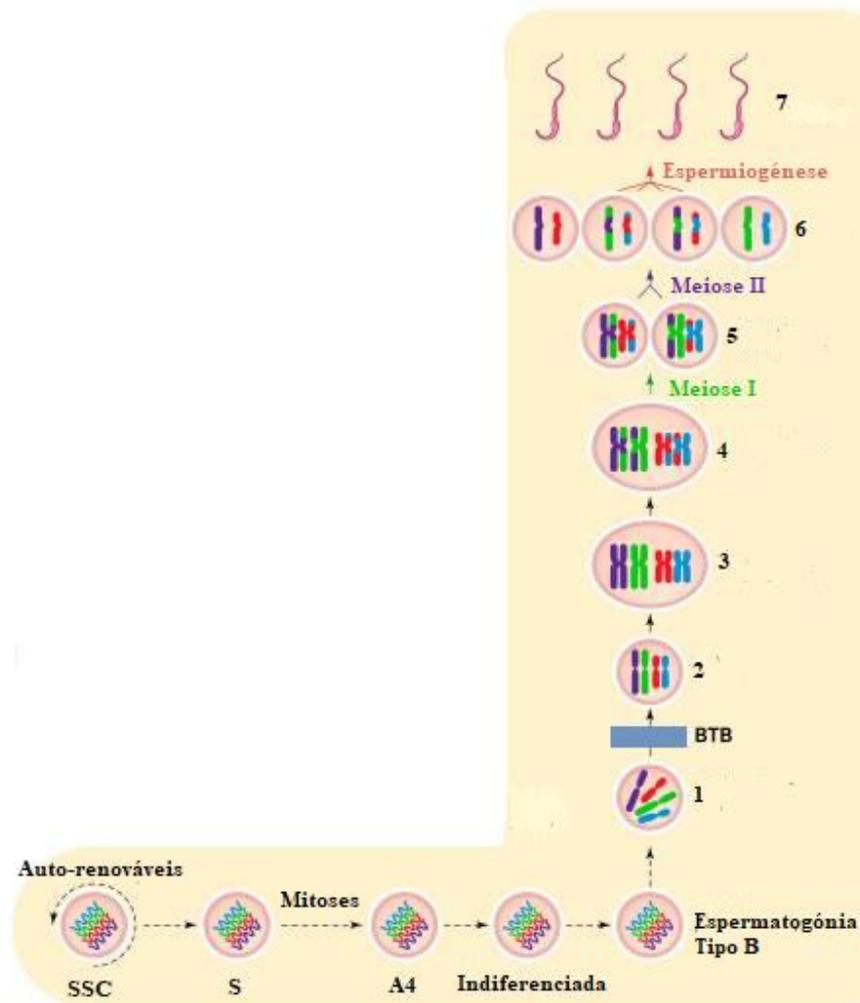


Figura 1.2. - Formação de células germinais masculinas. 1-Espermatócito pré-leptoteno; 2-Espermatócito em Zigoteno; 3-Espermatócito em Paquíteno; 4-Espermatócito em Diploteno; 5-Espermatócitos Secundários; 6-Espermatídios; 7-Espermatozoides. Adaptado de Xiao et al., 2014.

1.1. Controlo endócrino da espermatogénese

O controlo endócrino da espermatogénese é orientado pela atividade neuroendócrina ao longo do eixo hipotálamo-hipófise-testículo. Nos homens podem ser distinguidas 3 fases, com duração de meses a anos, de atividade pós-natal ao longo deste eixo antes da idade adulta. A primeira delas é a fase neonatal-infantil, que exibe atividade semelhante à fase adulta ao longo do eixo hipotálamo-hipófise-testículo, mas, com ausência de atividade espermatogénica. A segunda é a fase infantil-juvenil quando o eixo hipotálamo-hipófise-testículo é quiescente. Na fase final, a atividade do eixo hipotálamo-hipófise-testículo é reiniciada, acompanhada do início da espermatogénese na puberdade, levando a funções testiculares normais em adulto (Stukenborg et al., 2014).

O principal sinal hipotalâmico para a hipófise é a hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) que é secretada caracteristicamente de maneira robusta pulsátil e atua via recetor GnRH transmembranar. Por sua vez, os dois principais sinais endócrinos para os testículos, originários das gonadotrofinas hipofisárias que possuem recetores GnRH, são as hormonas folículo-estimulante (FSH) e luteinizante (LH) (Stukenborg et al., 2014).

As gonadotrofinas são secretadas de forma pulsátil em resposta à GnRH. Em geral, a libertação pulsátil da LH é robusta e semelhante à da GnRH, enquanto a libertação pulsátil da FSH é bastante lenta.

Ao nível do testículo, as duas gonadotrofinas, FSH e LH, medeiam as suas ações via recetores transmembranares específicos, FSH-R e LH-R, respetivamente. O FSH-R é expresso nas células de Sertoli dentro dos túbulos seminíferos, ao passo que o LH-R é expresso nas células de Leydig. Tanto a FSH (diretamente) como a LH (indiretamente via recetor de androgénios [AR]) exercem as suas ações na espermatogénese, principalmente através da regulação de fatores celulares (Stukenborg et al., 2014).

Em resposta às gonadotrofinas, são produzidos dois principais sinais endócrinos a partir dos testículos. Estes são a hormona esteróide testosterona, produzida pelas células de Leydig em resposta à ação da LH, secretada também de forma pulsátil, e a hormona não esteróide inibina, produzida pelas células de Sertoli em resposta à sinalização da FSH e é secretada de forma não pulsátil (Stukenborg et al., 2014).

Importa ainda mencionar que a testosterona é o principal androgénio no testículo que regula a espermatogénese. A testosterona atua como fator parácrino que se difunde nos túbulos seminíferos. Os efeitos dos androgénios são mediados pela AR, que é uma proteína localizada no núcleo e no citoplasma. Não existem recetores funcionais para os androgénios em células germinativas. Em vez disso, a testosterona difunde-se nas células de Sertoli e liga-se à AR presente no citoplasma e núcleo para iniciar as respostas funcionais necessárias para a realização da espermatogénese. A testosterona desempenha ainda um papel importante em determinados processos críticos da espermatogénese nomeadamente na manutenção da BTB, no suporte à conclusão da meiose, na adesão dos espermátídios às células de Sertoli e posterior alongação dos mesmos assim como também na libertação dos espermatozoides (Smith & Walker, 2014).

Juntas, estas hormonas gonadais são os principais sinais de feedback que mantêm a operação fisiológica do eixo hipotalâmico-hipofisário. O papel das gonadotrofinas durante a puberdade é principalmente estabelecer a população de células de Sertoli, de Leydig e germinativas e as suas respetivas funções que levarão à espermatogénese e à produção de espermatozoides normais (Stukenborg et al., 2014).

Note-se, por último, que dada a complexidade das interações ao longo do eixo hipotálamo-hipófise-testículo que envolve os processos de iniciação e manutenção da espermatogénese normal estes estão propensos a deficiências, devido a efeitos tóxicos, não apenas diretamente no nível do testículo, mas numa infinidade de outros pontos indiretos ao longo do eixo hipotálamo-hipófise-testículo (Stukenborg et al., 2014).

2. Infertilidade Masculina e Principais Causas

A infertilidade face à impossibilidade em procriar e à insatisfação pessoal dessa necessidade, tem implicações psicológicas, económicas e médicas que podem resultar em trauma e stress, particularmente numa configuração social como a nossa (Kumar & Singh, 2015). Definida como a incapacidade de conceber após um período de 12 meses de relações sexuais desprotegidas, é um problema de saúde reprodutiva em todo o mundo, que afeta igualmente homens e mulheres (Yang et al., 2015).

Não existem dados fiáveis para a prevalência global de infertilidade, mas as estimativas a nível global, sugerem que quase 72,4 milhões de casais têm problemas de fertilidade. De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), estima-se que 8 a 12% dos casais em todo o mundo sofram atualmente de infertilidade, contudo estas frequências variam em diferentes regiões do globo. Nas últimas décadas, a infertilidade afetou um número cada vez maior de casais. De acordo com Kumar & Singh, (2015), em valor absoluto a perturbação da fecundidade aumentou em cerca de 2,7 milhões em mulheres, passando de 4,56 milhões em 1982 para 7,26 milhões em 2002 e caiu ligeiramente para 6,71 milhões em 2006-2010. A taxa de fertilidade em homens com menos de 30 anos diminuiu cerca de 15% em todo o mundo no mesmo período (Kumar & Singh, 2015).

A infertilidade masculina refere-se à incapacidade de um homem engravidar uma mulher fértil. O fator masculino relativo à gametogênese corresponde a uma alteração na concentração de espermatozoides e/ou motilidade e/ou morfologia em pelo menos uma amostra de dois espermogramas, colhidas com 4 semanas de intervalo. A infertilidade masculina é geralmente devida a deficiências nos espermatozoides e a qualidade destes é usada como medida de fecundidade masculina. Os homens com parâmetros espermáticos abaixo dos valores normais definidos pela OMS são considerados inférteis, os parâmetros mais significativos são a baixa concentração de espermatozoides (abaixo de 12.000.000 a 16.000.000 espermatozoides/mL - oligozoospermia), a mobilidade alterada (mobilidade abaixo de 31 a 34% - astenozoospermia) e a morfologia anormal (espermatozoides morfologicamente normais abaixo de 3 a 4% - teratozoospermia) (WHO, 2010 e Kumar & Singh, 2015).

Assim, a análise do sémen (espermograma) continua a ser a análise mais útil e fundamental com uma sensibilidade de 89,6%, sendo capaz de detetar 9 em 10 homens com infertilidade. É um teste simples que avalia a formação e a maturação dos espermatozoides, bem como a forma como estes interagem no líquido seminal. Também fornece informação não só sobre a produção de espermatozoides (contagem), como também sobre a qualidade (motilidade, morfologia) (Kumar & Singh, 2015).

As causas subjacentes à infertilidade masculina são múltiplas, incluindo fatores fisiológicos, ambientais, sociais e genéticos; estudos em vários organismos modelo identificaram múltiplas vias moleculares e genéticas que regulam a fertilidade. Em particular, os modelos de ratos identificaram mais de 400 genes especificamente ou preferencialmente envolvidos na regulação da fertilidade, facilitando estudos genéticos de infertilidade em seres humanos. No homem, a infertilidade está mais definida em casos de azoospermia ou de oligozoospermia grave (Yang et al., 2015).

A azoospermia define-se como a ausência de espermatozoides no ejaculado. Se não forem observados espermatozoides, a OMS recomenda a análise da amostra centrifugada. Se não forem observados espermatozoides na amostra centrifugada, a análise do sémen deve ser repetida (WHO, 2010). A forma mais grave de azoospermia é a síndrome de *Sertoli-cell-only* (SCOS), que é definida como ausência total de células germinativas nos túbulos seminíferos. A azoospermia com paragem meiótica é uma forma considerada menos grave dado que ocorre paragem na formação das células germinativas no estágio de espermatócito. A atrofia testicular mista é ainda uma forma suave de azoospermia com um grau variável de células germinais e espermatozoides detetados nos túbulos seminíferos (Yatsenko et al., 2015).

As causas genéticas mais conhecidas da azoospermia não obstrutiva em humanos incluem alterações cromossómicas, como a síndrome de Klinefelter (SK) (47, XXY) e deleções no braço longo do cromossoma Y; estas causas representam ~25% da falência espermatogénica. Portanto, a maioria (~75%) dos casos de falência espermatogénica em humanos é idiopática e as causas subjacentes são postuladas como genéticas. No entanto, até à data, os esforços para descobrir alterações pontuais frequentes em genes únicos que contribuem para a falência espermatogénica humana têm sido em grande parte infrutíferos (Yang et al., 2015).

Dois grandes obstáculos dificultam a análise de genética molecular da infertilidade masculina humana. Tradicionalmente, muitas alterações monogénicas causadoras de doenças foram identificadas através de análises de *linkage* baseadas em árvores genealógicas, demonstrando que uma mutação co-segrega com uma doença em famílias com diversos elementos afetados em várias gerações e, portanto, poderá ser considerada causadora dessa doença. Esta abordagem convencional não é aplicável ao estudo da infertilidade masculina humana, porque os homens inférteis, em geral, não possuem descendentes biológicos; portanto, é difícil determinar se uma dada mutação constitui a causa da infertilidade. O segundo obstáculo são as considerações clínicas e éticas que limitam a disponibilidade de material biológico, nomeadamente a obtenção de biópsias testiculares de doentes para investigação e subsequentes validações (Yang et al., 2015).

2.1 Principais causas da Infertilidade Masculina

Como referido acima, a infertilidade masculina é uma condição multifatorial, ou seja, pode ser causada por variados fatores, sejam eles de origem genética ou ambiental. Como tal, são de seguida descritas algumas das causas mais comuns, existindo evidentemente muitas outras, que podem originar infertilidade nos homens; estas serão divididas em três grupos distintos: pré-testiculares, testiculares e pós-testiculares.

2.1.1 Causas pré-testiculares

A função normal do sistema regulatório hormonal do eixo hipotálamo-hipófise é crucial não só para a diferenciação e maturação dos órgãos reprodutores e respetivas funções em ambos os sexos, como também para a manutenção da produção de hormonas e para a gametogénese na vida adulta. Após a descoberta das estruturas e funções das hormonas reprodutivas e dos seus recetores, as alterações dos respetivos genes foram rapidamente tidas como responsáveis por uma variedade de distúrbios da função reprodutiva o hipogonadismo hipogonadotrófico hereditário, constitui um exemplo de uma doença genética que afeta a função do eixo hipotálamo-hipófise que contribui para a infertilidade masculina (Huhtaniemi & Alevizaki, 2007).

2.1.1.1 *Hipogonadismo Hipogonadotrófico*

O hipogonadismo hipogonadotrófico isolado (IHH) (OMIM #147950), é caracterizado pelo desenvolvimento sexual tardio ou ausente associado a níveis inadequados de gonadotrofinas, isto é, LH e FSH (Balasubramanian & Crowley, 2017) e esteroides sexuais, que pode estar relacionado com a ausência de anomalias anatómicas significativas ou funcionais no eixo hipotálamo-hipófise. Uma das principais causas subjacente ao IHH é a incapacidade de ativar a secreção pulsátil da hormona libertadora de GnRH durante a puberdade, uma etapa do desenvolvimento caracterizada, como visto acima, por um aumento substancial na frequência e amplitude de pulsos biossintese dessa hormona (Bianco & Kaiser, 2010).

Até à data, os maiores conhecimentos sobre os mecanismos moleculares que regulam a ativação da GnRH foram fornecidos pela identificação e estudo de anomalias genéticas em doentes com distúrbios na puberdade ou com infertilidade. Outros fenótipos anormais que são comumente associados e segregados com o hipogonadismo em famílias afetadas também ajudaram a identificar as alterações moleculares subjacentes. Um fenótipo relativamente frequente, é a anosmia ou ausência de olfato, a incapacidade de detetar odores, o que é explicado pela origem embrionária dos neurónios olfativos. O desenvolvimento primário dos neurónios produtores de GnRH é incomum na medida em que estes se originam fora do cérebro. Semelhante ao desenvolvimento das fibras olfativas, os neurónios GnRH são formados no epitélio olfativo primário, do qual migram através da via olfativa que ajuda a guiá-los até ao seu destino final no hipotálamo (Bianco & Kaiser, 2010).

A ausência de secreção de GnRH subjacente à ausência de migração dos neurónios olfativos, é a causa da síndrome de Kallmann (KS), que ocorre em cerca de 60% dos casos de IHH (IHH associada a anosmia). Consequentemente, as alterações genéticas associadas à síndrome de Kallmann codificam proteínas que regulam a migração neuronal olfativa e consequentemente a produção de GnRH. Outras anomalias neurológicas e somáticas, como a ataxia cerebelar, surdez neurosensorial, atraso mental, agenesia renal unilateral e fissura palatina, podem ocorrer associadas ao fenótipo da síndrome de Kallmann, o que sugere uma origem genética comum. Os mecanismos genéticos subjacentes aos restantes 40% dos casos de IHH em doentes com olfato normal (nIHH) são diversos e podem envolver

genes que regulam o desenvolvimento e/ou secreção e a ação da GnRH (Bianco & Kaiser, 2010 e Balasubramanian & Crowley, 2017).

O padrão de distribuição da doença com outros fenótipos associados sugere que podem ocorrer alterações em mais de um gene e/ou que fatores modificadores associados ao gênero sexual podem contribuir para o fenótipo. A evidência para a contribuição de fatores associados ao sexo na IHH é reforçada pela predominância masculina de 5:1 da doença. Além disso, os doentes do sexo masculino frequentemente apresentam um fenótipo mais grave do que as mulheres afetadas numa determinada família (Bianco & Kaiser, 2010).

Os genes cujas alterações são mais comumente associadas à síndrome de Kallmann e ao IHH normoosmótico estão identificadas na tabela 1.1. Existem, no entanto, um conjunto de genes que estando associados a estas patologias, mas que são menos comuns e, apesar dos recentes avanços, as causas genéticas da maioria dos casos de IHH permanecem desconhecidas (Balasubramanian & Crowley, 2017).

Tabela 1.1. – Resumo dos genes testados para o hipogonadismo hipogonadotrófico isolado: causas genéticas mais comuns (Balasubramanian & Crowley, 2017).

Gene	% Atribuída a Variantes Patogénicas neste Gene ¹	Fenótipo ao Nível Reprodutor
<i>KALI</i>	5%-10% (KS)	IHH
<i>CHD7</i>	5%-10% (KS ou nIHH)	IHH a puberdade normal ²
<i>FGFR1</i>	~10% (KS ou nIHH)	IHH a puberdade normal ² (afeta mais homens que mulheres)
<i>GNRHR</i>	5%-10% (nIHH)	IHH (recessivo); IHH a puberdade normal ² (variantes heterozigóticas patogénicas)
<i>IL17RD</i>	2%-5% (KS ou nIHH)	IHH a puberdade normal
<i>PROKR2</i>	~5% (KS or nIHH)	IHH (recessivo); IHH a puberdade normal ² (variantes heterozigóticas patogénicas)
<i>SOX10</i>	2%-5% (KS)	IHH
<i>TACR3</i>	~5% (nIHH)	IHH (recessivo); IHH a puberdade normal ² (variantes heterozigóticas patogénicas)

¹A proporção de IHH atribuída a estes genes é determinada por uma coorte de 950 doentes com IHH que foram testados para variantes raras (<1% da coorte controlo).

²Dependendo da penetrância, especialmente em casos de heterozigotia.

2.1.2 Causas testiculares

Um grande número de patologias pode levar à insuficiência testicular primária; fatores genéticos como a síndrome de Klinefelter, microdeleções no cromossoma Y e a síndrome da insensibilidade aos androgénios e outras doenças como a criptorquidia e a síndrome de *Sertoli-Cell-Only* são alguns exemplos de causas bem definidas que afetam a produção de espermatozoides (Krausz, 2011).

2.1.2.1 Síndrome de Klinefelter

A síndrome de Klinefelter é a aneuploidia cromossômica do sexo masculino mais comum. O fundo genético da SK é a presença de um cromossoma X extra, com 80% dos indivíduos afetados com cariótipo 47,XXY e os restantes casos apresentando mosaïcismo cromossômico 47,XXY/46,XY ou múltiplas aneuploidias cromossômicas do X, muitas vezes também com cromossomas Y adicionais.

50% dos casos são causados pela não disjunção cromossômica durante a primeira ou segunda divisão meiótica materna ou mesmo durante a mitose no zigoto em desenvolvimento, enquanto os outros 50% dos casos são causados por não disjunção durante a primeira meiose paterna. Sendo os homens Klinefelter geralmente inférteis (Chang, Skakkebaek, & Gravholt, 2015).

O marcador de genética molecular mais recorrentemente associado ao fenótipo Klinefelter, é o comprimento da repetição (CAG)_n do gene do recetor dos androgénios. Acredita-se que um número elevado de repetições esteja associado a uma baixa sensibilidade do recetor dos androgénios (Chang et al., 2015).

São ainda associados à SK outros genes candidatos, especialmente o gene associado à definição da estatura (*SHOX*) situado nos cromossomas X e Y, uma vez que este gene está envolvido não só no atraso do crescimento na síndrome de Turner, como também no aumento do crescimento em síndromes com aneuploidias sexuais através do chamado efeito de dosagem génica. Dado que o gene *SHOX* se localiza na região pseudoautosómica 1 dos cromossomas sexuais, não está sujeito à inativação do cromossoma X, que normalmente ocorre na mulher, assim como também nos cromossomas X supranumerários na SK (Chang et al., 2015) [a inativação do cromossoma X é o mecanismo que nos mamíferos compensa a diferença na dosagem de genes entre as mulheres XX e os homens XY. Mecanismos regulatórios genéticos e epigenéticos induzem o silenciamento transcricional de um dos cromossomas X nas células femininas (Berg et al., 2009)]. No entanto, a grande maioria das características clínicas presentes na SK não são explicadas pelo gene *SHOX* nem pelo mecanismo genético descrito acima e, portanto, falta uma compreensão mais abrangente da relação genótipo-fenótipo nesta doença (Chang et al., 2015).

As consequências hormonais do cariótipo de Klinefelter são o desenvolvimento de hipogonadismo hipergonadotrófico com diminuição dos níveis de androgénios, causando uma secreção hipofisária aumentada, da FSH e da LH, levando a um aumento relativo nos níveis de estrogénio, resultando numa proporção elevada de estrogénios em relação aos androgénios (Chang et al., 2015).

O hipogonadismo, tão pronunciado nesta síndrome, afeta o feto na vida fetal, dando origem a consequências mensuráveis na idade adulta. Estas descobertas correlacionam-se com a degeneração dos túbulos seminíferos e hiperplasia das células de Leydig durante a vida fetal, bem como com o aumento da prevalência de micro-pénis e criptorquidismo observados na SK. O efeito total do aparente meio hipogonadal intra-uterino presente na SK ainda não foi compreendido, mas pode também exercer uma influência negativa, especialmente na neuro-cognição e na "masculinização" do cérebro (Chang et al., 2015).

O hipogonadismo hipergonadotrófico resultante, observado na SK em adulto é, por outro lado, variado e relativo em relação aos níveis de testosterona tipicamente na faixa subnormal ou normal-baixa. Os níveis de estrogénio aumentam no início da puberdade e permanecem ligeiramente elevados, mas também podem ser normais (Chang et al., 2015).

2.1.2.2 Microdeleções no cromossoma Y

Depois do cariótipo 47,XXY, as microdeleções no cromossoma Y são a segunda causa genética mais frequente de infertilidade masculina, sendo a sua prevalência global de ~7,5% em homens inférteis (Krausz, Hoefsloot, Simoni, & Tuttelmann, 2014 e Colaco & Modi, 2018).

O braço longo do cromossoma Y (Yq) contém um grande número de segmentos de DNA repetidos, de elevada homologia e com orientação oposta, designados respetivamente por amplicões e palíndromas que o tornam predisposto a auto-recombinação durante a meiose e, portanto, suscetível a deleções intra-cromossómicas (Colaco & Modi, 2018).

Múltiplos estudos cromossómicos e de genética molecular realizados em homens inférteis, nomeadamente em homens azoospermicos e em oligozoospermicos, proporcionaram a identificação das

regiões do Y indispensáveis para a espermatogênese. Estas foram designadas como regiões do fator de azoospermia (AZF – *Azoospermia Factor*) e constituem uma área de grande interesse e de intensa investigação em reprodução humana. Esta região AZF é dividida em três regiões (AZFa, AZFb e AZFc) cada uma está associada a fenótipos de infertilidade distintos (Figura 1.3.A) (Vogt et al., 1996, Vogt, 2004 e Navarro-Costa, Plancha, & Gonçalves, 2010).

A região AZFa, sendo flanqueada por dois segmentos da sequência HERV com uma identidade de sequência de 94% potencializa a ocorrência de rearranjos/recombinações. Consequentemente, a deleção completa de AZFa (OMIM #400042) resulta da recombinação homóloga não alélica entre os dois elementos HERV conforme representado na Figura 1.3.B. Esta deleção está sempre associada à síndrome de *Sertoli-Cell-Only* e é um acontecimento bastante raro, representando menos de 5% das deleções de AZF descritas (Vogt, 2004 e Navarro-Costa et al., 2010).

Os fenótipos associados à deleção AZFb e a AZFc (OMIM #415000) são igualmente distintos estando associados, respetivamente, a paragem de maturação em espermatócito primário e hipoespermatogênese (Navarro-Costa et al., 2010).

A presença de amplos domínios amplicónicos em AZFb determina uma dinâmica de rearranjos peculiar. A deleção completa de AZFb parece ocorrer numa taxa semelhante ou ligeiramente acima da de AZFa (~3 a 10% de todas as microdeleções de Yq), apesar de ter um alvo de recombinação muito maior. O fenótipo de insuficiência espermatogénica associado à deleção completa de AZFb, é a azoospermia, revelando paragem no desenvolvimento de células germinativas no estadió de espermatócito/espermatídios, no entanto, em alguns casos, muito raros, foram reportados casos de espermatogênese completa. Assim, a probabilidade de encontrar espermatozoides nos testículos destes homens é extremamente baixas (Krausz et al., 2014 e Navarro-Costa et al., 2010).

A região AZFc é um dos domínios mais notáveis do genoma humano, exibindo uma estrutura e função intrincada, pois, AZFc é quase exclusivamente constituído por amplicões. Na verdade, a extensa homologia entre as unidades amplicónicas intrafamiliares é o substrato fértil para rearranjos estruturais em larga escala (deleções, duplicações e inversões), assim como também para outras modificações subtis na sequência (Krausz et al., 2014 e Navarro-Costa et al., 2010).

Em termos clínicos, homens com deleções completas de AZFc têm fenótipos variáveis, com níveis de produção de espermatozoides que variam entre a azoospermia e a oligozoospermia grave (que raramente excede 1 milhão de espermatozoides/mL). Embora nestes doentes a presença de espermatozoides no ejaculado seja um evento frequente (em ~50 a 60% dos casos), a conceção natural é extremamente rara devido à baixa contagem de espermatozoides. Representam aproximadamente 60% de todas as deleções reportadas em AZF, ocorrendo em um em cada ~4000 homens (Krausz et al., 2014 e Navarro-Costa et al., 2010).

Além das grandes deleções, foram identificadas deleções parciais, b1/b3 e b2/b3, que ocorrem dentro da região AZFc. Entre as deleções parciais, as gr/gr são as mais frequentes embora possa ainda ser controversa a sua contribuição para a infertilidade masculina para alguns autores. Estas deleções não eliminam completamente famílias de genes específicos com expressão testicular, mas reduzem o número de cópias dos seus genes. Portanto, o fenótipo associado a estas deleções pode variar de azoospermia a normozoospermia e pode diferir em função da origem étnica e geográfica (Bansal et al., 2016). As deleções parciais b2/b3, apresentam uma ligeira diferença no número de genes afetados comparativamente às deleções gr/gr. Com base na sequência de referência do cromossoma Y, as sequências das cópias de genes restantes após as duas deleções são praticamente idênticas, exceto no caso dos genes *DAZ*. Diferentes membros da família de genes *DAZ* são conhecidos por ter várias duplicações intragénicas e, como consequência, após cada uma das deleções, podem não ser funcionalmente equivalentes (Repping et al., 2003 e 2004).

Numa meta-análise realizada por Basal e colaboradores, foi demonstrado que as deleções parciais b2/b3 aumentam o risco de infertilidade, complementarmente demonstraram que as deleções b1/b3 parecem não ser importantes para a infertilidade masculina. No entanto, são necessários estudos adicionais para confirmar estes dados.

No ano em apreço, Colaco & Modi demonstraram uma vez mais, através da análise de mais de 17.000 cromossomas Y de homens férteis e inférteis, que as deleções gr/gr e b2/b3 estão associadas a infertilidade masculina.

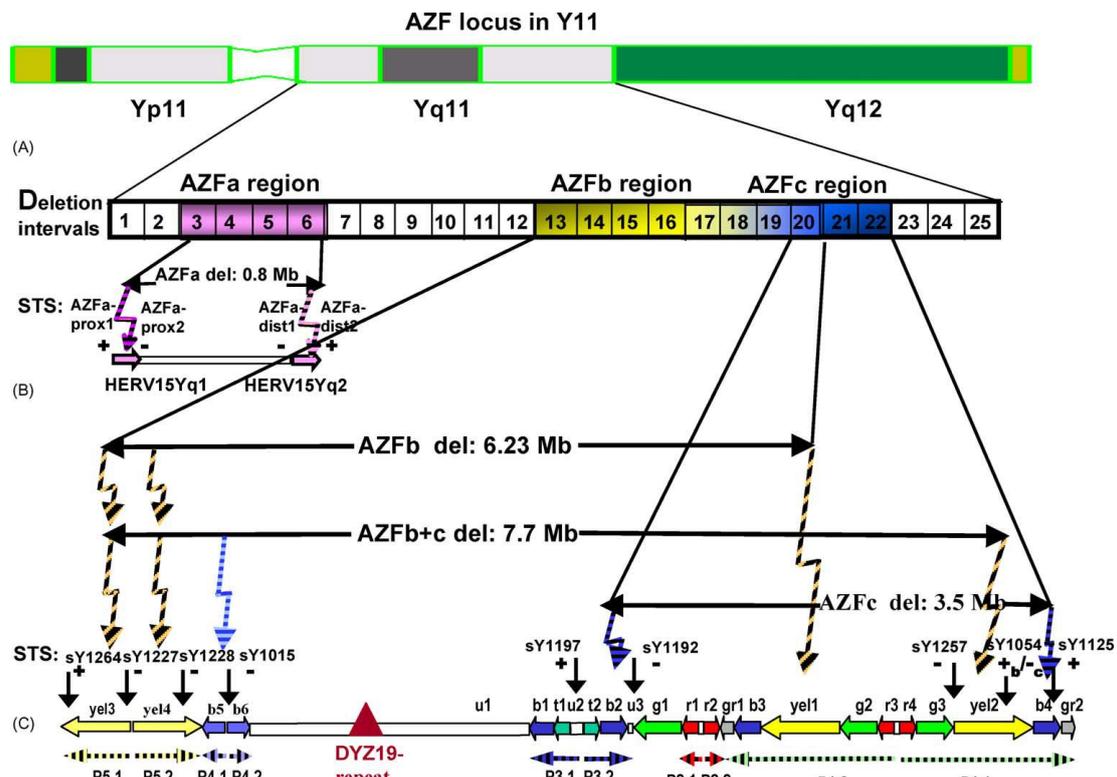


Figura 1.3. – Representação esquemática do locus AZF em Yq11. (A) O locus AZF subdividido em três regiões delecionais no mapa estabelecido por de Vogt et al., 1996, que dividiu Yq11 em 25 intervalos (D1-D25). (B) As deleções completas de AZFa, associadas sempre à síndrome de SCO, são causadas pela recombinação de dois blocos homólogos HERV15Yq1/q2 localizados em Yq11 proximal. As deleções completas de AZFb, associadas sempre a paragem meiótica, sobrepõem-se às deleções de AZFc como indicado e são causadas por recombinação entre grandes blocos de sequências repetitivas homólogas (amplições yel3 e yel1). De acordo com o código de cor de Kuroda-Kawaguchi et al., 2001, são designados como P1.1 e P1.2 (yel1 e yel2) no palíndromo P1 e P5.1 e P5.2 (yel3 e yel4) no palíndromo P5, respetivamente. Da mesma forma, as deleções de AZFc são causadas por recombinação entre os amplições azuis b2 e b4. O fenótipo associado à deleção de AZFc corresponde a atrofia mista de células germinativas nos testículos dos doentes e a hipoespermatogénese. Em doentes com deleção de AZFb+c, o ponto de quebra não se situa no ampliação azul b4, mas sim no ampliação amarelo yel2. Os STS que podem ser usados para detetar deleções completas de AZFa, AZFb ou AZFc recorrendo a PCRs estão indicados acima de cada ampliação; "-" significa ausência do respetivo marcador, "+" significa presença do respetivo marcador. O STS sY1054 está presente em doentes com deleção completa de AZFb ou AZFb+c, mas está ausente em todos os doentes com deleção de AZFc. (C) As cinco possíveis estruturas palindrômicas P1-P5 e a repetição DYZ19 em AZFb são marcadas com as extensões de ambos os braços abaixo da estrutura do ampliação num código de cor semelhante ao usado para os amplições correspondentes (Vogt, 2004).

2.1.2.3 Síndrome de Insensibilidade aos Androgénios

A síndrome de insensibilidade aos androgénios (AIS) (OMIM #300068), na sua forma mais grave, é geralmente caracterizada pela evidência de genitais externos femininos na altura do nascimento, desenvolvimento sexual secundário anormal aquando da puberdade e infertilidade. Uma adolescente com este distúrbio tem desenvolvimento mamário e crescimento pubertal na idade apropriada, mas sem menstruação; apresenta ausência de pelos púbicos e axilares ou estes podem estar presentes, mas em

Tabela 1.2. – Classificação dos fenótipos da AIS (Gottlieb & Trifiro, 2017).

Tipo	Genitália Externa	Características Fenotípicas
CAIS	Feminina	Derivados de dutos wolffinianos ausentes ou rudimentares
		Ausência ou presença de epidídimos e/ou vasos deferentes
		Testículos inguinais, labiais ou abdominais
		Vagina pequena
PAIS	Predominantemente feminina (“AIS incompleta”)	Testículos inguinais ou labiais
		Clitoromegalia e fusão labial
		Aberturas uretrais e vaginais distintas ou um seio urogenital
	Ambígua	Micro-pênis (<1 cm) com glândula subdesenvolvida semelhante a um clitóris; <i>labia majora</i> como escroto bífido
		Testículos descidos ou não descendidos
		Hipospádia perinoscrotal ou seio urogenital
		Ginecomastia na puberdade
	Predominantemente masculina	Hipospádias “isoladas” simples (glandulares ou penianas) ou graves (perineais) com um pênis de tamanho normal e testículos descendentes ou hipospádias graves com micro-pênis, escroto bífido e testículos descendentes ou não descendentes
MAIS	Masculina	Espermatogénese afetada e/ ou virilização afetada na puberdade
		Ginecomastia na puberdade

2.1.2.4 Criptorquidismo

O criptorquidismo (OMIM #219050) é uma das malformações congénitas mais frequentes nos homens, caracterizada pela não descida ou descida incompleta dos testículos que deverá ocorrer ainda no período fetal ou logo após o nascimento, tem uma prevalência ao nascimento que varia entre os 1,6% e os 5,7%. Os homens com esta doença têm um risco aumentado de serem inférteis bem como de desenvolverem cancro nos testículos (Grinspon, Gottlieb, Bedecarrás, & Rey, 2018).

É considerado uma doença de etiologia complexa na qual estão envolvidos fatores hormonais, genéticos, anatómicos e ambientais. Contudo, apesar de terem sido correlacionadas deleções em determinados genes com esta patologia em modelos animais, nomeadamente os genes *Insl3* e o seu recetor *Rxfp2*, *Hoxa10*, *Hoxa11* e *Ar*, alterações nos seus homólogos humanos não explicam, por si só, condição maioria dos casos com esta patologia, uma vez que, são pouco frequentes e também estão presentes na população normal. Existem, no entanto, alterações em determinados genes que foram relacionadas com criptorquidismo em seres humanos (ver tabela 1.3.) (José & Faruk, 2015).

A incidência de azoospermia em doentes com criptorquidismo unilateral (descida de um só testículo) é de cerca de 13%, por outro lado, no caso do criptorquidismo bilateral (não descida de ambos os testículos) é de 89%, sendo, por isso, a manifestação fenotípica masculina mais frequentemente associada a azoospermia não-obstrutiva (NOA) (José & Faruk, 2015).

Tabela 1.3. – Genes cujas alterações estão associadas a criptorquidismo.

Gene	Nome
<i>SOS1</i>	<i>Son of sevenless homolog 1 (Drosophila)</i>
<i>HOXD13</i>	<i>Homeobox D13</i>
<i>RAF1</i>	<i>Raf-1 proto-oncogene, serine/threonine kinase</i>
<i>SPATA12</i>	<i>Spermatogenesis associated 12</i>
<i>SOX2</i>	<i>SRY (sex-determining region Y)-box 2</i>
<i>ESR1</i>	<i>Estrogen receptor 1</i>
<i>HOXA10</i>	<i>Homeobox A10</i>
<i>FGFR1</i>	<i>Fibroblast growth factor receptor 1</i>
<i>NR5A1</i>	<i>Nuclear receptor subfamily 5, group A, member 1</i>
<i>ZNF215</i>	<i>Zinc finger protein 215</i>
<i>ZNF214</i>	<i>Zinc finger protein 214</i>
<i>KRAS</i>	<i>Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
<i>PTPN11</i>	<i>Protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11</i>
<i>RXFP2</i>	<i>Relaxin/insulin-like family peptide receptor 2</i>
<i>PWCR</i>	<i>Small nuclear ribonucleoprotein polypeptide N</i>
<i>CYP19A1</i>	<i>Cytochrome P450, family 19, subfamily A, polypeptide 1</i>
<i>INSL3</i>	<i>Insulin-like 3</i>
<i>PROKR2</i>	<i>Prokineticin receptor 2</i>
<i>KAL1</i>	<i>Anosmin 1</i>
<i>ARX</i>	<i>Aristaless-related homeobox</i>

2.1.2.5 Síndrome de Sertoli-Cell-Only

A síndrome de *Sertoli-Cell-Only* (SCOS) é definida pela ausência completa de células germinativas nos túbulos seminíferos e, dada a sua natureza, resulta sempre em infertilidade masculina e a sua etiologia muitas vezes permanece desconhecida. Embora, para a maioria destes doentes, as técnicas de reprodução medicamente assistida, com espermatozoides dos próprios, não seja possível, é importante identificar a origem que determina a infertilidade. Contudo, para um pequeno número de doentes nos quais é possível colher alguns espermatozoides, torna-se fundamental conhecer o defeito genético que causa o problema. Para estes doentes, a ICSI pode ser possível e, conseqüentemente, o defeito que determina a infertilidade é transmitido para a próxima geração se o descendente for do sexo masculino (Stouffs et al., 2016).

As anomalias no cariótipo, especialmente a síndrome de Klinefelter, são claramente as alterações mais comuns observadas em homens caucásicos azoospermicos com SCOS. As deleções em AZF detetadas em 9% dos homens com um cariótipo normal também estão muitas vezes associadas a SCOS. Atualmente, as deleções de AZF são rotineiramente examinadas na população infértil com azoospermia não obstrutiva ou oligozoospermia grave contudo a análise histológica é indispensável para estabelecer a relação em causa (Stouffs et al., 2016).

Stouffs e colaboradores concluíram que múltiplas CNVs podem ser (parcialmente) causais da SCOS. No entanto, continua a ser difícil determinar a importância funcional dos genes localizados nessas regiões. Os dados atuais mostram que especialmente os cromossomas sexuais estão envolvidos na etiologia da SCOS. Além disso, as CNVs no cromossoma X também podem estar predominantemente envolvidas na infertilidade masculina. Atualmente, a causa mais frequente de azoospermia não-obstrutiva com SCOS continua a ser a síndrome de Klinefelter (Stouffs et al., 2016).

2.1.3 Causas pós-testiculares

As causas pós-testiculares englobam doenças ou obstruções que impedem a saída/libertação de espermatozoides aquando da ejaculação.

2.1.3.1 Fibrose Quística e Ausência Congénita dos Vasos Deferentes

A fibrose quística (CF) (OMIM #219700) é uma doença multisistémica que afeta o trato respiratório, o pâncreas exócrino, o intestino, o sistema hepatobiliar e as glândulas sudoríparas exócrinas. Mais de 95% dos homens com CF são inférteis como resultado da ausência congénita dos vasos deferentes (CAVD) que pode ocorrer de forma bilateral ou unilateral (Ong, Marshall, & Karczeski, 2017).

A CF é uma doença autossómica recessiva que ocorre em 1 em cada 6000 indivíduos em Portugal (Mirtajani et al., 2017). Embora seja uma doença genética relativamente comum nos países ocidentais, a sua incidência é muito rara noutras regiões, como é o caso da Ásia Oriental. O gene da FC está localizado no cromossoma 7 e codifica um canal de cloreto sendo o seu produto génico uma proteína transmembranar denominada CFTR, que se encontra na membrana apical das células epiteliais que revestem as glândulas exócrinas. A ausência deste canal resulta num desequilíbrio das concentrações de iões ao longo da membrana celular/NO interior e exterior da célula e, como resultado, os fluidos secretados por essas glândulas tornam-se mais viscosos e, no final, os canais ficam congestionados e atrofiados (Mitchell, Toure, Coutton, & Arnoult, 2017).

Os homens com CAVD têm geralmente duas alterações suaves no gene *CFTR* ou a combinação de uma alteração grave e uma alteração suave (Song, Chiba, Ramasamy, & Lamb, 2016). Foram identificadas mais de 2000 mutações no gene *CFTR* (Mitchell et al., 2017) e, além disso, existe um polimorfismo no intrão 8 do gene em questão que influencia quantitativamente a produção da proteína CFTR. Os alelos da região polimórfica da timina no intrão 8 contêm cinco (5T), sete ou nove timinas. O alelo 5T está associado a níveis reduzidos da proteína CFTR funcional (Song et al., 2016).

A espermatogénese e o desenvolvimento testicular são geralmente normais em doentes com CAVD e os espermatozoides podem ser recuperados a partir dos epidídimos ou dos testículos para serem utilizados em reprodução medicamente assistida (Song et al., 2016 e Ong et al., 2017).

2.1.4 Outros fatores: epigenética

Como referido anteriormente, a causa da infertilidade masculina é multifatorial, por isso, além dos três grupos de doenças referidas, existem fatores como a idade, estilo de vida, massa corporal e fatores ambientais, que podem ter impacto nesta doença ao nível da desregulação das modificações epigenéticas, nomeadamente da metilação do DNA (Nevin & Carroll, 2015).

Ao longo dos anos tem sido sugerido que a desregulação das modificações epigenéticas, em particular da metilação do DNA genómico dos espermatozoides, pode ter um papel importante no desenvolvimento de várias doenças. As modificações epigenéticas desempenham um papel fundamental, dado que regulam o desenvolvimento e a manutenção das células germinativas masculinas. Assim, o *imprinting* anormal como resultado da desregulação da metilação do DNA pode estar associado a infertilidade masculina (Cui et al., 2016).

A epigenética refere-se, portanto, a alterações hereditárias na cadeia de DNA que ocorrem por mecanismos diferentes das alterações na sequência nucleotídica referida cadeia. Em contraste com a genética tradicional em que a alteração provoca a modificação direta na sequência do DNA, a epigenética envolve um conjunto complexo de mecanismos regulatórios que ocorrem no DNA, refletem-se na cromatina e influenciam a expressão génica, sem afetar a própria sequência de nucleótidos. O

controle epigenético consequentemente, pode modificar o fenotípico sem afetar o genótipo. Este processo é a força motriz fundamental da variação no tipo e função das células durante a diferenciação do zigoto para o organismo multicelular. Os sistemas moleculares conhecidos por iniciar e manter o epigenoma são a metilação do DNA e as modificações da cromatina incluindo a metilação e acetilação de histonas (Nevin & Carroll, 2015).

A metilação do DNA é o mecanismo epigenético mais bem estudado em mamíferos. É um regulador importante da expressão gênica e da diferenciação celular. A capacidade do padrão de metilação do DNA ser mantido de forma estável (ou seja, herança somática) através da divisão celular é o princípio fundamental por detrás da diferenciação e dos processos em que as células são capazes de interagir com o meio ambiente. A metilação do DNA consiste na ligação covalente de grupos metilo a bases de DNA, ocorrendo principalmente na posição 5' de bases de citosina no DNA eucariótico. A metilação das citosinas ocorre com mais frequência nos dinucleótidos CpG, onde uma citosina precede uma guanina, embora a metilação da citosina também possa ocorrer nos locais CpA, CpT e CpC. Os dinucleótidos CpG geralmente agrupam-se em ilhas CpG e são comumente encontrados na região promotora 5' de genes onde a metilação suprime e promove a expressão gênica. Este mecanismo é conduzido pela ação de DNA Metil Transferases (DNMTs), que convertem a citosina em 5-metilcitosina (5mC) (Nevin & Carroll, 2015, Gunes, Arslan, Hekim, & Asci, 2016 e Cui et al., 2016).

A DNMT1, por exemplo, é responsável pela manutenção da metilação do DNA durante a replicação do DNA e é denominada por metiltransferase de manutenção. As DNMT3A, DNMT3B e DNMT3L medeiam a metilação *de novo* do DNA genômico durante a fase inicial do desenvolvimento embrionário, especificamente em células germinativas, e as suas atividades são essenciais para a espermatogénese adequada (Gunes et al., 2016).

A metilação do local CpG no promotor ou nas regiões reguladoras é tipicamente associada à repressão de genes, enquanto a falta de metilação promove a atividade transcricional. A metilação provoca a repressão transcricional através do bloqueio direto da ligação do fator de transcrição ao DNA, ou através do reconhecimento da proteína de ligação à metil-CpG de sítios metilados e do recrutamento de co-repressores (Nevin & Carroll, 2015).

Este mecanismo desempenha papéis importantes no desenvolvimento e diferenciação embrionária, inativação e *imprinting* do cromossoma X e supressão da atividade de transposões. No entanto, estes processos epigenéticos não são apenas um fenómeno associado ao desenvolvimento; a metilação do DNA continua a funcionar ao longo da vida, respondendo a fatores ambientais de modo a causar alterações nos programas de regulação de genes de células somáticas. Esta plasticidade epigenética é influenciada por inúmeros fatores, como os referidos acima. Os gametas devem, por isso, estar isentos deste tipo de modificações epigenéticas, mas estudos recentes sugerem que algumas marcas de metilação anormais podem ser mantidas, o que pode ter implicações transgeracionais para a saúde das gerações futuras (Nevin & Carroll, 2015).

2.1.4.1 Metilação do DNA e Infertilidade Masculina

Tem sido frequentemente demonstrado que alterações na metilação do DNA em genes relacionados particularmente com a reprodução podem explicar alguns casos de infertilidade idiopática. Existe de facto uma associação entre casos de infertilidade idiopática e a metilação aberrante de DNA do genoma inteiro ou de alguns genes em espermatozoides. Além disso, estudos recentes demonstraram que os micro RNAs não-codificantes e diferentes modificações da cauda das histonas também podem ter um papel na infertilidade masculina (Noveski et al., 2016 e Gunes et al., 2016).

Recentemente, foi também demonstrada uma associação significativa entre polimorfismos na DNMT1 (rs16999593, rs2228612 e rs2228611) e a oligozoospermia numa população chinesa. O papel destes polimorfismos na patogénese da oligozoospermia permanece desconhecido, mas estes

polimorfismos podem levar a uma diminuição dos níveis de expressão da DNMT1 e afetar a espermatogênese (Gunes et al., 2016).

Importa ainda referir que Cui e colaboradores relataram que, de facto, existe um maior número de alterações no padrão de metilação do DNA de indivíduos com baixa contagem de espermatozoides, i.e, oligozoospermicos e que, por esta razão, estas duas ocorrências podem estar correlacionadas. Afirmam ainda que os padrões anormais de metilação do DNA observados nestes homens podem ser devidos à falha de re-metilação em espermatogónias ou a alterações na manutenção da metilação em espermatócitos ou espermatozoides maduros. Além disso, a metilação anormal do DNA pode estar associada à ativação anormal das DNMTs. Os estudos sobre os mecanismos subjacentes à regulação da metilação do DNA durante a espermatogênese estão ainda na sua fase inicial e, por essa razão, inúmeras questões permanecem por responder, sendo por isso necessários mais estudos (Cui et al., 2016).

3. Importância de Estudar o Cromossoma X: Gene *TEX11*

O cromossoma X dos mamíferos encontra-se enriquecido em genes específicos de células germinativas expressos durante a espermatogênese. Quase um terço dos genes expressos especificamente em células germinais encontram-se mapeados no cromossoma X, tal sugere que este cromossoma desempenha um papel importante na espermatogênese. Dado que os homens são hemizigóticos para o cromossoma X, as alterações em genes ligados ao X ocorrem em genes de cópia única e não podem ser compensadas pelo alelo normal correspondente, como se verifica em portadores heterozigóticos de alterações em doenças autossómicas recessivas. Portanto, as alterações em genes essenciais para a fertilidade ligados ao X, em homens, podem representar uma proporção significativa de causas da infertilidade (Yang et al., 2015).

Como referido acima, muitos estudos em modelos de rato relacionaram centenas de genes com a azoospermia e com infertilidade, fornecendo uma perspetiva dos mecanismos moleculares subjacentes a esta patologia nestes modelos uma vez que a perda de função destes genes causa infertilidade. No entanto, poucos estudos em humanos com azoospermia identificaram alterações em genes que estão associados a azoospermia em ratos (e.g. *Hsf2*, *Sycp3*, *Prm1*, *Prm2*, *Sohlh1* e *Nr5a1*). Isto pode ser explicado pelo baixo poder discriminativo de um único gene candidato, pois, centenas de genes podem contribuir para a azoospermia (Yatsenko et al., 2015).

O *Tex11*, por exemplo, é essencial para a fertilidade em ratos. A disrupção da função deste gene causa paragem meiótica em machos, resultando em azoospermia (Yang et al., 2015). Foi originalmente identificado como um gene específico de células germinativas ligado ao X no rato e a sua transcrição está presente em células germinativas em diferentes estadios espermatogénicos, incluindo espermatogónias tipo A e tipo B, espermatócitos e espermatídios. Durante a meiose, um nível elevado da proteína *Tex11* é mantido do estadio pré-leptoteno para o estadio de zigoteno, no entanto, é sub-expressa nos espermatócitos em paquíteno (Tang, Zeng, Clark, & Dobrinski, 2011).

O estudo de Yang e colaboradores, estabelece que o *TEX11* está implicado/participa no início das sinapses cromossómicas. É importante referir que o *TEX11* interage com o *SYCP2* (*Synaptonemal Complex Protein 2*), que é necessário para as sinapses cromossómicas no decorrer da meiose I. Adicionalmente, o *TEX11* pode contribuir para o alongamento ou estabilização do complexo sinaptonémico. Assim, na ausência do *TEX11*, a sinapse dos cromossomas pode ser iniciada, mas não propagada ou mantida. Embora pouco se saiba sobre os fundamentos moleculares da iniciação das sinapses em mamíferos, este processo tem sido amplamente estudado em leveduras. Um conjunto de proteínas de levedura (*Zip2*, *Zip3*, *Zip4*, *Msh4*, *Msh5*, etc.), conhecido como SIC (complexo de iniciação de sinapses) ou proteínas ZMM, são necessários tanto para a iniciação da sinapse cromossómica como para a recombinação meiótica. *TEX11* possui alguma homologia de sequência com o *Zip4* da levedura

e o ZIP4 de *Arabidopsis*. Existem ainda evidências de que o *TEX11* também desempenha um papel distinto na recombinação meiótica (Yang et al., 2008 e Adelman & Petrini, 2008).

Foi ainda demonstrado pelos mesmos autores que a *TEX11*, codificada pelo cromossoma X, é uma proteína específica da meiose, e a sua perda provoca falência meiótica em ratinhos machos. Isto teve implicações importantes para a infertilidade masculina em seres humanos uma vez que alterações no *Tex11* causam azoospermia em ratos, alterações no gene *TEX11* humano também poderiam causar infertilidade no homem (Yang et al., 2008).

O *TEX11* é um gene que se localiza no cromossoma X (Xq13.1), é composto por 31 exões, 29 dos quais são codificantes (sequências de referência: NM_001003811.1; NP_001003811.1; ENST00000395889 (ver Figura 1.4.). Contém um domínio específico da meiose (SPO22) e 3 repetições de tetratricopéptidos (TPRs) de função desconhecida (Figura 1.5.). A proteína *TEX11* está presente no complexo sinaptonémico na profase I e interage com os componentes do complexo proteico de reparação do DNA de cadeia dupla. Regula a sinapse dos cromossomas homólogos e a reparação de quebras no DNA em cadeia dupla. É essencial para a formação do complexo sinaptonémico e para a formação dos pontos de quiasma no *crossover* cromossômico. A proteína é altamente conservada e a sua função é conservada entre espécies (Yatsenko et al., 2015).

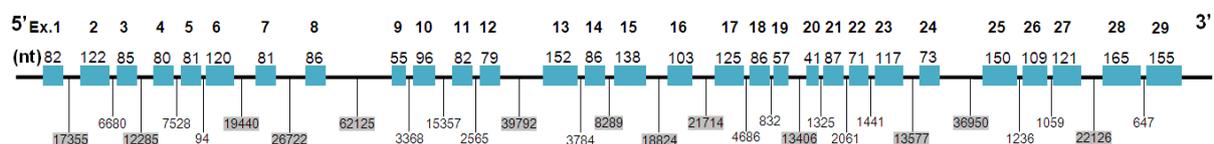


Figura 1.4. – Representação esquemática do gene *TEX11*. Os quadrados azuis representam os exões e por cima estão indicados os respectivos tamanhos. Os números entre os exões representam o tamanho dos respectivos intrões.

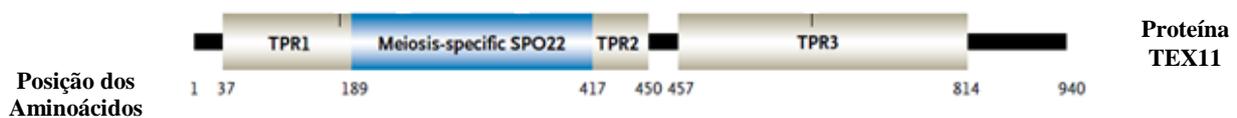


Figura 1.5. – Previsão dos domínios do gene *TEX11*. Três regiões de tetratricopéptidos (TPR) (posições de aminoácidos 37-188, 418-450 e 457-814) e o domínio específico da meiose (SPO22) (posições de aminoácidos 189-417) (Yatsenko et al., 2015).

Dada a potencial importância das alterações no gene *TEX11* para a infertilidade masculina, foram realizados recentemente, dois estudos que compreenderam a pesquisa de alterações moleculares em homens inférteis neste gene (Yang F., 2015 e Yatsenko A., 2015).

No estudo de Yang F e colaboradores (2015), é possível verificar que as frequências de alterações no gene *TEX11* em homens azoospérmicos sugerem que este gene é necessário para a espermatogénese em humanos; em cerca de 1% dos homens azoospérmicos estudados a sua condição pode ser explicada por alterações neste gene. Esta percentagem foi calculada tendo em conta apenas três alterações encontradas neste gene numa amostra de 246 homens azoospérmicos representadas na tabela 1.4. [uma mutação *frameshift* no exão 16, uma mutação *no sítio aceitador de splicing* do intrão 21 e uma mutação *missense* no exão 26 (a sequência de referência usada por estes autores foi a NM_031276)]. Dado que centenas ou até mesmo milhares de genes intervêm na gametogénese masculina, esta percentagem é bastante significativa. Esta frequência é comparável com a frequência de mutação em *BRCA1* (~2%) no cancro da mama. Encontrar uma elevada frequência de alterações no *TEX11* entre homens inférteis não é completamente inesperado uma vez que é um gene ligado ao cromossoma X e, portanto, qualquer mutação herdada ou *de novo* que altere a função deste fator essencial para a gametogénese masculina poderá manifestar-se na forma de infertilidade. Complementarmente, no estudo em causa, foram realizados estudos histológicos em biópsias testiculares, incluindo a dois

homens azoospermicos com alterações no *TEX11*, tendo-se observado paragem meiótica no estadio de paquíteno, indicando mais uma vez que o *TEX11* tem um papel crucial na meiose masculina (Yang et al., 2015).

No estudo de Yatsenko A e colaboradores (2015) foi, em primeiro lugar, identificada uma deleção intragénica de 99-kb no gene *TEX11* em dois doentes não familiares entre si, esta deleção envolve três exões e compreende 79 aminoácidos que se encontram dentro do domínio específico da meiose SPO22. A região genómica selecionada é rica em segmentos de DNA repetitivos, de elevada homologia, incluindo repetições de sequências Alu, provavelmente envolvidos na transposição de segmentos de DNA que deverão proporcionar a ocorrência de rearranjos genómicos em torno dos exões 9 e 12. A estrutura molecular da deleção identificada sugere que a mesma terá ocorrido através de um mecanismo complexo que envolve uma inversão inicial da região que conduz a deleções, duplicações ou ambas no cromossoma X (Yatsenko et al., 2015). Neste estudo foram ainda identificadas alterações pontuais em 7 de 289 doentes com azoospermia (2,4%), três alterações que afetam o *splicing* e duas alterações *missense*, que estavam ausentes nos 384 controlos com concentrações normais de espermatozoides (ver tabela 1.4.). O exame histológico dos doentes com azoospermia e com alterações no *TEX11* revelou que a maioria destas alterações foram detetadas em doentes com paragem completa da meiose no estadio de paquíteno (5 de 33 doentes, 15%); somente duas alterações (2 de 193 doentes, 1%) foram detetadas em doentes com azoospermia e atrofia testicular mista; nenhuma mutação foi detetada em doentes com azoospermia e síndrome de *Sertoli-Cell-Only* (Yatsenko et al., 2015).

Neste estudo, os autores em causa evidenciam que deleções e alterações que afetam o *splicing* perturbam gravemente a estrutura terciária do domínio da SPO22 e de toda a proteína, modificando a sua função ou estabilidade. Colocam ainda a hipótese de que as alterações no *TEX11* perturbam a formação e função do complexo sinaptonémico provocando uma disrupção da sinapse no estadio de paquíteno e nos pontos de controlo do fuso em anafase; esta disrupção desencadeia, por isso, a paragem meiótica no estadio de paquíteno, a apoptose dos espermatócitos e azoospermia. Segundo Yatsenko A e colaboradores, este modelo é suportado por análise estrutural *in silico* e por resultados de imunocoloração em doentes com azoospermia, paragem meiótica e alterações no *TEX11*. Nesses doentes, não detetaram expressão do *TEX11* e observaram perda maciça de espermatócitos tardios e espermatídios redondos e alongados (Yatsenko et al., 2015).

Na Tabela 1.4. encontram-se compiladas todas as alterações que se conhecem neste gene até à data e que são consideradas patogénicas.

Tabela 1.4. – Alterações patogênicas conhecidas no gene *TEX11*. Adaptado de HGMD Professional 2017.3 (sequência de referência: NM_001003811.1; NP_001003811.1; ENST00000395889).

^(a)Esta alteração apesar de estar incluída neste grupo é uma alteração que, segundo Yatsenko e colaboradores, também afeta o *splicing*.

Nos pontos a seguir estão referidas as alterações referenciadas por Yang e colaboradores tendo em conta a sequência de referência NM031276.

^(b)Alteração *missense* c.2243T>C

^(c)Alteração no aceitador de *splicing* -1G>A (-1 refere-se à última base do intrão, neste caso, intrão 21)

^(d)Alteração *frameshift* c.1258ins(TT)

Alterações Missense/Nonsense					
HGVS (cDNA)	HGVS (Proteína)	Número de Doentes	Fenótipo Reportado	Referência	
c.450C>T ^(a)	p.A150=	1	Azoospermia com atrofia testicular mista	Yatsenko A et al (2015)	
c.511A>G	p.M171V	1	Azoospermia com paragem da meiose no estadio de paquíteno	Yatsenko A et al (2015)	
c.2092G>A	p.A698T	1		Yatsenko A et al (2015)	
c.2288T>C ^(b)	p.V763A	1		Yang F et al (2015)	
Alterações de Splicing					
HGVS (cDNA)	Número de Doentes		Fenótipo Reportado	Referência	
c.792+1G>A	1		Azoospermia com paragem da meiose no estadio de paquíteno	Yatsenko A et al (2015)	
c.1838-1G>A ^(c)	1			Yang F et al (2015)	
c.1837+1G>C	1			Yatsenko A et al (2015)	
Pequenas Inserções/Deleções					
HGVS (cDNA)	Número de Doentes		Fenótipo Reportado	Referência	
c.1303_1306delGATGinsTTGGTA ^(d)	1		Azoospermia	Yang F et al (2015)	
Rearranjos Complexos					
Descrição			Número de Doentes	Fenótipo Reportado	Referência
~99 kb del. inclui ex.10-12, 268bp e inversão do intrão 9			1	Azoospermia com atrofia testicular mista	Yatsenko A et al (2015)
			1	Azoospermia com paragem da meiose no estadio de paquíteno	

CAPÍTULO 2 - OBJETIVOS

O gene *TEX11* é um gene cuja análise molecular é relevante devido não só à sua função ao nível da espermatogénese e expressão a nível testicular durante a meiose, como também à sua localização. Tal como referido na introdução, o cromossoma X é enriquecido em genes específicos de células germinativas expressos durante a espermatogénese, o que sugere que este cromossoma desempenha um papel importante neste processo. Como os homens são hemizigóticos para o cromossoma X, as mutações em genes ligados ao X são de cópia única e não podem ser compensadas por outro alelo *wild-type* correspondente (Yang et al., 2015). Ou seja, é de esperar que alterações neste gene ligado ao cromossoma X e essencial para a fertilidade, em homens, possam ser causadoras de infertilidade.

Deste modo, este projeto incidiu sobre a caracterização molecular do gene *TEX11* visando detetar deleções envolvendo um ou mais exões e alterações pontuais nas respetivas sequências codificantes e sequências proximais aos intrões. Assim, foram definidos os seguintes objetivos:

1. Otimização de PCR múltiplas para os diversos exões do gene *TEX11*;
2. Análise dos produtos das PCR múltiplas por sequenciação de nova geração (NGS – *Next Generation Sequencing*);
3. Análise *in silico* dos resultados de NGS;
4. Otimização das condições experimentais para amplificação de todos os exões do gene *TEX11* individualmente e respetiva sequenciação de Sanger;
5. Validação das variantes/alterações obtidas por NGS utilizando a PCR simples e a sequenciação de Sanger;
6. Pesquisa em homens férteis das alterações patogénicas detetadas nos homens azoospermicos;
7. Interpretação dos resultados e estabelecimento de correlações genótipo/fenótipo.

CAPÍTULO 3 – MATERIAIS E MÉTODOS

1. Estratégia de Análise Molecular

A estratégia de análise molecular compreendeu:

- i) otimização da PCR simples para os 29 exões do gene *TEX11*;
- ii) otimização de PCR múltiplas para os diversos exões do *TEX11* para pesquisa de deleções;
- iii) pesquisa de alterações moleculares no gene em causa em homens azoospérmicos por sequenciação de nova geração (usando os produtos das PCR múltiplas), visando a identificação de alterações moleculares pontuais que possam afetar a função do gene/proteína e a espermatogénese;
- iv) avaliação das consequências funcionais de alterações detetadas através de análise *in silico*;
- v) pesquisa das alterações potencialmente patogénicas em homens férteis, detetadas no âmbito ponto iii) por restrição enzimática;
- vi) confirmação da presença das alterações patogénicas (detetadas por NGS) por PCR simples e posterior sequenciação de Sanger;
- vii) estabelecimento de correlações genótipo/fenótipo.

Foram realizados dois ensaios de NGS; o primeiro com 5 amostras teve como objetivo avaliar se seria possível detetar pela referida metodologia alterações em fragmentos de baixo peso molecular (~200 a ~500 pb), dado que os exões do gene *TEX11* têm um tamanho relativamente pequeno e os respetivos intrões são muito extensos, estrategicamente optou-se por se realizar este primeiro ensaio e avaliar o seu sucesso. Tendo este primeiro ensaio sido bem-sucedido, o segundo ensaio foi realizado com as restantes amostras.

1.1. Amostras biológicas

As diferentes amostras de DNA genómico, usadas anonimizadas no âmbito do presente estudo, foram selecionados a partir da coleção de amostras de DNA genómico do Departamento de Genética Humana, tendo sido obtidas de homens inférteis (azoospérmicos), os quais já tinham dado consentimento informado escrito para a realização de investigação biomédica em genética molecular humana. Os doentes foram anteriormente encaminhados para o referido Departamento provenientes da Unidade de Medicina da Reprodução do Hospital de Santa Maria ou do Centro de Medicina Reprodutiva da Maternidade Doutor Alfredo da Costa. O produto biológico primário foi sangue periférico, a partir do qual se procedeu a extração de DNA genómico. Foi constituído um grupo de 80 amostras de DNA provenientes de diferentes doentes portugueses (não familiares entre si) com azoospermia idiopática, cariotipo 46,XY e sem microdeleções AZF no cromossoma Y. O diagnóstico de azoospermia idiopática foi estabelecido de acordo com os critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde (WHO, 2010). Neste estudo não foram incluídos doentes com alterações cromossómicas nem com história de exposição a fatores ambientais, doenças sistémicas ou de outra natureza que possam ter perturbado/afetado a espermatogénese. Foram ainda incluídas 3 amostras controlo, duas provenientes de homens normozoospérmicos e uma de uma mulher fértil.

1.2. Extração Automática do DNA

A extração de DNA foi realizada utilizando o equipamento MagNA Pure 1.0 da Roche, o qual executa de forma automática a purificação de ácidos nucleicos, a partir de amostras biológicas, obtendo-se os ácidos nucleicos altamente purificados e prontos para aplicações como a PCR (Roche Diagnostics GmbH, 2008).

O referido equipamento executa automaticamente todas as etapas do procedimento de purificação, o qual tem por base o uso de partículas magnéticas de vidro (MGPs), carregadas positivamente às quais se liga o DNA genômico, sendo este purificado após sucessivas lavagens e eluído livre de nucleases e de proteínas. Os protocolos de purificação pré-programados, que contêm as instruções para todas as etapas de isolamento, encontram-se instalados no computador para uso exclusivo no MagNA Pure LC (Roche Diagnostics GmbH, 2008).

1.2.1 Tecnologia de Isolamento de DNA

1.2.1.1 *Passos do Procedimento de Trabalho*

Para o isolamento/purificação do DNA genômico a partir de sangue periférico, são utilizadas MGPs fornecidas com diferentes consumíveis que no seu conjunto constituem o Kit *MagNA Pure LC DNA Isolation kit – Large Volume*. O DNA liga-se às MGPs na presença de sal caotrópico a pH > 7.0. As MGPs têm uma superfície de vidro (sílica) e núcleo magnético. Os ácidos nucleicos são ligados à superfície de sílica das MGPs na presença de isopropanol e altas concentrações de sais caotrópicos, que removem a água das moléculas hidratadas em solução. Os polissacarídeos e as proteínas não se ligam às esferas e são removidos com sucessivas lavagens. Uma vez ligados à superfície das MGPs, os ácidos nucleicos são separados da última solução de lavagem através da ação de um ímã. Os ácidos nucleicos puros são então eluídos das esferas sob a ação do calor e usando uma solução de eluição/dissolução com baixa concentração de sal. Esta tecnologia de isolamento de DNA utilizando o MagNa Pure LC é vantajosa dado que não requer nenhuma centrifugação, não é necessária qualquer ação manual de um operador durante o procedimento de extração, ou seja, trata-se de um procedimento semi-automatizado que proporciona DNA de elevada qualidade, ponto a ser usado em distintos métodos analíticos de genética molecular (Roche Diagnostics GmbH, 2008).

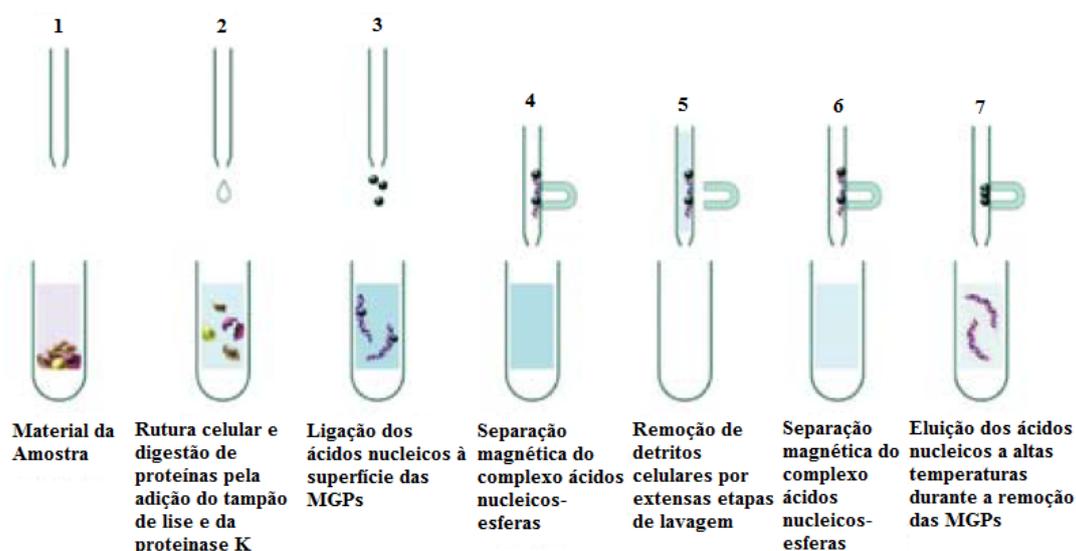


Figura 3.1. – Esquema adaptado do *MagNA Pure 2.0 Instrument Operator's Manual* do Isolamento Automático de DNA.

1.3. Amplificação Enzimática de DNA *in vitro* (PCR)

A *Polimerase Chain Reaction* (PCR) é um método de biologia molecular que permite amplificar cópias de uma dada região selecionada do DNA genômico/do genoma em várias ordens de grandeza, originando milhares a milhões de cópias de uma determinada sequência de DNA. A PCR foi desenvolvida em 1984 pelo bioquímico norte-americano, Kary Mullis. A PCR é atualmente usada em todos os laboratórios de genética molecular e aplicada tanto a nível do diagnóstico como da investigação. Esta metodologia tornou-se uma das técnicas mais utilizadas em biologia molecular porque é rápida, barata e simples, amplifica fragmentos de DNA específicos a partir de pequenas quantidades de DNA, mesmo quando esse DNA é de baixa qualidade (Mohini & Deshpande, 2010).

1.3.1. Conceito básico da PCR

Como o nome indica, a PCR corresponde a uma reação em cadeia da polimerase: uma molécula de DNA é usada como molde para produzir duas cópias, depois quatro, depois oito e assim sucessivamente. Esta duplicação contínua a partir das cópias que são sintetizadas é realizada por proteínas específicas designadas por polimerases, enzimas que são capazes de adicionar a partir de uma extremidade 3'OH os nucleótidos complementares ao DNA molde formando-se uma nova cadeia de DNA. As polimerases, para além de requererem uma solução tamponada e de cofatores, requerem na reação os quatro nucleótidos diferentes que possuem as correspondentes quatro bases: adenina (A), timina (T), citosina (C) e guanina (G), também precisam de um pequeno fragmento de DNA com uma extremidade 3'OH livre, designado por iniciador e que é complementar à sequência DNA alvo, ao qual são sucessivamente adicionados os nucleótidos complementares aos existentes na cadeia de DNA molde, bem como a própria molécula de DNA mais longa que serve de modelo para a síntese da nova cadeia de DNA. Se estes reagentes forem fornecidos à reação, as enzimas irão construir cópias exatas das cadeias modelo (Mohini & Deshpande, 2010).

A PCR é um método de amplificação seletiva de um determinado segmento de DNA. O segmento pode representar uma pequena parte de uma mistura grande e complexa de DNA, *e.g.* um exão específico de um gene humano. A PCR pode amplificar uma única molécula de DNA, *e.g.* de um único espermatozoide. A reação de PCR depende da capacidade da polimerase permanecer estável a altas temperaturas (Mohini & Deshpande, 2010).

1.3.2. Passos da PCR

Existem três passos principais que constituem cada ciclo da PCR: desnaturação, emparelhamento e extensão. No primeiro passo; o DNA é desnaturado a altas temperaturas (de 90 a 97 graus Celsius). No passo dois, os iniciadores ligam-se ao DNA molde (geralmente ocorre entre 70 a 72 °C). O passo três, extensão, ocorre após os iniciadores se ligarem e compreende a síntese da cadeia complementar de DNA (a temperatura de emparelhamento é característica da composição nucliotídica do par de iniciadores e geralmente pode variar entre 50 e 65 °C) (Mohini & Deshpande, 2010).

Para amplificar um segmento de DNA usando a PCR, a amostra reacional é primeiro aquecida, de modo a que o DNA desnature seguidamente, a enzima polimerase de *Taq* sintetiza na direção 5'-3' duas novas cadeias de DNA, usando as duas cadeias originais como moldes. Este processo resulta na duplicação do DNA original, com cada uma das novas moléculas contendo uma cadeia nova e uma cadeia molde. Então, cada uma dessas cadeias pode ser usada para criar duas novas cópias, e assim sucessivamente. A fase de emparelhamento permite que os iniciadores hibridem com as suas respetivas sequências complementares (Mohini & Deshpande, 2010).

Cada cadeia de DNA recém-formada com o iniciador ligado passa a constituir uma cadeia molde que passa a ser usada para criar cópias idênticas das cadeias originalmente desejadas. A *polimerase* adiciona os nucleótidos disponíveis à extremidade 3'-OH dos iniciadores ligados. A extensão destes ocorre a aproximadamente 72°C durante 1-5 minutos. A polimerase de DNA perde atividade ao longo dos sucessivos ciclos da PCR dada a temperatura elevada a que ocorre a amplificação. Após 30 ciclos, dado que após cada ciclo ocorre um aumento exponencial do nº de fragmentos de DNA, teoricamente teremos um número total de fragmentos de DNA amplificados que incluem as sequências entre os iniciadores de PCR, que correspondem a 2^n , onde n é o número de ciclos (Mohini & Deshpande, 2010) contudo, dado que a eficiência da PCR não é de 100%, teremos sempre um nº de cópias inferior a 2^n .

Após o último ciclo, as amostras são geralmente incubadas a 72°C durante 5 minutos para completar as extremidades dos produtos de PCR recentemente sintetizados cuja síntese não foi concluída. Para garantir o sucesso, deve-se ter cuidado tanto na preparação da mistura de reação como na configuração dos ciclos. Aumentar o número de ciclos acima de ~35 tem pouco efeito no rendimento da amplificação/reação porque o platô reacional ocorre quando pelo menos um dos constituintes da reação se esgota. A especificidade da amplificação depende da eficiência com que os iniciadores reconhecem a sequência que lhe é complementar podendo eventualmente ligar-se a sequências em que a homologia não é completa, ou seja, ligar-se a sequências que não são o DNA alvo pretendido (Mohini & Deshpande, 2010). Para facilitar a sequenciação dos exões foram inseridas nas sequências dos iniciadores as sequências do fago M13; foram adicionadas aos iniciadores *forward* uma cauda 21M13F e aos iniciadores *reverse* uma cauda M13R (as respectivas sequências e concentrações iniciais das caudas bem como as dos iniciadores encontram-se na tabela 8.1. dos anexos) (Schinas et al., 2004).

Todas as amplificações foram realizadas no termociclador *Biometra Personal Cycler*.

1.3.3. Amplificação enzimática de DNA in vitro - PCR Simples

Numa reação de PCR simples usa-se um único par de iniciadores e, amplifica-se um único fragmento de DNA. As diversas reações de PCR simples realizadas no decorrer da parte experimental do presente trabalho decorreram nas condições referidas nas tabelas 3.1. e 3.2.

Tabela 3.1. – Condições das PCRs simples para os 29 exões do gene *TEX11*.

^aO volume de H₂O é calculado através da seguinte fórmula: *Volume de Reação* – (Σ *Volume dos restantes reagentes*)

^bAs temperaturas de emparelhamento (T.E.) para cada exão encontram-se na tabela 3.2.

Volume de Reação/Amostra: 40 µl		Volume de Reagente/Amostra (µl)
Reagente		
H₂O: MG	× ×	(a)
Lote: 52839	Val: 08/19	
Tampão: AB	10x	4
Lote: 1758669	Val:	
dNTP's:	25 mM	1
Data Dil.: 12/16	Lote: BI283/12	
Primer F	100 µl	0,5-2
Data da Diluição: 2/15	V.2/20	
Primer R	100 µl	0,5-2
Data da Diluição: 2/15	V.2/20	
Outro: MgCl₂	25 mM	6
Lote: 1832133	Val:	
Taq Polimerase: <i>GoTaq</i>	5 U/µl	0,12
Lote: 122581	Val: 07/17	
DNA:	70-100ng/µl	1-2

Ciclos	°C	Min.
1	95	5
	95	1
35	T.E. ^(b)	1
	72	1
1	72	10
	4-10	∞

Tabela 3.2. – Temperatura de emparelhamento (T.E.) em graus Celsius (°C) para os 29 exões do gene *TEX11*.

Exão	T.E.(°C)	Exão	T.E.(°C)
1	64	16	59
2	59	17	59
3	59	18	59
4	59	19	59
5-6	54	20	59
7	59	21	59
8	59	22	59
9	61	23	61
10	60	24	62
11	60	25	60
12	60	26	59
13	59	27	60
14	61	28	60
15	62	29	59

1.3.4. Amplificação enzimática múltipla de DNA in vitro - PCR Múltipla

Na PCR múltipla utiliza-se numa única mistura reacional mais do que um par de iniciadores específicos, sendo possível amplificar simultaneamente diversas regiões do genoma. Embora os ciclos de amplificação possam ser idênticos aos usados numa PCR simples, a otimização da PCR múltipla é mais problemática, pode requerer vários ensaios em que se experimentam diversas concentrações de iniciadores, temperaturas de emparelhamento e tampões, por forma a obter amplificações específicas e quantitativamente semelhantes. Os iniciadores a usar deverão possuir uma temperatura de emparelhamento próxima e deverão originar fragmentos facilmente distinguíveis após separação

eletroforética em gel de agarose (que na realização deste estudo foi o método utilizado para a análise dos resultados da PCR).

As diversas reações de PCR múltiplas realizadas no decorrer da parte experimental do presente trabalho decorreram nas condições referidas nas tabelas 3.3., 3.4 e 3.5.

Tabela 3.3. - Condições da PCRs múltipla para o multiplex M5 do gene *TEX11*.

^aO volume de H₂O é calculado através da seguinte fórmula: *Volume de Reação* – (Σ *Volume dos restantes reagentes*)

^bAs temperaturas de emparelhamento (T.E.) para cada multiplex encontram-se na tabela 3.5.

Volume de Reação/Amostra: 50 µl		Volume de Reagente/Amostra (µl)
Reagente		
H₂O: MG	× ×	(a)
Lote: 52839	Val: 08/19	
Tampão: AB	10x	5
Lote: 1758669	Val:	
dNTP's:	25 mM	1
Data Dil.: 12/16	Lote: BI283/12	
Iniciadores F	100 µl	0,5-2
Data da Diluição: 2/15	V.2/20	
Iniciadores R	100 µl	0,5-2
Data da Diluição: 2/15	V.2/20	
Outro: MgCl₂	25 mM	6
Lote: 1832133	Val:	
Taq Polimerase: GoTaq	5 U/µl	0,12
Lote: 122581	Val: 07/17	
DNA:	70-100ng/µl	1-2

Ciclos	°C	Min.
1	95	5
	95	1
35	T.E. ^(b)	1
	72	1
1	72	10
	4-10	∞

Tabela 3.4. – Condições das PCRs múltiplas para os multiplex M3 a M10 exceto M5 do gene *TEX11*.

^aO volume de H₂O é calculado através da seguinte fórmula: *Volume de Reação* – (\sum *Volumes dos restantes reagentes*)

^bAs temperaturas de emparelhamento (T.E.) para cada multiplex encontram-se na tabela 3.5.

^cEste tampão é preparado no Departamento de Genética Humana do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge pelo que não tem um lote associado.

Volume de Reação/Amostra: 50 µl		Volume de Reagente/Amostra (µl)
Reagente		
H₂O: MG	× ×	(a)
Lote: 52839	Val: 08/19	
Tampão: Paris	10x	5
Lote: ^(c)	Val: 03/23	
dNTP's:	25 mM	1
Data Dil.: 12/16	Lote: BI283/12	
Iniciadores F	100 µl	0,5-2
Data da Diluição: 2/15	V.2/20	
Iniciadores R	100 µl	0,5-2
Data da Diluição: 2/15	V.2/20	
Taq Polimerase: GoTaq	5 U/µl	0,12
Lote: 122581	Val: 07/17	
DNA:	70-100ng/µl	1-2

Ciclos	°C	Min.
1	95	5
	95	1
35	T.E. ^(b)	1
	72	1
1	72	10
	4-10	∞

Tabela 3.5. – Temperatura de emparelhamento (T.E.) em graus Celsius (°C) e distribuição dos exões para os respetivos multiplex.

Multiplex	Exões	T.E.(°C)
M3	Ex.12; Ex.14; Ex.23; Ex.28	65
M4	Ex.21; Ex.22; Ex.26; Ex.29	56
M5	Ex.16; Ex.17; Ex.18; Ex.20	58
M6	Ex.1; Ex.19; Ex.27	60
M7	Ex.4; Ex.11; Ex.15; Ex.25	60
M8	Ex.3; Ex.7; Ex.10; Ex.13	58
M9	Ex.2; Ex.8; Ex.24	56
M10	Ex.9; Ex.5-6	54

1.4. Sequenciação Nucleotídica de DNA

A técnica de sequenciação de DNA é o processo através do qual se determina a sequência de nucleótidos que constituem um determinado fragmento de DNA, permitindo a detecção de possíveis alterações (mutações pontuais ou pequenas deleções e inserções), quando em comparação com a sequência normal de referência.

As eletroforeses das reações de sequenciação foram realizadas na Unidade de Tecnologia e Inovação do Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge (UTI-INSA).

1.4.1. Sequenciação nucleotídica de DNA segundo o método de Sanger

Esta metodologia, considerada de referência para a identificação da sequência de nucleótidos de um dado segmento de DNA, pode ser utilizada para confirmação de resultados obtidos por outras metodologias. No que concerne o presente estudo e particularmente no que diz respeito ao trabalho experimental, a sequenciação pelo método de Sanger foi utilizada para confirmação das alterações encontradas por NGS, como já anteriormente referido.

Dado que a separação eletroforética em gel dos fragmentos de DNA, segundo o método desenvolvido por Sanger, era muito morosa foi posteriormente desenvolvida uma técnica de sequenciação automatizada (Luckey et al., 1990) baseada na incorporação na cadeia de DNA sintetizada de ddNTPs ligados a fluorocromos. Embora o princípio químico da reação de sequenciação se tenha mantido o mesmo, a automatização ocorreu devido principalmente ao desenvolvimento de sistemas de detecção da fluorescência emitida por diferentes fluorocromos, à análise dos fragmentos de DNA em tempo real durante a eletroforese e ao respetivo registo da sequência do DNA sem a interferência de um operador (Prober et al., 1987).

Nestas reações de sequenciação, a cada ddNTP está acoplado um fluorocromo diferente, ou seja, a cada ddNTP incorporado na cadeia de DNA corresponde uma determinada fluorescência com comprimento de onda característico. Cada fragmento de DNA sintetizado é então simultaneamente terminado e marcado por um único ddNTP, ao qual corresponde uma cor específica (Prober et al., 1987 e Hutchison, 2007). Nestas condições, é possível realizar as reações de sequenciação com cada um dos ddNTPs num único tubo e aplicar o produto desta reação num capilar com gel de poliacrilamida (Swerdlow & Gesteland, 1990), uma vez que o detetor de fluorescência é capaz de distinguir a radiação emitida por cada um dos fluorocromos, após a sua excitação por radiação *laser*. É assim possível determinar o último nucleotídeo adicionado a cada sequência. Atendendo à automatização do sistema, a sequência é lida diretamente no capilar durante a eletroforese (em tempo real), à medida que os fragmentos passam em frente do detetor, sendo posteriormente impressa de forma legível (eletroferograma) (Prober et al., 1987 e Hutchison, 2007).

Antes de os produtos das PCRs simples serem sequenciados por Sanger foram realizadas duas reações: purificação e sequenciação. As condições de ambas as reações encontram-se nas tabelas 3.6. e 3.7. respetivamente.

Tabela 3.6. – Condições das Reações de Purificação dos produtos das PCRs simples.

Reagente	Volume	Ciclos	°C	Min.
Produto de PCR	7µL	1	37	15
ExoStar	2µL	1	80	15
Lote: 9745617			4	∞

Tabela 3.7. – Condições das Reações de Sequenciação. Foram sequenciados os exões 1, 3, 4, 5-6, 8, 9, 11, 12, 15, 18, 22, 23, 25, 26, 27 e 28.

^aO volume de H₂O é calculado através da seguinte fórmula: *Volume de Reação* – (Σ *Volumes dos restantes reagentes*)

^bAs temperaturas de emparelhamento (T.E.) para cada exão encontram-se na tabela 3.2.

Volume de Reação/Amostra: 10 µl		Volume de Reagente/Amostra (µl)
Reagente		
H₂O: MG	× ×	(a)
Lote: 52839	Val: 08/19	
Tampão de Sequenciação	5x	1,75
Lote: 1705184	Val: 11/18	
Iniciador	4 pmol/µL	1
Data da Diluição: 2/15	V.2/20	
BigDye	× ×	0,5
Lote: 1709098	Val: 05/19	
Produto de PCR Purificado	× ×	1-2

Ciclos	°C	Min.
1	95	5
	95	1
35	T.E. ^(b)	1
	72	1
1	72	10
	4-10	∞

1.4.2 Sequenciação nucleotídica de DNA: Sequenciação de Nova Geração

A procura de novas tecnologias que forneçam informações genómicas rápidas, menos dispendiosas e precisas nunca foi maior. Este desafio catalisou o rápido desenvolvimento dos avanços na NGS. A produção de grandes volumes de dados e a sua velocidade de aquisição são as principais vantagens em relação aos métodos anteriores (Bahassi & Stambrook, 2014). Embora a tecnologia NGS inicialmente tenha sido utilizada para estudar genomas completos, surgiu uma variedade de abordagens dirigidas a regiões específicas do genoma (Koboldt, Steinberg, Larson, Wilson, & Mardis, 2014).

Para a pesquisa de alterações moleculares no gene em causa, em homens azoospermicos, foi utilizada esta tecnologia (usando os produtos das PCR múltiplas), visando a identificação de alterações moleculares pontuais que possam afetar a função do gene/proteína e a espermatogénese; para este estudo foi utilizado o equipamento de NGS MiSeq da Illumina® e o kit de preparação de bibliotecas Nextera XT da Illumina®.

1.4.2.1 Passos do Procedimento Experimental de Sequenciação de Nova Geração

Passo 1: Purificação dos produtos de PCR

A purificação dos produtos de PCR foi efetuada através da tecnologia de separação por *beads* magnéticas da Agencourt AMPure XP. O procedimento de trabalho foi realizado em 6 passos descritos abaixo (Figura 3.2.).

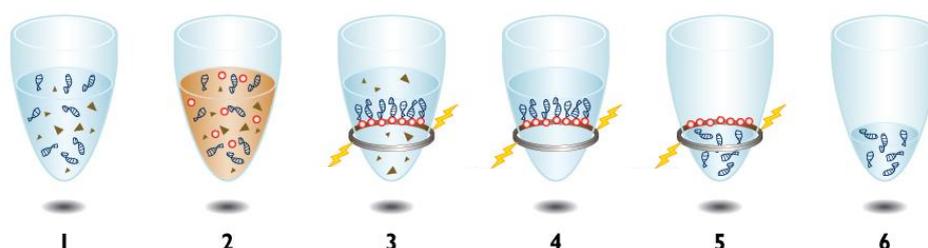


Figura 3.2. – Passos da purificação dos produtos de PCR - tecnologia de separação por beads magnéticas da Agencourt AMPure XP. Adaptado de Beckman, 2016.

1. Adicionar 1,8µL de *beads* magnéticas AMPure XP por 1,0µL de amostra;
2. Ligação dos fragmentos de DNA às *beads* paramagnéticas;
3. Separação das *beads* ligadas aos fragmentos de DNA dos contaminantes;
4. Lavar das *beads*+DNA duas vezes com etanol a 70% para remover os contaminantes;
5. Eluir os fragmentos de DNA purificados das *beads*;
6. Transferir para uma placa nova (Beckman Coulter, 2016).

Passo 2: Quantificação do DNA purificado

A quantificação do DNA purificado no passo anterior foi realizada através da plataforma Qubit utilizando o kit de quantificação *Broad Range* (BR) da ThermoFisher Scientific.

Passo 3: Diluição das amostras para 0,2 ng/µL

Passo 4: Preparação de bibliotecas de NGS com o Kit Nextera XT

A preparação de bibliotecas de DNA genómico utilizando o *Nextera DNA Sample Prep Kit* da Illumina®, é realizada com recurso a uma enzima transposase, que simultaneamente fragmenta e marca o DNA numa reação denominada "tagmentação". A enzima possui atividade dupla; fragmenta o DNA e, simultaneamente, adiciona adaptadores específicos em ambas as extremidades dos fragmentos. Estas seqüências de adaptadores são usadas para amplificar o DNA por PCR. Também são adicionados índices (seqüências específicas que vão permitir identificar individualmente as amostras) à reação de PCR. Este procedimento de preparação é melhor que o dos protocolos tradicionais, combinando a fragmentação do DNA e a ligação dos adaptadores num único passo (Head et al., 2014). Ver figura 3.3.

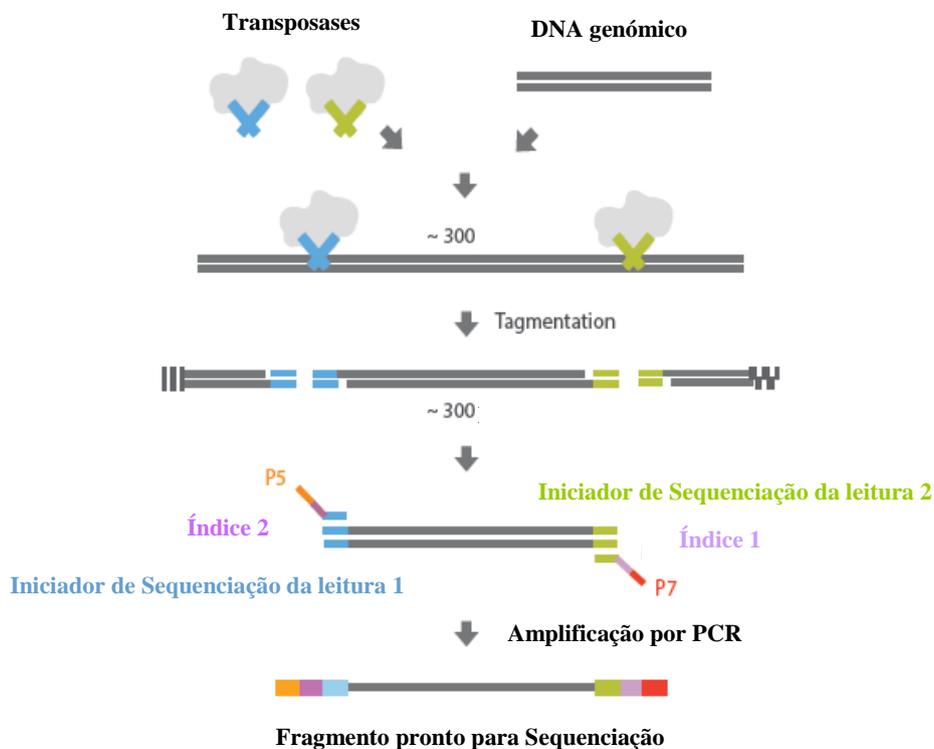


Figura 3.3. – Passos do Procedimento Experimental *Nextera XT*. Adaptado de Illumina, 2016.

Passo 5: Sequenciação por Síntese

Esta abordagem permite que cada fragmento seja sequenciado nas duas direções, a partir de cada uma das extremidades numa biblioteca de fragmentos e o alinhamento das leituras direta e reversa como pares de leitura.

A sequenciação por síntese envolve três passos (ver figura 3.4.):

1. Os adaptadores são ligados às extremidades dos fragmentos.
2. Os fragmentos ligam-se à *flow-cell* carregada com iniciadores e as reações de PCR por ponte amplificam cada fragmento ligado para produzir aglomerados de fragmentos (*clusters*).
3. Durante cada ciclo de sequenciação, é adicionado um nucleótido terminal marcado com um fluoróforo, com a particularidade de ser reversível, às cadeias em sequenciação. Em cada ciclo de sequenciação os fluoróforos de todos os fragmentos são excitados por um laser e é captada uma imagem dos sinais de cada *cluster*. Em seguida, tanto o fluorocromo como o terminador do nucleótido incorporado são removidos, sendo o nucleótido incorporado revertido ao seu estado natural, permitindo a adição de um novo nucleótido à cadeia de DNA em crescimento/síntese, no ciclo de sequenciação seguinte.

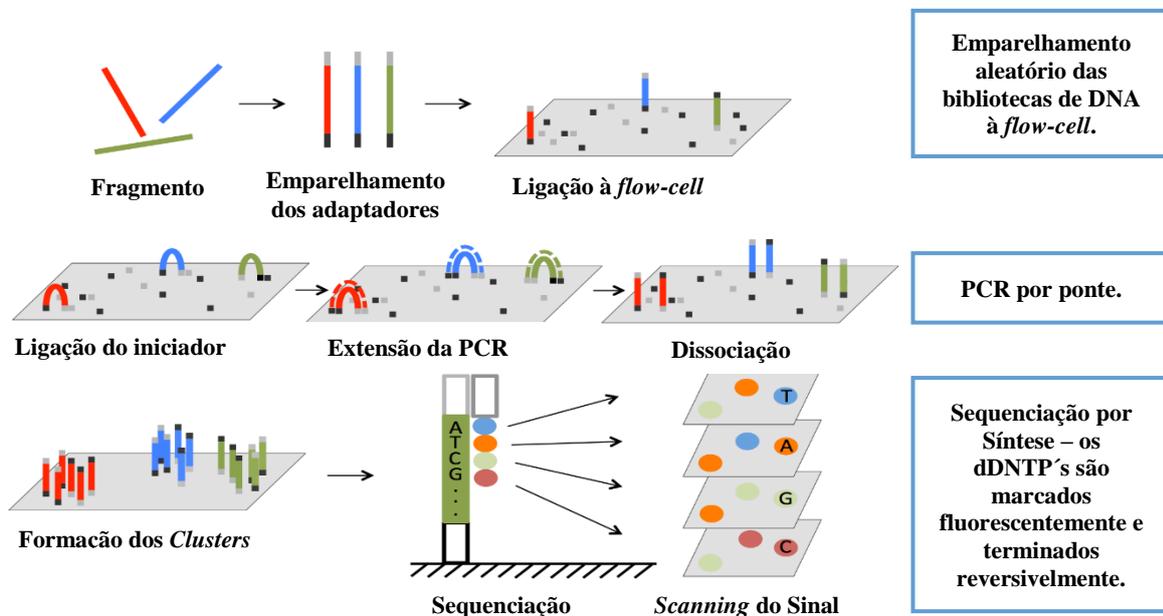


Figura 3.4. - Fundamento da Sequenciação por Síntese. Adaptado de <http://www.3402bioinformaticsgroup.com/service/>.

Tabela 3.8. - Condições da sequenciação de nova geração.

Equipamento	MiSeq Illumina®
Data	25/09/2017
Workflow	PCR Amplicon
Índices/amostra	2
Flow cell, Reads	Nano V2, 2x250pb

Passo 6: Análise dos Resultados

A análise dos resultados da sequenciação de NGS foi realizada em três fases distintas, as duas primeiras análises foram realizadas no equipamento de sequenciação, no caso do presente estudo, no MiSeq Illumina® e a análise terciária foi realizada através de outros programas exteriores ao equipamento (ver ponto 1.6.2.):

1. Análise primária: análise da qualidade da corrida [*Sequencing Analysis Viewer* (SAV) v1.8.46] e das amostras (FastQC v0.11.5).
2. Análise secundária: - alinhamento e mapeamento das leituras (BWA) e *variant calling* (GATK) - *MiSeq Reporter* v2.6.2. Despiste de contaminações (*Fastq screen* v0.9.3). Dos dois primeiros programas resultam os ficheiros BAM e VCF, respetivamente, que são utilizados na análise terciária.
3. Análise terciária: visualização e análise das alterações (ver ponto 1.6.2.).

1.5. Restrição Enzimática

As enzimas de restrição são, enzimas bacterianas que reconhecem sequências específicas na cadeia de DNA, com extrema precisão, chamadas de locais de restrição, e que posteriormente cortam as duas cadeias de DNA no próprio local ou nas proximidades. Estas enzimas cortam/hidrolizam o DNA num conjunto de fragmentos específicos designados fragmentos de restrição (Lodish et al., 2000 e Pingoud, Wilson, & Wende, 2014).

Estas enzimas são importantes ferramentas para a identificação de alterações na cadeia de DNA, as quais podem estar ou não associadas a determinada característica ou doença (Loenen, Dryden, Raleigh, Wilson, & Murray, 2014). Para um determinado segmento de DNA em análise, é indispensável que a enzima escolhida origine padrões de restrição diferentes entre a sequência alterada e a sequência normal. Assim, será possível distinguir facilmente, por recurso a eletroforese em gel de agarose, as amostras nas quais ocorreu uma determinada alteração.

Por recurso a programas específicos que simulam a restrição das endonucleases face a um dado segmento de DNA que se pretende analisar, é possível selecionar a enzima que origina um padrão de restrição mais informativo, ou mais adequado em função do objetivo pretendido. A escolha das enzimas de restrição utilizadas no âmbito deste trabalho, foi realizada utilizando o programa NEBCutter (disponível on-line em: <http://nc2.neb.com/NEBcutter2>) (Vincze, Posfai, & Roberts, 2003).

As enzimas utilizadas foram a HaeIII para a alteração c.450C>T, e a HphI para a alteração c.942C>T, (Tabelas 3.9. e 3.10.) e as condições de cada ensaio para cada uma das enzimas encontram-se nas Tabelas 3.11. e 3.12. Deste modo, para pesquisa das alterações potencialmente patogénicas na população de homens férteis, foram analisados por restrição enzimática os fragmentos ex.5-6 e ex.11, amplificados por PCR simples, obtidos de 102 homens férteis. Nestes ensaios foram incluídas também, para comparação e como amostras controlo, as duas amostras nas quais foram encontradas as alterações referidas anteriormente.

Tabela 3.9. – Informações do NEBCutter para escolha das enzimas de restrição (exão 5-6). Na tabela estão representadas as sequências parciais, normal e alterada, do fragmento de DNA do exão 5-6 do gene *TEX11*, submetidas ao NEBCutter para determinação do seu padrão de restrição e escolha da endonuclease mais apropriada/informativa face à alteração c.450C>T. Através da utilização deste programa foi possível verificar que a enzima de restrição HaeIII na sequência normal possuía dois sítios de restrição e na sequência alterada, um desses sítios desaparecia. A sombreado vermelho podemos ver a posição em que se encontra a alteração, quer na sequência normal quer na sequência alterada. A sombreado cinzento encontra-se a sequência nucleotídica parcial do exão e sem sombreado a sequência nucleotídica parcial do intrão. Encontra-se apenas representado (pela seta a preto) um único sítio de restrição. Encontram-se ainda representados na tabela os fragmentos esperados após a restrição enzimática para as amostras normais e alteradas.

TEX 11 - Ex.5-6 (571pb)		
	Sequência Parcial Normal	Sequência Parcial Alterada
	5'-AAGCTGCTGTGG↓CCGTAAGTTACC-3'	5'-AAGCTGCTGTGGC↓GTAAGTTACC-3'
Tamanho do Fragmento Esperado (pb)	318, 229 e 24	547 e 24

Tabela 3.10. - Informações do NEBCutter para escolha das enzimas de restrição (exão 11). Na tabela encontram-se representadas as sequências parciais, normal e alterada, do fragmento de DNA do exão 11 do gene *TEX11*, submetidas ao NEBCutter para determinação do seu padrão de restrição e escolha da endonuclease mais apropriada/informativa face à alteração c.942C>T. Através da utilização do NEBCutter podemos verificar que na sequência normal a enzima de restrição HphI não possui nenhum sítio de restrição e que na sequência alterada, é criado um sítio de restrição para esta enzima. A sombreado vermelho podemos ver a posição em que se encontra a alteração, quer na sequência normal quer na sequência alterada. A sombreado cinzento encontra-se a sequência nucleotídica parcial do exão. O sítio de restrição encontra-se representado pela seta a preto. A sublinhado está representado o sítio de reconhecimento da enzima HphI. Encontram-se ainda representados na tabela os fragmentos esperados após a restrição enzimática para as amostras normais e alteradas.

TEX 11 - Ex.11 (404pb)		
	Sequência Parcial Normal	Sequência Parcial Alterada
	5'-GGGGA AACATCTAATGAAGAACTC-3'	5'-GGTGA AACATCT↓AATGAAGAACTC-3'
Tamanho do Fragmento Esperado (pb)	404	251 e 153

Tabela 3.11. – Condições do ensaio de restrição enzimática para a enzima HaeIII. A restrição enzimática foi realizada a 38°C em banho maria, *over night*, tendo os fragmentos resultantes sido visualizados em gel 2% de agarose Seakem® LE.

A

Volume de Reação/Amostra: 15 µl		Volume de Reagente/Amostra (µl)
Reagente		
H₂O: MG	× ×	0
Lote: 52839	Val: 08/19	
Tampão: Buffer C	10x	1,5
Lote: 19303727	Val: 2/14	
Enzima: HaeIII	10 U/µL	2
Marca: Promega		
BSA	10 mg/µL	1,5
Lote: P081612	Val: 8/14	
Produto de PCR	× ×	10

B

Volume de Reação/Amostra: 15 µl		Volume de Reagente/Amostra (µl)
Reagente		
H₂O: MG	× ×	1,5
Lote: 52839	Val: 08/19	
Tampão: M	10x	1,5
Lote: A101-2	Val: 03/1997	
Enzima: HaeIII	10 U/µL	2
Marca: Amersham		
Produto de PCR	× ×	10

Tabela 3.12. – Condições do ensaio de restrição enzimática para a enzima HphI. A restrição enzimática foi realizada a 38°C em banho maria, *over night*, tendo os fragmentos resultantes sido visualizados em gel 2% de agarose Seakem® LE.

Volume de Reação/Amostra: 15 µl		Volume de Reagente/Amostra (µl)
Reagente		
H₂O: MG	× ×	7,5
Lote: 52839	Val: 08/19	
Tampão: NEB4	10x	1,5
Lote: 0300	× ×	
Enzima: HphI	5 U/µL	3
Marca: New England Biolabs		
Produto de PCR	× ×	3

1.6. Análise de Resultados

A análise de resultados foi efetuada em função dos diferentes tipos de resultados obtidos, compreendeu quatro fases distintas: i) PCRs simples e múltiplas, ii) Sequenciação de nova geração, iii) Sequenciação de Sanger e iv) Restrição enzimática.

1.6.1 PCRs múltiplas

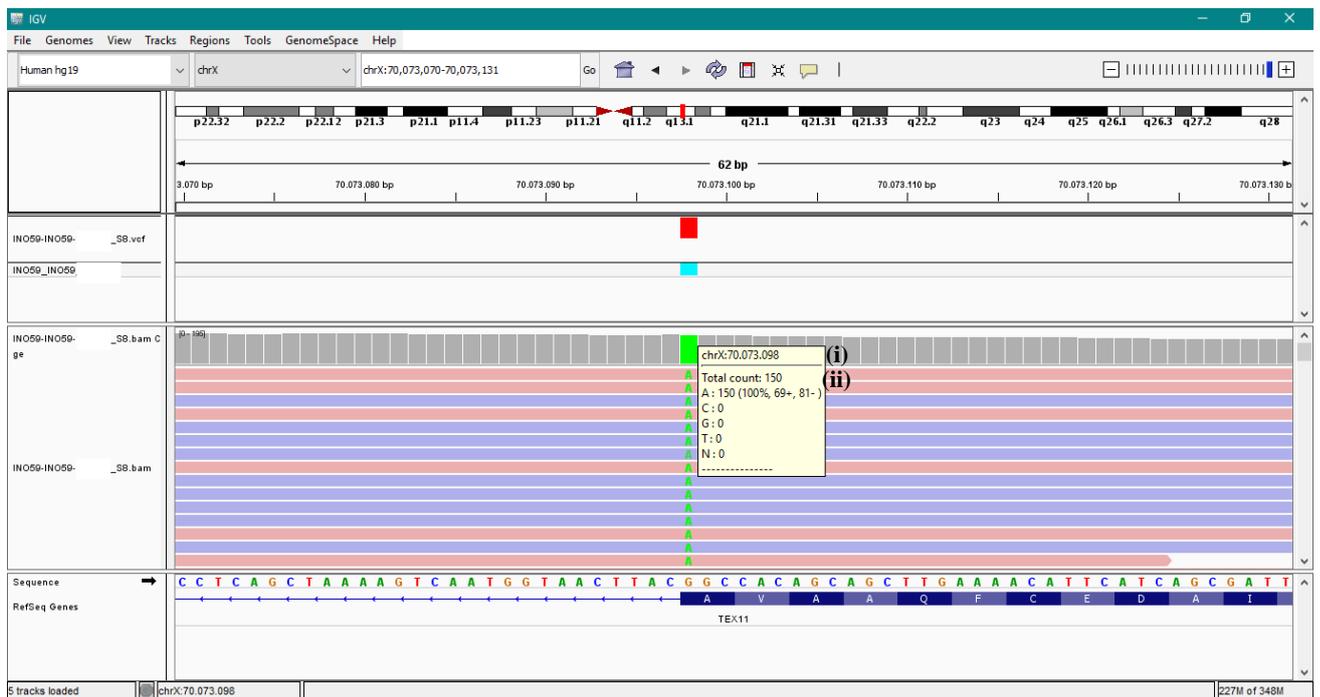
Na primeira fase os resultados das PCRs múltiplas foram analisados através de eletroforese em gel de agarose a 2/3% em TAE1x utilizando uma mistura de agaroses Seakem® LE + Nusieve® 3:1 submetidos a 70V num período compreendido entre os 60-70 minutos e posterior visualização através de UV dos fragmentos amplificados para os exões em causa - visualização de bandas presentes no gel em comparação com o marcador molecular 100bp e de acordo com o tamanho previsto.

1.6.2 Sequenciação de Nova Geração

Os resultados da NGS foram analisados através do programa *Integrative Genomics Viewer* (IGV). O IGV é um visualizador de dados de alto desempenho que lida de forma eficiente com grandes conjuntos de dados heterogêneos. Uma característica-chave do IGV é o foco na natureza integradora dos estudos genômicos, com suporte para dados de NGS e a integração de dados clínicos e fenotípicos. A sua principal função é apoiar os investigadores na visualização dos seus próprios dados. Para isso, o

IGV suporta o carregamento flexível de conjuntos de dados locais e remotos e está otimizado para uma visualização e exploração de dados de alto desempenho (Thorvaldsdóttir, Robinson, & Mesirov, 2012).

Para visualizar os dados no IGV, são utilizados os ficheiros BAM e VCF gerados na análise dos resultados brutos da NGS, como referido acima. Para cada uma das amostras, através dos dados obtidos pelos ficheiros VCF, foi construída uma tabela com todas as alterações encontradas (Tabela 8.5. dos Anexos); desta tabela foram excluídas (não consideradas) todas as alterações que apresentaram os seguintes parâmetros: LowGQ (Low Genotype Quality), LowGQ/LowGQX; LowVariantFreq (Low Variant Frequency) e R8 (Homopolymer Repeat), os dois primeiros referem-se a leituras de baixa qualidade, o seguinte é relativo a alterações detetadas com frequência baixa ou pouco representadas, e o último refere-se a alterações em repetições de homopolímeros. Foram ainda excluídas alterações que apresentassem uma cobertura abaixo das 20 leituras e que se encontrassem fora da zona flanqueada pelos iniciadores. Ver figura 3.9.



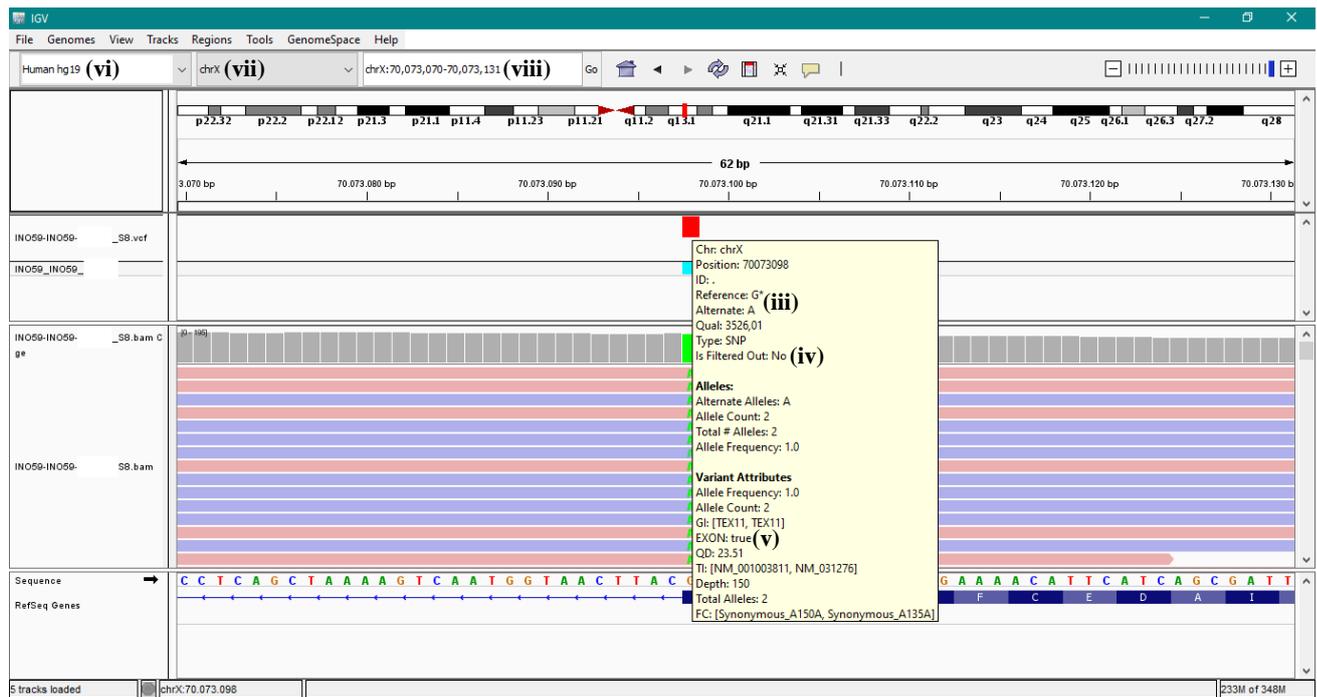


Figura 3.5. – Representação de um exemplo do que pode ser visualizado no programa IGV. Na primeira imagem podemos observar (i) posição da alteração no cromossoma X (ii) número de vezes que essa alteração foi lida (número de leituras). Na imagem de baixo podemos observar mais informações sobre a alteração (iii) qual o alelo alternativo, (iv) se os filtros LowGQ, LowGQ/LowGQX, LowVariantFreq e R8 foram aplicados, que neste caso não foram, bem como se (v) a alteração se situa no intrão ou no exão. Podemos ainda observar (vi) a sequência de referência (*Human hg19*) assim como (vii) o cromossoma que estamos a visualizar (chrX) e (viii) as coordenadas do gene.

Após a seleção anteriormente referida, procedeu-se à avaliação do significado das alterações encontradas, consideradas relevantes para o presente estudo.

Como se sabe, milhares de alterações são identificadas por NGS, e embora muitas afetem diretamente a expressão da proteína ou a sua estrutura e função, acredita-se que uma porção crescente de alterações deverá afetar o splicing/processamento do mRNA. Para além das alterações localizadas nas sequências consensus/conservadas dos sítios dadores e aceitadores de splicing, as alterações sinónimas, não-sinónimas ou sem sentido também podem criar novos sítios de splicing ou afetar a eficiência do splicing normal (Desmet et al., 2009).

1.6.1.1 Splicing do RNA

O *splicing*/processamento do pré-mRNA é um processo essencial, regulado com precisão, que ocorre após a transcrição do gene e antes da tradução do mRNA. Este processo começa com a montagem ordenada e a ação coordenada das snRNPs U1, U2, U4, U5 e U6 (as snRNPs são pequenas partículas de ribonucleoproteínas nucleares) e proteínas não-snRNP no pré-mRNA. Cada partícula snRNP contém uma pequena molécula de RNA nuclear (snRNA) e várias proteínas. O complexo de snRNPs e não snRNPs é chamado de spliceossoma. O processo de *splicing* do pré-mRNA pode ser dividido em três etapas definidas em seguida (Wang & Burge, 2008, «Molecular Biology Web Book - RNA splicing», 2018 e «Human Splicing Finder - Version 3.1», 2018).

- **Formação do complexo de compromisso**

O reconhecimento preciso das junções entre o intrão e o exão (sítios de *splicing*) e o emparelhamento correto do sítio de *splicing* 5' com o seu sítio de *splicing* 3' correspondente é crítico

para a seleção do sítio de *splicing*. É durante a formação do complexo de compromisso que os sítios de *splicing* são reconhecidos pela primeira vez por componentes do spliceossoma, com o auxílio de certas proteínas não-spliceossômicas («Molecular Biology Web Book - RNA splicing», 2018 e «Human Splicing Finder - Version 3.1», 2018).

- **Criação de sítios catalíticos**

Um número de interações dinâmicas, incluindo interações pré-mRNA-snRNA, bem como interações pré-mRNA-proteína e proteína-proteína, reúnem os locais reativos no pré-mRNA e criam os locais catalíticos para as reações de transesterificação («Molecular Biology Web Book - RNA splicing», 2018 e «Human Splicing Finder - Version 3.1», 2018).

- **Reações de transesterificação**

A clivagem e reação de ligação necessárias para remoção de intrões e ligação dos exões prosseguem através de duas reações de transesterificação. Na primeira reação, a extremidade 5' do exão é clivada e a extremidade 5' do intrão é ligada ao *branch point*, criando a estrutura de lariato do intrão. A segunda reação ocorre quando a extremidade 3' livre do exão é unida ao exão a jusante, resultando na ligação dos exões e na libertação da sequência intrónica (Z. Wang & Burge, 2008 e «Human Splicing Finder - Version 3.1», 2018).

A natureza e a função dos componentes da maquinaria de *splicing* bem como sua componente bioquímica são bem conhecidas. No entanto, a questão de como os locais de *splicing* são selecionados *in vivo* permanece um pouco incerta. Por outro lado, sabe-se que existem sequências auxiliares de ação *cis* que podem influenciar o reconhecimento dos locais de *splicing*. Estas sequências são conhecidas como intensificadores de *splicing* (ESE – *Exonic Splicing Enhancer*) e sequências inibidoras de *splicing* (ESS – *Exonic Splicing Silencer*) e parecem ajudar a regular o *splicing* alternativo (Robberson, Cote, & Berget, 1990, Talerico & Berget, 1994, Berget, 1995, G. Wang & Cooper, 2007, Z. Wang & Burge, 2008 e «Human Splicing Finder - Version 3.1», 2018).

1.6.1.2 Análise *in silico* de alterações moleculares

Para avaliar as consequências de alterações ocorridas em genes ao nível do *splicing*, foi desenvolvido o *Human Splicing Finder* (HSF) (disponível on-line em: <http://www.umd.be/HSF3>), uma ferramenta que prevê os efeitos das alterações nos sítios de *splicing* ou identifica motivos de *splicing* em qualquer sequência de DNA humana (Desmet et al., 2009). Dado que a maioria das alterações encontradas se situavam em intrões ou no fim das sequências exónicas para além do HSF foram utilizadas outras ferramentas informáticas para avaliar as consequências funcionais de alterações *missense*. Através da base de dados *Ensembl*, usou-se o *Variant Effect Predictor* (VEP) (disponível on-line em: <https://www.ensembl.org/info/docs/tools/vep/index.html>) que inclui dois outros programas, o SIFT e o *PolyPhen*. O SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) usa a homologia de sequência para prever se a substituição de um aminoácido afetará a função da proteína e, portanto, se poderá estar associado a determinado fenótipo patológico (Ng & Henikoff, 2003). O *PolyPhen*, é também usado para prever o efeito de determinada alteração na função da proteína (Ramensky, Bork, & Sunyaev, 2002). Como estes dois programas se encontram inseridos no VEP, são usados secundariamente através do algoritmo do programa principal. O terceiro programa utilizado foi o *Alamut Visual Software*, que é um navegador genético que suporta genes humanos (codificação proteica, codificação não-proteica e pseudogenes), e que oferece uma interface com anotações relevantes retiradas de bases de dados públicas, como NCBI, EBI, UCSC e compatível com a nomenclatura HGVS. Permite reportar variantes

e inclui sugestões de patogenidade retiradas de fontes externas. O impacto funcional das variantes é avaliado através de ferramentas informáticas de previsão: ferramentas de previsão de *splicing* (*SpliceSiteFinder-like*, *MaxEntScan*, *NNSPLICE*, *GeneSplicer*), ferramentas ESS e ESE, ferramentas de previsão de alterações *missense* (*Align GVGD*, *SIFT*, *MutationTaster*, *PolyPhen-2*, *KD4v*) («Features of Alamut Visual a Human Variant Interpretation Software», 2018). Dado que o *Alamut Visual Software* tem custos de utilização, foi solicitada uma licença de 30 dias para fazer a análise de todas as alterações encontradas. Todos estes programas permitem analisar *in silico* tipos de alterações específicos e prever o seu efeito/consequência ao nível do *splicing* e/ou da proteína.

1.6.3 Sequenciação de Sanger

Após a análise *in silico* das alterações encontradas por NGS, as mesmas foram confirmadas por sequenciação de Sanger num número selecionado de amostras (3 a 4 amostras). Esta confirmação compreendeu a execução de PCRs simples com as mesmas condições referidas no ponto 1.3.3 deste capítulo. Foram sequenciados os exões 1, 3, 4, 5-6, 8, 9, 11, 12, 15, 18, 22, 23, 25, 26, 27 e 28 e posteriormente analisados os respetivos eletroferogramas.

1.6.4 Restrição Enzimática

Os resultados da restrição enzimática foram analisados através de eletroforeses em gel de agarose Seakem® LE 2% em TAE1x submetidos a 70V num período compreendido entre os 60-70 minutos e pela posterior visualização dos fragmentos de restrição tendo em conta as bandas presentes no gel em comparação com o marcador molecular 100bp através de UV e com as amostras controlo.

CAPÍTULO 4 - RESULTADOS

1. Resultados

Através da abordagem metodológica referida no capítulo anterior foi possível a obtenção dos resultados que são apresentados de seguida. É relevante recordar que o objetivo da presente dissertação compreendeu a pesquisa de alterações no gene *TEX11* em homens azoospermicos da população portuguesa e assim, contribuir para a caracterização molecular do gene em questão.

Os resultados estão divididos em três grupos tendo em conta o modo como foi desenvolvido o trabalho experimental.

1.1 PCRs Múltiplas

Em primeiro lugar, após a realização das metodologias acima referidas, em particular através da abordagem de PCRs múltiplas, foram amplificados todos os exões de *TEX11* por grupos de amostras, para as 80 amostras analisadas, assim como para os 3 controlos. Para cada uma delas foram realizadas eletroforeses em gel de agarose conforme ilustrado na Figura 4.1. Em cada gel podem ser identificados os exões amplificados de acordo com os iniciadores específicos usados e com o peso molecular do respetivo fragmento, que se encontra referido na Tabela 8.1 dos Anexos, em comparação com o marcador molecular 100bp.

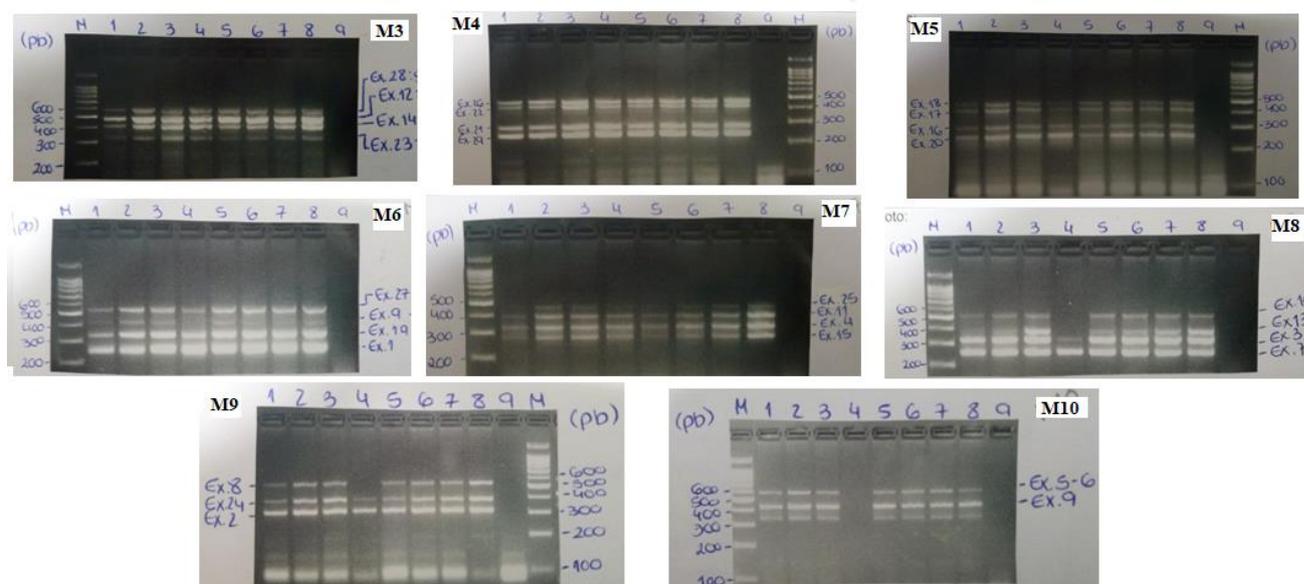


Figura 4.1. – Representação dos géis de agarose referentes aos multiplex. Na figura apresentam-se apenas os géis de agarose para os respetivos 8 multiplex (M3-M10) de algumas das amostras; o marcador 100pb está indicado com um M nas figuras. A ausência de amplificação para alguns fragmentos da amostra presente do canal 4 deve-se a uma menor concentração da amostra usada, o ensaio foi posteriormente repetido com maior quantidade de DNA.

1.2 Sequenciação de Nova Geração

No que diz respeito à sequenciação por NGS o valor de qualidade global das corridas (% bases \geq Q30) foi de 82,4% e de 73,7% na primeira e segunda corridas respetivamente, sendo que o segundo valor foi inferior às especificações mínimas do fabricante para o tipo de kit utilizado (% bases \geq Q30 de 75%).

Como referido anteriormente, foram sequenciadas por NGS 80 amostras e 3 controlos e os resultados da sequenciação foram analisados *in silico*, através do programa IGV e das ferramentas on-line anteriormente referidas. Todas as alterações encontradas foram filtradas tendo em conta os parâmetros que considerámos relevantes e que estão descritos no capítulo anterior. Os dados obtidos por NGS permitiram então a pesquisa de alterações ao longo do gene *TEX11* para cada amostra.

Nas tabelas 4.1., 4.2. e 4.3. estão compilados os dados recolhidos dos programas HSF, VEP e Alamut Visual Software, respetivamente, bem como a informação acerca da influência de cada uma das alterações ao nível do *splicing* e/ou da proteína. Todas as alterações já conhecidas encontram-se na Tabela 4.6. bem como a sua prevalência na população (mundial, africana, europeia e da península ibérica).

Após a análise *in silico* foi possível dividir as alterações em cinco grupos (Tabela 4.4.) e verificar que cinco das alterações encontradas podiam ser classificadas como potencialmente patogénicas; estas alterações encontram-se representadas na Tabela 4.5. assim como os exões onde se localizam.

Tabela 4.1. – Alterações encontradas por NGS e o seu impacto a nível do *splicing* e da proteína. Resultados do programa HSF.

ID (Obs.)-Observações sobre a alteração. ALTERAÇÃO-Nome da alteração (HGVS).

HSF-*Human Splicing Finder*. SIS-Sem impacto no *splicing*. PSIS-Provavelmente sem impacto no *splicing*. PAS-Potencial alteração do *splicing*. NSAS-Novo sítio aceitador de *splicing*. NSDS-Novo sítio dador de *splicing*. QESE- *Exonic Splicing Enhancer* quebrado. QESS- *Exonic Splicing Silencer* quebrado. NESS-Novo *Exonic Splicing Silencer*. NESE-Novo *Exonic Splicing Enhancer*.

A sombreado encontram-se as alterações classificadas como potencialmente patogénicas.

ALTERAÇÃO			HSF
ID (Obs.)	cDNA	Proteína	
rs184242530	c.2730+188C>A	-	PSIS
rs12010019	c.2730+137A>G	-	SIS
rs1536250	c.2566-3T>C	-	SIS
rs1536251	c.2566-4A>T	-	SIS
rs763757854	c.2566-47T>A	-	PSIS
rs41303711	c.2565+58T>C	-	PSIS
rs16991177	c.2541T>C	p.Asp847=	PAS (NSAS e NESE)
rs12690066	c.2336-58G>A	-	PSIS
rs4844240	c.2319T>A	p.Thr773=	SIS
Não descrita	c.2112+39G>T	-	SIS
rs12014919	c.1995+124G>A	-	PSIS
rs201736085	c.1925-37A>G	-	SIS
rs1325094	c.1654-23C>T	-	SIS
rs5980983	c.1654-25A>G	-	PSIS
rs4844247	c.1351G>A	p.Glu451Lys	PAS (QESE e QESS)
rs188603291	c.971-73G>A	-	PSIS
rs139872637	c.942C>T	p.Gly314=	PAS (NSDS)
rs6653304	c.889-27T>C	-	PSIS
rs5902674	c.738-16dupT	-	SIS
rs192923840	c.652-170T>C	-	PSIS
rs17301944	c.571-26T>C	-	SIS
rs147088100	c.450C>T	p.Ala150=	PAS (QESE)
rs6525433	c.389A>G	p.Lys130Arg	PAS (NESS e QESE)
rs144220663	c.290-22T>C	-	SIS

rs5937008	c.289+35G>A	-	SIS
Não descrita	c.204+30A>G	-	PSIS
Não descrita	c.82+60A>G	-	PSIS

Tabela 4.2. – Alterações encontradas por NGS e o seu impacto a nível do *splicing* e da proteína. Resultados do programa VEP.

ID (Obs.)-Observações sobre a alteração. ALTERAÇÃO-Nome da alteração (HGVS).

VEP-Variant Effect Predictor (*Ensembl*). PD/SEIS-Predição difícil/Sem evidência de impacto no *splicing*. SIFT-*Sorting Intolerant From Tolerant*. PolyPhen-Polymorphism Phenotyping.

A sombreado encontram-se as alterações classificadas como potencialmente patogénicas.

ALTERAÇÃO			VEP			
ID (Obs.)	cDNA	Proteína	Informação/Consequência	Impacto no <i>Splicing</i>	SIFT	PolyPhen
rs184242530	c.2730+188C>A	-	Variante Intrónica	PD/SEIS	-	-
rs12010019	c.2730+137A>G	-	Variante Intrónica	PD/SEIS	-	-
rs1536250	c.2566-3T>C	-	Sítio aceitador de <i>splicing</i> - IVS27	BAIXO	-	-
rs1536251	c.2566-4A>T	-	Sítio aceitador de <i>splicing</i> - IVS27	BAIXO	-	-
rs763757854	c.2566-47T>A	-	Variante Intrónica	PD/SEIS	-	-
rs41303711	c.2565+58T>C	-	Variante Intrónica	PD/SEIS	-	-
rs16991177	c.2541T>C	p.Asp847=	Sinónima	BAIXO	-	-
rs12690066	c.2336-58G>A	-	Variante Intrónica	PD/SEIS	-	-
rs4844240	c.2319T>A	p.Thr773=	Sinónima	BAIXO	-	-
Não descrita	c.2112+39G>T	-	Variante Intrónica	PD/SEIS	-	-
rs12014919	c.1995+124G>A	-	Variante Intrónica	PD/SEIS	-	-
rs201736085	c.1925-37A>G	-	Variante Intrónica	PD/SEIS	-	-
rs1325094	c.1654-23C>T	-	Variante Intrónica	PD/SEIS	-	-
rs5980983	c.1654-25A>G	-	Variante Intrónica	PD/SEIS	-	-
rs4844247	c.1351G>A	p.Glu451Lys	Missense	MODERADO	Tolerada	Benigna
rs188603291	c.971-73G>A	-	Variante Intrónica	PD/SEIS	-	-
rs139872637	c.942C>T	p.Gly314=	Sinónima	BAIXO	-	-
rs6653304	c.889-27T>C	-	Variante Intrónica	PD/SEIS	-	-
rs5902674	c.738-16dupT	-	Variante Intrónica	PD/SEIS	-	-
rs192923840	c.652-170T>C	-	Variante Intrónica	PD/SEIS	-	-
rs17301944	c.571-26T>C	-	Variante Intrónica	PD/SEIS	-	-
rs147088100	c.450C>T	p.Ala150=	Patogénica Alteração no <i>splicing</i> Sinónima	BAIXO	-	-
rs6525433	c.389A>G	p.Lys130Arg	Missense	MODERADO	Tolerada	Benigna
rs144220663	c.290-22T>C	-	Variante Intrónica	PD/SEIS	-	-
rs5937008	c.289+35G>A	-	Variante Intrónica	PD/SEIS	-	-
Não descrita	c.204+30A>G	-	Variante Intrónica	PD/SEIS	-	-
Não descrita	c.82+60A>G	-	Variante Intrónica	PD/SEIS	-	-

Tabela 4.3. – Alterações encontradas por NGS e o seu impacto ao nível do *splicing* e da proteína. Resultados do programa *Alamut Visual Software*.

SIS-Sem impacto no *splicing*. PSIS-Provavelmente sem impacto no *splicing*. PAS-Potencial alteração do *splicing*. ESE-Exonic *Splicing Enhancer*.

A sombreado encontram-se as alterações classificadas como potencialmente patogénicas.

ALTERAÇÃO			ALAMUT		
ID (Obs.)	cDNA	Proteína	Dadores de Splicing	Aceitadores de Splicing	ESE
rs184242530	c.2730+188C>A	-	SIS	PSIS	PAS
rs12010019	c.2730+137A>G	-	PAS	PSIS	PSIS
rs1536250	c.2566-3T>C	-	SIS	PAS	PAS
rs1536251	c.2566-4A>T	-	SIS	PAS	PAS
rs763757854	c.2566-47T>A	-	PAS	SIS	PAS
rs41303711	c.2565+58T>C	-	SIS	SIS	PAS
rs16991177	c.2541T>C	p.Asp847=	SIS	PAS	PAS
rs12690066	c.2336-58G>A	-	SIS	SIS	PAS
rs4844240	c.2319T>A	p.Thr773=	SIS	SIS	SIS
Não descrita	c.2112+39G>T	-	SIS	SIS	PAS
rs12014919	c.1995+124G>A	-	PAS	PSIS	PAS
rs201736085	c.1925-37A>G	-	SIS	SIS	PAS
rs1325094	c.1654-23C>T	-	SIS	SIS	PAS
rs5980983	c.1654-25A>G	-	SIS	SIS	PAS
rs4844247	c.1351G>A	p.Glu451Lys	SIS	SIS	PAS
rs188603291	c.971-73G>A	-	SIS	PAS	PSIS
rs139872637	c.942C>T	p.Gly314=	PAS	PAS	PAS
rs6653304	c.889-27T>C	-	SIS	PSIS	PSIS
rs5902674	c.738-16dupT	-	SIS	PSIS	SIS
rs192923840	c.652-170T>C	-	SIS	PAS	PAS
rs17301944	c.571-26T>C	-	SIS	PSIS	SIS
rs147088100	c.450C>T	p.Ala150=	PAS	PSIS	SIS
rs6525433	c.389A>G	p.Lys130Arg	SIS	PSIS	PAS
rs144220663	c.290-22T>C	-	SIS	PSIS	PSIS
rs5937008	c.289+35G>A	-	PAS	PSIS	SIS
Não descrita	c.204+30A>G	-	PSIS	PAS	PAS
Não descrita	c.82+60A>G	-	PAS	PSIS	SIS

Tabela 4.4. – Classificação das alterações encontradas através da NGS.

Alteração	Total de Amostras (Frequência)
i.Benignas	
c.2319T>A	80 (1,000)
ii.Provavelmente benignas	
c.889-27T>C	4 (0,051)
c.571-26T>C	7 (0,088)
c.290-22T>C	1 (0,013)
iii.Patogenicidade desconhecida/Predição difícil	
c.2730+188C>A	1 (0,013)
c.2730+137A>G	1 (0,013)
c.2566-3T>C	69 (0,863)
c.2566-4A>T	69 (0,863)
c.2566-47T>A	1 (0,013)
c.2565+58T>C	3 (0,038)
c.2336-58G>A	1 (0,013)

c.2112+39G>T	1 (0,013)
c.1995+124G>A	11 (0,138)
c.1925-37A>G	1 (0,013)
c.1654-23C>T	42 (0,525)
c.1654-25A>G	17 (0,213)
c.971-73G>A	1 (0,013)
c.738-16dupT	40 (0,500)
c.652-170T>C	1 (0,013)
c.289+35G>A	33 (0,413)
c.204+30A>G	1 (0,013)
iii.Provavelmente Patogénicas	
c.2541T>C	1 (0,013)
c.1351G>A	2 (0,025)
c.942C>T	1 (0,013)
c.389A>G	6 (0,075)
iv.Patogénicas	
c.450C>T	1 (0,013)

Tabela 4.5. - Alterações encontradas por NGS classificadas como potencialmente patogénicas.

ALTERAÇÃO			LOCALIZAÇÃO
ID (Obs.)	cDNA	Proteína	
rs16991177	c.2541T>C	p.Asp847=	Ex.27
rs4844247	c.1351G>A	p.Glu451Lys	Ex.15
rs139872637	c.942C>T	p.Gly314=	Ex.11
rs147088100	c.450C>T	p.Ala150=	Ex.5
rs6525433	c.389A>G	p.Lys130Arg	Ex.5

Tabela 4.6. – Descrição e frequência alélica das alterações conhecidas. População global (ALL), população africana (AFR), população europeia (EUR) e península Ibérica (IBS). Dados recolhidos da base de dados *Ensembl – 1000 Genomes*. População PT (P.E.)-População Portuguesa do Presente estudo.

ID-Identificação. REF-Alelo de Referência. ALT-Alelo Alterado.

^(a)Frequência relativa aos alelos analisados apenas nas amostras.

A sombreado encontram-se as alterações classificadas como potencialmente patogénicas.

ID	cDNA	REF	ALT	FREQUÊNCIA ALÉLICA				
				ALL	AFR	EUR	IBS	PT (P.E.) ^(a)
rs184242530	c.2730+188C>A	C	A	C: 0,999 (3770) A: 0,001 (5)	C: 1,000 (1003)	C: 0,993 (761) A: 0,007 (5)	C: 1,000 (160)	C: 0,987 (79) A: 0,013 (1)
rs12010019	c.2730+137A>G	A	G	A: 0,994 (3753) G: 0,006 (22)	A: 0,982 (985) G: 0,018 (18)	A: 1,000 (766)	A: 1,000 (160)	A: 0,987 (79) G: 0,013 (1)
rs1536250	c.2566-3T>C	T	C	T: 0,100 (379) C: 0,900 (3396)	T: 0,183 (184) C: 0,817 (819)	T: 0,056 (43) C: 0,944 (723)	T: 0,044 (7) C: 0,956 (153)	T: 0,137 (11) A: 0,863 (69)
rs1536251	c.2566-4A>T	A	T	A: 0,100 (379) T: 0,900 (3396)	A: 0,183 (184) T: 0,817 (819)	A: 0,056 (43) T: 0,944 (723)	A: 0,044 (7) T: 0,956 (153)	A: 0,137 (11) T: 0,863 (69)
rs763757854	c.2566-47T>A	T	A	T: 0,999 (152710) A: 1,440e-04 (22)	T: 1,000 (11977)	-	-	T: 0,987 (79) A: 0,013 (1)
rs41303711	c.2565+58T>C	T	C	T: 0,846 (3192) C: 0,154 (583)	T: 0,651 (653) C: 0,349 (350)	T: 0,990 (758) C: 0,010 (8)	T: 0,988 (158) C: 0,013 (2)	T: 0,962 (77) C: 0,038 (3)
rs16991177	c.2541T>C	T	C	T: 0,864 (3261) G: 0,002 (9) C: 0,134 (505)	T: 0,874 (877) C: 0,126 (126)	T: 0,963 (738) C: 0,037 (28)	T: 0,963 (154) C: 0,037 (6)	T: 0,987 (79) C: 0,013 (1)
rs12690066	c.2336-58G>A	G	A	G: 0,952 (3592) A: 0,048 (183)	G: 1,000 (1003)	G: 1,000 (766)	G: 1,000 (160)	G: 0,987 (79) A: 0,013 (1)
rs4844240	c.2319T>A	T	A	T: 0,024 (89) A: 0,976 (3686)	T: 0,086 (86) A: 0,914 (917)	T: 0,001 (1) A: 0,999 (765)	T: 0,006 (1) A: 0,994 (159)	A: 1,000 (80)
rs12014919	c.1995+124G>A	G	A	G: 0,913 (3447) A: 0,087 (328)	G: 0,896 (899) A: 0,104 (104)	G: 0,826 (633) A: 0,174 (133)	G: 0,806 (129) A: 0,194 (31)	G: 0,862 (69) A: 0,138 (11)
rs201736085	c.1925-37A>G	A	G	A: 0,999 (3772) G: 0,001 (3)	A: 1,000 (1003)	A: 0,999 (765) G: 0,001 (1)	A: 0,994 (159) G: 0,006 (1)	A: 0,987 (79) G: 0,013 (1)

rs1325094	c.1654-23C>T	C	T	C: 0,311 (1174) T: 0,689 (2601)	C: 0,453 (454) T: 0,547 (549)	C: 0,435 (333) T: 0,565 (433)	C: 0,500 (80) T: 0,500 (80)	C: 0,475 (38) T: 0,525 (42)
rs5980983	c.1654-25A>G	A	G	A: 0,879 (3320) G: 0,121 (455)	A: 0,846 (849) G: 0,154 (154)	A: 0,798 (611) G: 0,202 (155)	A: 0,750 (120) G: 0,250 (40)	A: 0,787 (63) G: 0,213 (17)
rs4844247	c.1351G>A	G	A	G: 0,866 (3270) A: 0,134 (505)	G: 0,880 (883) A: 0,120 (120)	G: 0,967 (741) A: 0,033 (25)	G: 0,969 (155) A: 0,031 (5)	G: 0,975 (78) A: 0,025 (2)
rs188603291	c.971-73G>A	G	A	G: 0,998 (3769) A: 0,002 (6)	G: 0,999 (1002) A: 0,001 (1)	G: 0,996 (763) A: 0,004 (3)	G: 0,988 (158) A: 0,013 (2)	G: 0,987 (79) A: 0,013 (1)
rs139872637	c.942C>T	C	T	C: 0,999 (176257) T: 4,538e-05 (8) A: 2,836e-05 (5)	C: 0,999 (12175) T: 1,642e-04 (2) A: 0,000	-	-	C: 0,987 (79) T: 0,013 (1) A: 0,000
rs6653304	c.889-27T>C	T	C	T: 0,909 (3431) C: 0,091 (344)	T: 0,856 (859) C: 0,144 (144)	T: 0,941 (721) C: 0,059 (45)	T: 0,944 (151) C: 0,056 (9)	T: 0,949 (76) C: 0,051 (4)
rs5902674	c.738-16dupT	TC	TTC	-	-	-	-	TC: 0,500 (40) TTC: 0,500 (40)
rs192923840	c.652-170T>C	T	C	T: 0,998 (3766) C: 0,002 (9)	T: 1,000 (1003)	T: 0,997 (764) C: 0,003 (2)	T: 0,994 (159) C: 0,006 (1)	T: 0,987 (79) C: 0,013 (1)
rs17301944	c.571-26T>C	T	C	T: 0,966 (3645) C: 0,034 (130)	T: 0,997 (1000) C: 0,003 (3)	T: 0,889 (681) C: 0,111 (85)	T: 0,900 (144) C: 0,100 (16)	T: 0,912 (73) C: 0,088 (7)
rs147088100	c.450C>T	C	T	C: 0,999 (3772) T: 0,001 (3)	C: 0,999 (1002) T: 0,001 (1)	C: 0,997 (764) T: 0,003 (2)	C: 1,000 (160)	C: 0,987 (79) T: 0,013 (1)
rs6525433	c.389A>G	A	G	A: 0,733 (2768) G: 0,267 (1007)	A: 0,586 (588) G: 0,414 (415)	A: 0,995 (762) G: 0,005 (4)	A: 0,988 (158) G: 0,013 (2)	A: 0,925 (74) G: 0,075 (6)
rs144220663	c.290-22T>C	T	C	T: 0,905 (3415) C: 0,095 (360)	T: 0,887 (890) C: 0,113 (113)	T: 1,000 (766)	T: 1,000 (160)	T: 0,987 (79) C: 0,013 (1)
rs5937008	c.289+35G>A	G	A	G: 0,623 (2353) A: 0,377 (1422)	G: 0,895 (898) A: 0,105 (105)	G: 0,512 (392) A: 0,488 (374)	G: 0,544 (87) A: 0,456 (73)	G: 0,587 (47) A: 0,413 (33)

1.3 Restrição Enzimática

Através da digestão enzimática foi possível obter os resultados parciais são representados abaixo (figuras 4.2. e 4.3.), como referido no capítulo 3, foram realizados ensaios de restrição enzimática para pesquisa das duas alterações (c.450C>T ou p.Ala150= e c.942C>T ou p.Gly314=) para avaliar da sua frequência em 102 homens férteis. Esta pesquisa permitiu demonstrar que nenhum destes homens tinha qualquer uma destas alterações.

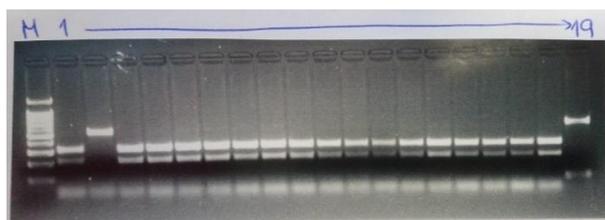


Figura 4.2. – Resultado da restrição enzimática para o fragmento do exão 5-6 digerido com a enzima HaeIII. A amostra no poço 2 é a amostra que tem a alteração c.450C>T e no poço 19 encontra-se uma amostra não submetida a restrição enzimática, nos restantes poços encontram-se as amostras digeridas de homens férteis. O marcador 100bp está representado na figura pela letra M.

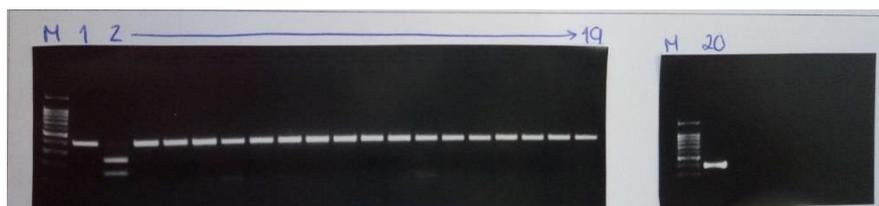


Figura 4.3. – Resultado da restrição enzimática para o fragmento do exão 11 digerido com a enzima HphI. A amostra no poço 2 é a amostra que tem a alteração c.942C>T e no poço 20 encontra-se uma amostra que não submetida a restrição

enzimática, nos restantes poços encontram-se as amostras digeridas de homens férteis. O marcador 100bp está representado na figura pela letra M.

1.4 Sequenciação de Sanger

As alterações encontradas por NGS foram posteriormente confirmadas por sequenciação de Sanger. Escolheram-se algumas amostras que por NGS revelaram a presença de determinada alteração e procedeu-se à amplificação por PCR do respetivo fragmento que foi subsequentemente purificado e sequenciado pelo método de sequenciação cíclica de Sanger. Apresenta-se abaixo exemplos de alguns de eletroferogramas obtidos Figura 4.5, os quais permitiram confirmar as alterações em causa a nível genómico pela metodologia de referência (Tabela 4.7.).

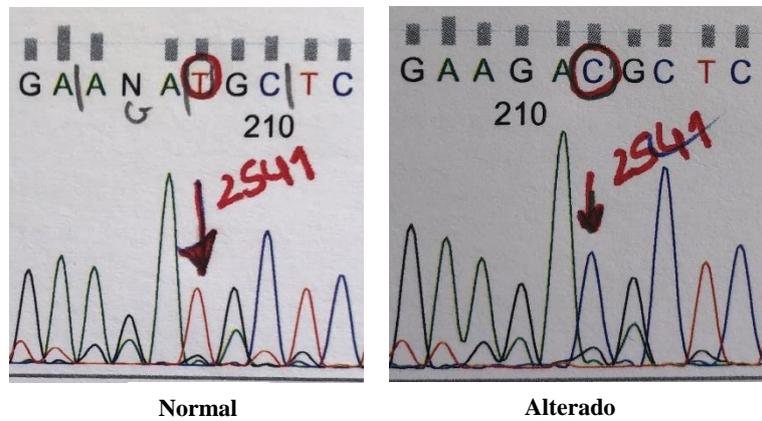
Tabela 4.7. – Confirmação das alterações por sequenciação de Sanger.

^(a)Controlo masculino (normozoospermico); ^(b)Controlo feminino

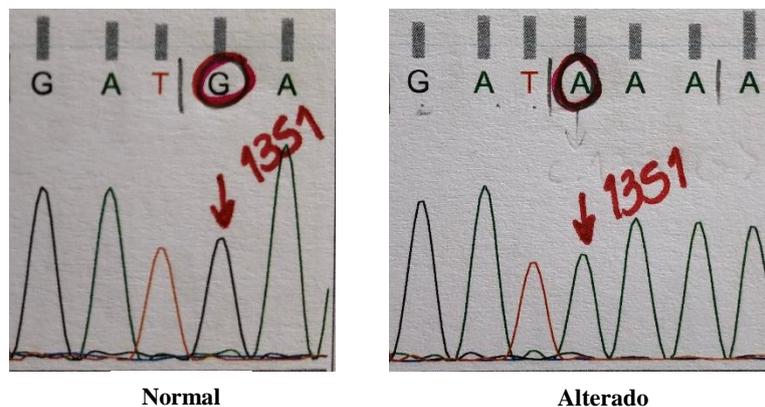
Alteração	Amostra	Resultado
c.2730+188C>A	INO21	Confirmada
c.2730+137A>G	INO41	Confirmada
c.2566-3T>C	INO1 ^(a)	Confirmada
	INO14	Confirmada
	INO23	Confirmada
c.2566-4A>T	INO1 ^(a)	Confirmada
	INO14	Confirmada
	INO23	Confirmada
c.2566-47T>A	INO7	Confirmada
c.2565+58T>C	INO14	Confirmada
	INO23	Confirmada
c.2541T>C	INO38	Confirmada
	INO61	Confirmada
c.2336-58G>A	INO14	Confirmada
c.2319T>A	INO7	Confirmada
	INO23	Confirmada
c.2112+39G>T	INO77	Confirmada
c.1995+124G>A	INO1 ^(a)	Confirmada
	INO4	Confirmada
	INO16	Confirmada
	INO28	Confirmada
c.1925-37A>G	INO75	Confirmada
c.1654-23C>T	INO6	Confirmada
	INO68	Confirmada
	INO79	Confirmada
c.1654-25A>G	INO12	Confirmada
	INO60	Confirmada
	INO70	Confirmada
c.1351G>A	INO38	Confirmada
	INO61	Confirmada
c.971-73G>A	INO31	Confirmada
c.942C>T	INO52	Confirmada

c.889-27T>C	INO33	Confirmada
	INO39	Confirmada
	INO48	Confirmada
c.738-16dupT	INO1 ^(a)	Confirmada
	INO48	Confirmada
	INO52	Confirmada
	INO77	Confirmada
c.652-170T>C	INO72	Confirmada
c.571-26T>C	INO9	Confirmada
	INO22	Confirmada
c.450C>T	INO67	Confirmada
c.389A>G	INO14	Confirmada
	INO28	Confirmada
	INO67	Confirmada
c.290-22T>C	INO14	Confirmada
c.289+35G>A	INO35	Confirmada
	INO50	Confirmada
	INO59	Confirmada
c.204+30A>G	INO57	Confirmada
c.82+60A>G	INO83	Não Confirmada (Falso Positivo)

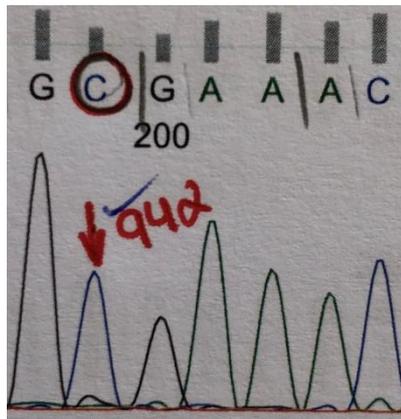
A - c.2541T>C



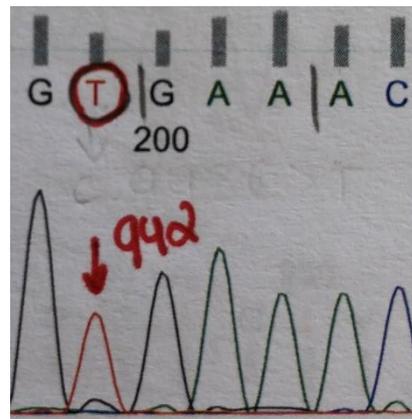
B - c.1351G>A



C - c.942C>T

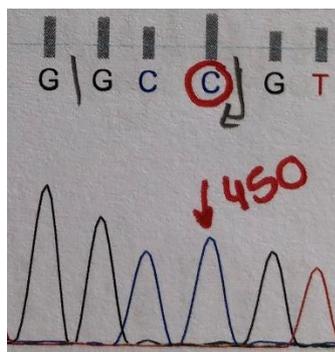


Normal

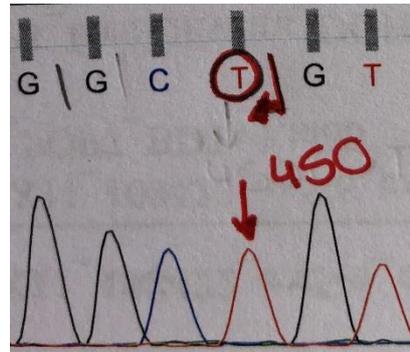


Alterado

D - c.450C>T

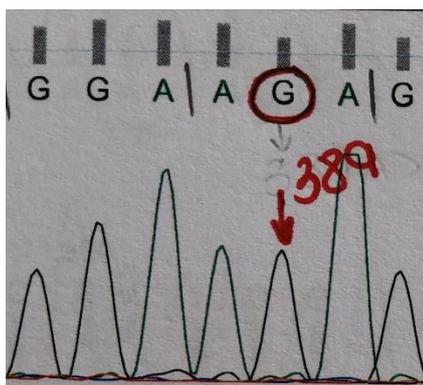


Normal

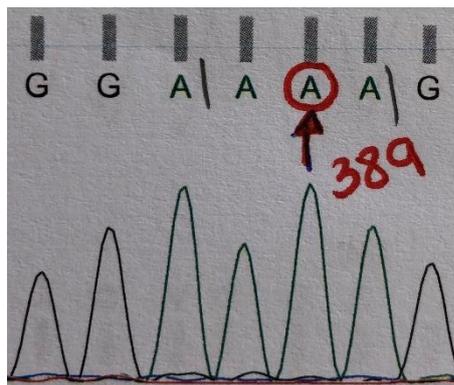


Alterado

E - c.389A>G



Normal



Alterado

Figura 4.4. – Exemplos de alguns dos eletroferogramas resultantes da sequenciação de Sanger.

CAPÍTULO 5 – DISCUSSÃO DE RESULTADOS

1. Discussão de Resultados

A meiose tem um papel essencial na geração de diversidade biológica e na sobrevivência das espécies. Compreende-se, portanto, que muitas proteínas meióticas que estão envolvidas no cruzamento cromossômico e recombinação do DNA sejam altamente conservadas evolutivamente. Consequentemente, alterações nestas proteínas não são geralmente toleradas na natureza, e, por conseguinte, a interrupção da meiose pode originar esterilidade parcial ou completa (Yatsenko et al., 2015).

Conhecendo-se a função que a proteína codificada pelo gene *TEX11* desempenha na formação do complexo sinaptonémico na fase I da meiose, é pertinente assumir que alterações neste gene, em homens, podem afetar a formação e função do complexo sinaptonémico, causando grandes distúrbios na sinapse na fase de paquíteno e nos pontos de controlo do fuso da anafase; esta interrupção, por sua vez, desencadeia a paragem da meiose, apoptose dos espermatócitos culminando em azoospermia. A descoberta de que alterações no gene *TEX11* ocorrem em homens inférteis com paragem meiótica foi um primeiro contributo importante para compreender melhor a gametogénese masculina e o diagnóstico de azoospermia (Yatsenko et al., 2015).

Face ao exposto, e tendo em conta a função desempenhada pelo gene em questão na meiose I, podemos inferir que alterações consideradas patogénicas ou potencialmente patogénicas neste gene, que afetem total ou parcialmente a função da proteína, podem apresentar-se como possível causa para o fenótipo observado nos doentes do presente estudo.

1.1 Deleções em *TEX11* (PCRs múltiplas)

Em primeiro lugar, no que diz respeito aos resultados das PCRs múltiplas (figura 4.1. do capítulo anterior), em nenhuma das amostras foi detetada qualquer deleção no gene em causa, dado que todos os exões foram amplificados com sucesso em todas as amostras de homens azoospermicos em estudo (n=80). Face aos resultados obtidos nesta pesquisa, e aos dados publicados na literatura, a ocorrência de deleções neste gene afigurar-se muito rara, somente Yatsenko A e colaboradores (2015) detetaram a deleção dos exões 10 a 12 do gene *TEX11* em dois doentes, o que corresponde a uma frequência de 0,04 (2/49). Embora se tenha demonstrado que o mecanismo molecular que determina a ocorrência da deleção está dependente da existência das sequências genómicas repetitivas que a flanqueiam, aparentemente a mesma ocorre com uma frequência inferior à determinada para as microdeleções AZF do cromossoma Y (dado que o mecanismo de ocorrência será semelhante). Por outro lado, a deleção em causa não contribui para eliminar completamente as células germinativas nos túbulos seminíferos dado que os dois doentes descritos por Yatsenko, embora azoospermicos, possuem atrofia testicular mista. Os resultados obtidos e os disponíveis na literatura, permitem sugerir que a pesquisa de deleções extensas no gene em causa deverá ser alargado a um maior número de homens inférteis com espermogramas completos, assim como com estudos histológicos de biópsias testiculares a fim de proporcionarem boas correlações genótipo/fenótipo. Este tipo de deleções, embora sejam extensas e possam estar associadas a fenótipos de infertilidade masculina bastante graves, poderão ser transmitidas de geração em geração somente pelas mulheres não ocorrendo casos de infertilidade. Estes só se manifestarão nas famílias em que os elementos do sexo masculino herdem as deleções em causa, assumindo, neste caso, que as mesmas não afetarão a fertilidade feminina de forma significativa.

1.2 Alterações pontuais detetadas no gene *TEX11* (Sequenciação de Nova Geração)

No que diz respeito aos resultados da NGS, considerando a aplicação dos critérios de exclusão usados, foram encontradas 27 alterações diferentes nas sequências flanqueadoras dos exões ou nos próprios exões. Todas as alterações estão representadas nas Tabelas 4.1., 4.2. e 4.3. do capítulo anterior; estas alterações foram confirmadas por sequenciação de Sanger através da análise de eletroferogramas que podem ser observados alguns exemplos na Figura 4.4. do capítulo anterior e, como se pôde verificar (tabela 4.7. do capítulo anterior), todas, exceto uma (c.82+60A>G), correspondem a alterações verdadeiras e não a erros da NGS. Este falso positivo poderá dever-se ao facto de esta alteração apresentar um número de leituras de apenas 20 vezes, ou seja, encontra-se no limite aceitável.

Posto isto, é possível verificar que o gene em estudo é muito polimórfico, uma vez que muitas das alterações encontradas demonstram claramente ser polimorfismos, tendo em conta quer os dados do presente estudo quer os dados já referenciados na literatura. Além disso podemos ainda verificar que as frequências das alterações encontradas no presente estudo vão de encontro às frequências já referenciadas na literatura. Ver tabelas 4.4. e 4.6. do capítulo anterior.

Obtidos os resultados dados da análise *in silico* para as alterações encontradas estas foram divididas em cinco grupos (Tabela 4.4. do capítulo anterior) (segundo uma classificação adaptada de Plon et al., 2008): (i) benignas, (ii) provavelmente benignas (iii) patogenicidade desconhecida/predição difícil, (iv) provavelmente patogénicas e (v) patogénicas.

No primeiro grupo, das alterações benignas, inclui-se a única alteração (c.2319T>A) cujos programas de análise *in silico* utilizados demonstraram concordância de que não causa qualquer impacto quer a nível do *splicing* quer a nível da própria proteína. Esta alteração está presente em todas as amostras e controlos e encontra-se descrita na literatura em diversas bases de dados (Tabela 4.6. do capítulo anterior). Assim, a sua presença em homens azoospermicos não é relevante para explicar a infertilidade dos mesmos.

No segundo grupo encontram-se as alterações (i.e. c.889-27T>C, c.571-26T>C e c.290-22T>C) sobre as quais apesar de existir consenso no que diz respeito ao seu impacto quer a nível do *splicing*, demonstraram pouca probabilidade de causar impacto ou a sua predição era difícil.

O terceiro grupo compreende as alterações cujos programas *in silico* utilizados não demonstraram consenso no que diz respeito ao seu impacto destas no *splicing*. *A priori* podemos dizer, que seis das alterações (i.e. c.2566-3T>C, c.2566-4A>T, c.1995+124G>A, c.1654-23C>T, c.738-16dupT e c.289+35G>A) presentes neste grupo não serão relevantes para a patologia em estudo, uma vez que estão presentes em pelo menos um dos controlos masculinos normozoospermicos e apresentam uma elevada frequência na população em estudo, pelo que, poderão tratar-se de polimorfismos. Também as alterações c.2565+58T>C e c.1654-25A>G, apesar de não estarem presentes em nenhum dos controlos normozoospermicos, por apresentarem uma elevada frequência quer na população em estudo quer nas populações cujos dados foram recolhidos da base de dados *Ensembl-1000Genomes* (ver Tabela 4.6. do capítulo anterior) sugerem tratar-se igualmente de polimorfismos, não sendo, por isso, relevantes para a patologia em questão.

Por outro lado, importa referir que as restantes nove alterações (i.e. c.2730+188C>A, c.2730+137A>G, c.2566-47T>A, c.2336-58G>A, c.2112+39G>T, c.1925-37A>G, c.971-73G>A, c.652-170T>C e c.204+30A>G) presentes neste grupo, apesar de potencialmente poderem afetar o *splicing* segundo os algoritmos utilizados pelo *Alamut Visual Software*, tal não se verificou nos restantes programas utilizados o que torna a sua predição difícil e, por essa razão, foram incluídas neste grupo.

As alterações anteriormente referidas, face aos resultados da análise *in silico*, por não revelarem evidências suficientes e apresentarem resultados contraditórios face à potencial perturbação da função do gene *TEX11* ou da respetiva proteína, não foram associadas a azoospermia e não se procedeu à confirmação da sua existência recorrendo a outra metodologia.

No grupo das alterações provavelmente patogénicas incluem-se alterações cujos programas de análise *in silico* utilizados demonstraram concordância em como podem afetar o *splicing* e/ou a função proteínica, mas que, não estão descritas como patogénicas. Por último, o grupo das alterações patogénicas identificadas, inclui apenas a alteração c.450C>T, a qual já foi descrita por Yatsenko A e colaboradores (2015), tendo sido também recentemente identificada por Tüttelmann, F e colaboradores, num estudo com 123 doentes azoospermicos com NOA, apresentada no poster P01-39C/C 52nd *European Human Genetics Conference*, em Milão no presente ano.

Após a análise inicial dos resultados obtidos, a posterior análise dos dados focou-se predominantemente nos dois últimos grupos de alterações dado que para estes grupos foram selecionadas as alterações com maior probabilidade de serem patogénicas e de eventualmente se estabelecer uma relação de causa-efeito ou correlação genótipo-fenótipo.

Assim, a análise das alterações encontradas por NGS permitiu-nos verificar que duas das alterações potencialmente patogénicas c.389A>G, p.Lys130Arg (rs6525433) e c.1351G>A, p.Glu451Lys (rs4844247), que se localizam, respetivamente, nos exões 5 e 15 (Figura 5.1.A), são alterações *missense*. Segundo os programas de análise *in silico* usados (i.e. SIFT e PolyPhen – ver tabela 4.2. do capítulo anterior), é possível prever/inferir que o efeito destas alterações na função da proteína é benigno ou tolerado, baseando-se esta previsão na homologia da sequência e nas propriedades físico-químicas do aminoácido normal e respetivo aminoácido alterado. Por outro lado, a alteração c.389A>G, embora sendo *missense*, segundo os algoritmos dos programas HSF e *Alamut Visual Software* poderá afetar um ESE anulando-o e originando um provável ESS (ver Tabela 4.4. do capítulo anterior). Contudo, através da análise da Tabela 4.6. do capítulo anterior podemos verificar que a alteração c.389A>G está presente em 26,7% da população mundial, 41,4% da população africana, 0,5% da população europeia e em 1,3% da população da península ibérica. Esta alteração, apesar de não estar representada em elevada percentagem na população europeia nem na população da península ibérica, está presente em 41,4% da população africana e em 6 das 80 amostras do presente estudo (7,5%) (Tabela 4.4. do capítulo anterior). Esta prevalência mais elevada detetada em doentes portugueses provavelmente deve-se à miscigenação da população portuguesa com a população africana, bem conhecida a diferentes níveis, que ocorreu inicialmente entre os séculos oito e treze, posteriormente depois do século quinze durante os descobrimentos marítimos de Portugal e, mais recentemente, com as migrações dos Países Africanos de Língua Oficial Portuguesa para o nosso país (Lavinha et al., 1992). Quanto à alteração c.1351G>A, que está presente em 2 das 80 amostras do presente estudo (2,5%), prevê-se que cause a quebra de um ESE e de um ESS (ver Tabela 5.2.) contudo, de acordo com os dados recolhidos da Tabela 4.6. do capítulo anterior, esta alteração está presente em 13,4% da população mundial, 12,0% da população africana, 3,3% da população europeia e em 3,1% da população da península ibérica. Os dados referidos sugerem que ambas as alterações, correspondem a polimorfismos e não a alterações potencialmente patogénicas pelo que não podem ser associadas a infertilidade e consequentemente não explicam a azoospermia dos doentes.

As alterações consideradas potencialmente patogénicas c.942C>T, p.Gly314= (rs139872637) e c.2541T>C, p.Asp847= (rs16991177) detetadas, respetivamente, nos exões 11 e 27 são alterações sinónimas (Figura 5.1.), pelo que a nível da proteína não afetarão a estrutura primária nem a função da mesma. A análise *in silico* usando os programas HSF, VEP e *Alamut Visual Software* revelou que a alteração c.942C>T, p.Gly314= cria um novo sítio dador de *splicing* (ver tabela 5.6.); a alteração c.2541T>C cria um novo sítio aceitador de *splicing* e um novo ESE (ver Tabela 5.5.).

Considerando os dados da Tabela 4.6. do capítulo anterior, a alteração c.942C>T tem uma prevalência na população mundial de 0,0045% e na população africana de 0,016%, não existindo informações sobre esta alteração nem na população europeia nem na população da península ibérica; esta alteração está presente em apenas uma amostra dos 80 homens azoospermicos analisados e não foi

detetada em nenhuma das amostras controlo (n=102 homens férteis). Face ao referido, esta alteração não constituirá um polimorfismo, pelo que se infere que poderá eventualmente ser patogénica.

Em relação à alteração c.2541T>C, de acordo com os dados da Tabela 4.6., podemos verificar que está presente em 13,4% da população mundial, 12,6% da população africana, 3,7% da população europeia e da península ibérica, pelo que embora o programa HSF sugira que o *splicing* pode ser afetado na presença da alteração em causa, a sua frequência justifica que a mesma corresponde a um polimorfismo e não a uma alteração potencialmente patogénica.

Por último, a alteração c.450C>T, p.Ala150= (rs147088100) localizada no exão 5 (Figura 5.1.A), também corresponde a uma alteração sinónima, não tem impacto direto na sequência primária da proteína contudo, os dados obtidos da análise *in silico* usando os programas HSF, VEP e *Alamut Visual Software* permitem prever que esta alteração pode afetar o sítio dador de *splicing* (ver Tabela 5.7.). Segundo os algoritmos do HSF prevê-se ainda que possa causar a quebra de um ESE (ver Tabela 5.4.), no entanto, os algoritmos do programa *Alamut Visual Software* não apresentaram resultados consensuais.

Esta alteração encontra-se em 0,1% da população mundial, 0,1% da população africana, 0,3% da população europeia e na população da península ibérica não existem casos registados desta alteração. Os resultados obtidos relativos à pesquisa da alteração c.450C>T, p.Ala150= no grupo de homens férteis da nossa população (Figura 4.2. do capítulo anterior), revelam que esta também não foi detetada em nenhuma das 102 amostras analisadas. Como referido anteriormente, esta alteração já foi descrita por outros autores (Yatsenko et al., 2015 e Tüttelmann et al., 2018) tendo sido considerada patogénica. Face à frequência da mesma e às suas prováveis consequências funcionais, esta alteração poderá eventualmente afetar a eficiência do *splicing* entre o exão 5 e o intrão 6 contudo, a realização de estudos *in vitro* poderá contribuir para confirmar a patogenicidade da alteração em causa.

Atendendo à localização no gene das duas alterações em causa, a alteração c.450C>T, p.Ala150= que presumivelmente afetará o *splicing* entre o exão 5 e o exão 6 (Figura 5.1.), não sendo os valores *consensus* da alteração e da sequência *wild-type* significativamente diferentes (ver Tabela 5.7.), a respetiva proteína poderá ficar pelo menos com o domínio TPR1 afetado, no entanto, as evidências da análise *in silico* do presente estudo não parecem apontar nesta direção. Relativamente à alteração c.942C>T, p.Gly314= o novo sítio dador de *splicing* criado tem um valor de *consensus* de 83,39 e o sítio dador de *splicing wild-type* tem um valor de *consensus* de 87,91 (numa escala de 0-100 para o algoritmo HSF – ver Tabela 5.6.). Sendo estes valores próximos e tendo em conta a posição onde é criado este novo sítio dador de *splicing* (c.940), este poderá competir com o sítio *wild-type* (c.970) e, por isso, podemos inferir que o *splicing* poderá ocorrer neste sítio alternativo afetando a proteína, ou seja, serão eliminados 10 aminoácidos (Figura 5.2.), pelo que o seu domínio SPO22 (domínio específico da meiose) será possivelmente gravemente alterado (Figura 5.1.B) na sua estrutura primária e consequentemente, a função e estabilidade da proteína na meiose deverá estar drasticamente perturbada. Assim, ambas as alterações poderão perturbar a formação do complexo sinaptonémico, afetar a progressão da meiose e consequentemente o bloqueio da espermatogénese.

Este tipo de alterações que perturbam a eficiência do *splicing*, podem afetar gravemente tanto a estrutura primária como a estrutura terciária da proteína em causa. Dado que as alterações de *splicing* não afetam todas as cópias do respetivo mRNA, continuarão a existir moléculas corretamente processadas originando proteínas potencialmente normais pelo que é possível que em alguns doentes possa existir espermatogénese residual ocorrendo também o seu bloqueio em estadios específicos da meiose, assim, a presença destas alterações é compatível com azoospermia.

Tabela 5.1. – Predições dos algoritmos do HSF para os ESE^(a) e ESS^(b) para a alteração c.389A>G.

Posição (hg19)	^(a) Zhang&Chasin [0-100]	^(b) Sironi et al. [0-100]
c.384	32,91 → -	-
c.385	- → 35,28	- → 61,98
c.386	-	- → 68,19

Tabela 5.2. – Predições dos algoritmos do HSF para os ESE^(a) e ESS^(b) para a alteração c.1351G>A.

Posição (hg19)	^(a) Zhang&Chasin [0-100]	^(b) Sironi et al. [0-100]
c.1346	32,21 → -	61,41 → 10,96

Tabela 5.3. – Predições dos algoritmos do HSF para os ESE^(a) para a alteração c.2541T>C.

Posição (hg19)	^(a) Zhang&Chasin [0-100]
c.2535	- → 36,46
c.2536	- → 36,78
c.2538	- → 34,78

Tabela 5.4. – Predições dos algoritmos do HSF para os ESE^(a) e ESS^(b) para a alteração c.450C>T.

Posição (hg19)	^(a) Zhang&Chasin [0-100]	^(b) Sironi et al. [0-100]
c.443	66,15 → -	-
c.444	34,45 → -	73,23 → 71,20

Tabela 5.5. – Predições dos algoritmos do *Alamut Visual Software* para os sítios aceitadores de *splicing* para a alteração c.2541T>C. ^(a)Sítio de *splicing wild-type*; ^(b)valor *consensus wild-type* e valor *consensus* para a alteração;

Posição (hg19)	SSF [0-100]	MaxEnt [0-12]	NNSPLICE [0-1]	GeneSplicer [0-24]	HSF [0-100]
c.2445 ^(a)	-	-	-	=6,48	-
c.2540	-	0,69 → - ^(b)	-	-	76,95 → 76,10 ^(b)

Tabela 5.6. – Predições dos algoritmos do *Alamut Visual Software* e do HSF para os sítios dadores de *splicing* para a alteração c.942C>T e para o sítio dador *wild-type* (c.970). ^(a)valor *consensus wild-type* e valor *consensus* para a alteração; ^(b)Sítio de *splicing wild-type*.

Posição (hg19)	SSF [0-100]	MaxEnt [0-12]	NNSPLICE [0-1]	GeneSplicer [0-24]	HSF [0-100]
c.940	- → 77,85 ^(a)	- → 4,51 ^(a)	-	-	- → 83,39 ^(a)
c.970 ^(b)	=84,19	=9,11	=0,93	-	=87,91

Tabela 5.7. – Predições dos algoritmos do *Alamut Visual Software* para os sítios dadores de *splicing* para a alteração c.450C>T. ^(a)Sítio de *splicing wild-type*; ^(b)valor *consensus wild-type* e valor *consensus* para a alteração;

Posição (hg19)	SSF [0-100]	MaxEnt [0-12]	NNSPLICE [0-1]	GeneSplicer [0-24]	HSF [0-100]
c.450 ^(a)	74,72 → 75,42 ^(b)	10,11 → 8,56 ^(b)	0,97 → 0,91 ^(b)	-	82,48 → 82,62 ^(b)

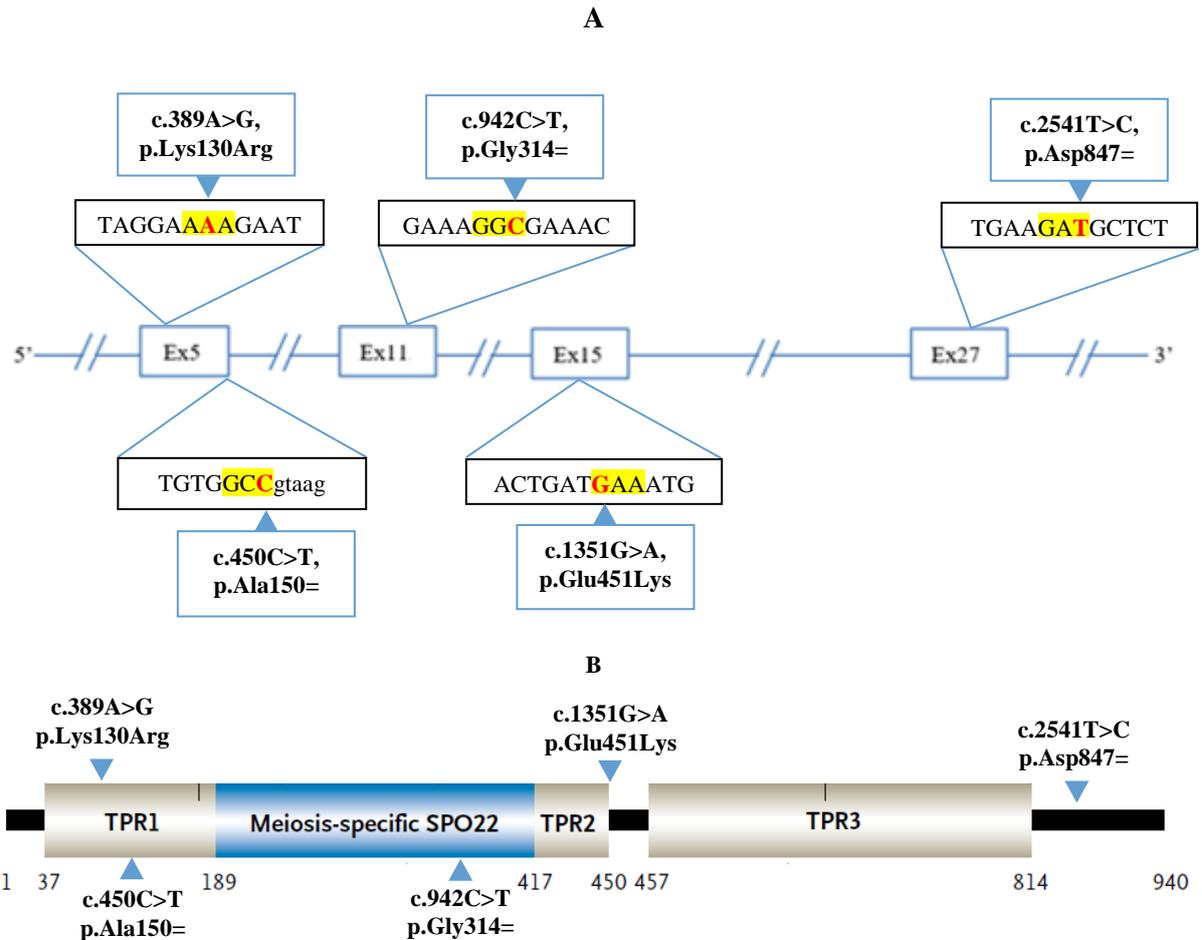


Figura 5.1. – Representação esquemática das alterações provavelmente patogênicas no *TEX11* detetadas em homens com azoospermia. (A) Alterações que potencialmente alteram o *splicing* e sua localização ao nível dos exões no gene *TEX11* (representação parcial do gene pelo que só estão representados os exões nos quais foram encontradas as alterações). As sequências em maiúsculas representam parcialmente o exão e as sequências em minúsculas representam parcialmente o intrão. A sombreado amarelo encontram-se os codões que sofrem a alteração. (B) Alterações que potencialmente alteram o *splicing* e sua localização ao nível da proteína - previsão dos domínios do gene *TEX11* - três regiões de tetratricopéptidos (TPR) (posições de aminoácidos 37-188, 418-450 e 457-814) e o domínio específico da meiose (SPO22) (posições de aminoácidos 189-417). As alterações que afetam o *splicing* estão representadas nos respectivos domínios com triângulos azuis. Adaptado de Yatsenko et al., 2015.

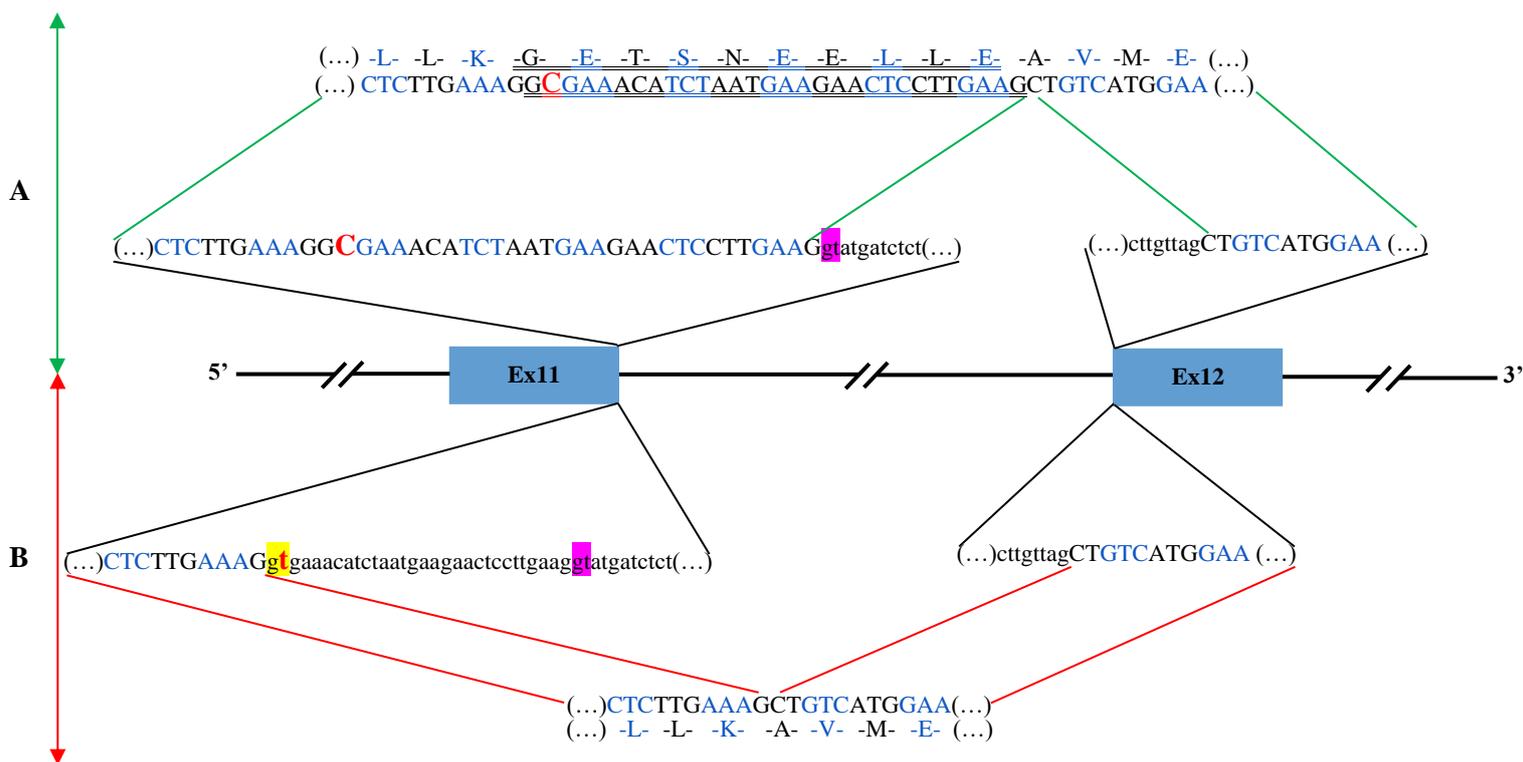


Figura 5.2. – Representação esquemática da possível consequência da alteração c.942C>T a nível do *splicing* e da proteína TEX11. (A) *Splicing* normal entre o exão11_exão12 e respetiva sequência parcial de aminoácidos da proteína. (B) *Splicing* alternativo devido à alteração em estudo que originará um novo sítio dador de *splicing* e respetiva sequência proteica parcial alterada. A sombreado amarelo encontram-se os dois nucleótidos do novo sítio dador de *splicing*, a sombreado rosa encontram-se os dois nucleótidos do sítio dador de *splicing* *wild-type* (c.970) e a vermelho está representado o local da alteração (c.942C>T) na sequência normal e na sequência alterada. As sequências em maiúsculas representam parcialmente o exão e as sequências em minúsculas representam parcialmente o intrão.

CAPÍTULO 6 – CONCLUSÃO E PERSPETIVAS FUTURAS

No que diz respeito aos objetivos definidos no início do presente estudo, podemos concluir que estes foram cumpridos com sucesso tendo sido realizada a otimização das condições experimentais para amplificação de todos os exões do gene *TEX11* individualmente e respetiva sequenciação de Sanger; otimização de PCR múltiplas para os diversos exões do gene *TEX11*; análise dos produtos das PCR múltiplas por NGS; análise *in silico* dos resultados de NGS; validação das variantes/alterações obtidas por NGS utilizando a PCR simples e a sequenciação de Sanger; pesquisa de alterações patogénicas detetadas em homens férteis e por último a interpretação dos resultados e o estabelecimento de correlações genótipo/fenótipo.

Por isso, tendo em conta todos os resultados obtidos no decorrer deste projeto e a discussão de resultados realizada acima, somente as alterações c.450C>T (p.Ala150=) e c.942C>T (p.Gly314=) foram consideradas como potencialmente patogénicas e, por esta razão, temos uma prevalência de alterações no gene *TEX11* de 2,5% (2/80) que está concordante com as frequências dos dois estudos realizados anteriormente (Yang et al., 2015) e (Yatsenko et al., 2015) que foram, respetivamente, de 1,2% (3/246) e 2,4% (7/289).

Futuramente, a realização de estudos complementares poderá comprovar a patogenicidade destas alterações, nomeadamente, estudos *in vitro* ou em modelos animais, a análise da segregação das mesmas em famílias com homens inférteis, estudos de imunohistoquímica em biópsias testiculares, a análise de uma amostra significativa de homens férteis (amostra controlo – normozoospermicos), assim como de um maior número de homens azoospermicos com estudos de histologia testicular.

Importa por último referir que este projeto contribuiu para caracterizar a base molecular da infertilidade masculina ligada ao cromossoma X relativamente ao gene *TEX11* em homens azoospermicos da população portuguesa, de modo que, além de ser inovador, foi a primeira vez que este gene foi estudado na nossa população, por isso pode ter um impacto significativo no desenvolvimento de um novo teste genético a ser disponibilizado para a comunidade.

CAPÍTULO 7 - BIBLIOGRAFIA

Adelman, C. A., & Petrini, J. H. J. (2008). ZIP4H (TEX11) Deficiency in the Mouse Impairs Meiotic Double Strand Break Repair and the Regulation of Crossing Over, *4*(3). <http://doi.org/10.1371/journal.pgen.1000042>

Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K., & Walter, P. (2002). *Molecular Biology of the Cell*. 4th edition. New York: Garland Science; Meiosis. Obtido 20 de Novembro de 2017, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK26840/>

Balasubramanian, R., & Crowley, W. J. (2017). Isolated Gonadotropin-Releasing Hormone (GnRH) Deficiency. Obtido 28 de Junho de 2018, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1334/>

Bansal, S. K., Jaiswal, D., Gupta, N., Singh, K., Dada, R., Sankhwar, S. N., ... Rajender, S. (2016). Gr/gr deletions on Y-chromosome correlate with male infertility: an original study, meta-analyses, and trial sequential analyses. *Nature Publishing Group*, (December 2015), 1–14. <http://doi.org/10.1038/srep19798>

Beckman Coulter. (2016). Agencourt AMPure XP - PCR Purification. Obtido 15 de Fevereiro de 2018, de https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/ajax/downloadDocument/B37419AA.pdf?autonomyId=TP_DOC_150180&documentName=B37419AA.pdf beckman. (2016). agencourt ampure xp - pcr purification protocol

Berg, I. M. Van Den, Laven, J. S. E., Stevens, M., Jonkers, I., Galjaard, R., Gribnau, J., & Van Doorninck, J. H. (2009). X Chromosome Inactivation Is Initiated in Human Preimplantation Embryos. *The American Journal of Human Genetics*, *84*(6), 771–779. <http://doi.org/10.1016/j.ajhg.2009.05.003>

Berget, S. M. (1995). Exon Recognition in Vertebrate Splicing. *The Journal of Biological Chemistry*, *270*(6), 2411–2414. <http://doi.org/10.1074/jbc.270.6.2411>

Bianco, S. D. C., & Kaiser, U. B. (2010). The genetic and molecular basis of idiopathic hypogonadotropic hypogonadism, *5*(10), 569–576. <http://doi.org/10.1038/nrendo.2009.177>.

Chang, S., Skakkebak, A., & Gravholt, C. H. (2015). Klinefelter syndrome and medical treatment: hypogonadism and beyond, *14*(4), 531–548. <http://doi.org/doi:10.14310/horm.2002.1622>

Colaco, S., & Modi, D. (2018). Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility, 1–24. <http://doi.org/https://doi.org/10.1186/s12958-018-0330-5>

Cui, X., Jing, X., Wu, X., Yan, M., Li, Q., Shen, Y. A. N., & Wang, Z. (2016). DNA methylation in spermatogenesis and male infertility, 1973–1979. <http://doi.org/10.3892/etm.2016.3569>

Desmet, F.-O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Bérout, G., Claustres, M., & Bérout, C. (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals, *37*(9), 1–14. <http://doi.org/10.1093/nar/gkp215>

Features of Alamut Visual a Human Variant Interpretation Software. (2018). Obtido 26 de Março de 2018, de <http://www.interactive-biosoftware.com/alamut-visual/features/>

Gottlieb, B., & Trifiro, M. (2017). Androgen Insensitivity Syndrome. Obtido 28 de Junho de 2018, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1429/>

Grinspon, R. P., Gottlieb, S., Bedecarrás, P., & Rey, R. A. (2018). Anti-Müllerian hormone and testicular function in prepubertal boys with cryptorchidism. *Frontiers in Endocrinology*, 9(182), 1–14. <http://doi.org/10.3389/fendo.2018.00182>

Griswold, M. D. (2016). Spermatogenesis: The Commitment to Meiosis. *Physiological Reviews*, 96(1), 1–17. <http://doi.org/10.1152/physrev.00013.2015>

Gunes, S., Arslan, M. A., Hekim, G. N. T., & Asci, R. (2016). The role of epigenetics in idiopathic male infertility. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 33(5), 553–569. <http://doi.org/10.1007/s10815-016-0682-8>

Head, S. R., Komori, H. K., Lamere, S. A., Whisenant, T., Nieuwerburgh, F. Van, Daniel, R., & Ordoukhanian, P. (2014). Library construction for next-generation sequencing: Overviews and challenges. <http://doi.org/10.2144/000114133>

Hillers, K. J., Jantsch, V., Martinez-perez, E., & Yanowitz, J. L. (2005). Meiosis. Obtido 29 de Junho de 2018, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK430708/>

Hughes, I. A., Davies, J. D., Bunch, T. I., Pasterski, V., Mastroyannopoulou, K., & Macdougall, J. (2012). Androgen insensitivity syndrome. *The Lancet*, 380(9851), 1419–1428. [http://doi.org/10.1016/S0140-6736\(12\)60071-3](http://doi.org/10.1016/S0140-6736(12)60071-3)

Huhtaniemi, I., & Alevizaki, M. (2007). Mutations along the hypothalamic – pituitary – gonadal axis affecting male reproduction, *15*(6), 622–632. [http://doi.org/10.1016/S1472-6483\(10\)60529-9](http://doi.org/10.1016/S1472-6483(10)60529-9)

Human Splicing Finder - Version 3.1. (2018). Obtido 30 de Julho de 2018, de <http://www.umd.be/HSF3/>

Hutchison, C. A. (2007). DNA sequencing: bench to bedside and beyond. *Nucleic Acids Research*, 35(18), 6227–6237. <http://doi.org/10.1093/nar/gkm688>

Illumina. (2016). Nextera XT DNA Library Prep Reference Guide. Obtido 15 de Fevereiro de 2018, de https://support.illumina.com/content/dam/illumina-support/documents/documentation/chemistry_documentation/samplepreps_nextera/nexteradna/nextera-dna-library-prep-reference-guide-15027987-01.pdf

José, M., & Faruk, D. (2015). Molecular Pathology of Cryptorchidism-Induced Infertility, 269–278. <http://doi.org/10.1159/000442059>

Krausz, C. (2011). Male infertility: Pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Practice & Research Clinical Endocrinology & Metabolism*, 25(2), 271–285. <http://doi.org/10.1016/j.beem.2010.08.006>

Krausz, C., Hoefsloot, L., Simoni, M., & Tuttelmann, F. (2014). EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013, 5–19. <http://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00173.x>

Kumar, N., & Singh, A. (2015). Trends of male factor infertility, an important cause of infertility: A review of literature. *Journal of Human Reproductive Sciences*, 8(4), 191. <http://doi.org/10.4103/0974-1208.170370>

Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Brown, L. G., Minx, P. J., Cordum, H. S., Waterston, R. H., ... Page, D. C. (2001). The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nature Genetics*, 29(3), 279–286. <http://doi.org/10.1038/ng757>

Lavinha, J., Gonçalves, J., Faustino, P., Romão, L., Osório-Almeida, L., Peres, M. J., ... Krishnamoorthy, R. (1992). Importation route of the sickle cell trait into Portugal: contribution of molecular epidemiology. *Human Biology*, 64(6), 891–901.

Lenormand, T., Engelsta, J., Johnston, S. E., Wijnker, E., & Haag, C. R. (2016). Evolutionary mysteries in meiosis. *The Royal Society*, 371(20160001). <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1098/rstb.2016.0001>

Lodish, H., Berk, A., Lawrence, S. Z., Matsudaira, P., Baltimore, D., & Darnell, J. (2000). *Molecular Cell Biology* (4th ed.). New York. Obtido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21498/>

Loenen, W. A. M., Dryden, D. T. F., Raleigh, E. A., Wilson, G. G., & Murray, N. E. (2014). Highlights of the DNA cutters: A short history of the restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 42(1), 3–19. <http://doi.org/10.1093/nar/gkt990>

Luckey, J. A., Drossman, H., Kostichka, A. J., Mead, D. A., D’Cunha, J., Norris, T. B., & Smith, L. M. (1990). High speed DNA sequencing by capillary electrophoresis. *Nucleic Acids Research*, 18(15), 4417–4421.

Mirtajani, S. B., Farnia, P., Hassanzad, M., Ghanavi, J., Farnia, P., & Velayati, A. A. (2017). Geographical distribution of cystic fibrosis; The past 70 years of data analyzis. *Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)*, 1(2), 105–112. http://doi.org/10.4103/bbrj.bbrj_81_17

Mitchell, M. J., Toure, A., Coutton, C., & Arnoult, C. (2017). Single gene defects leading to sperm quantitative anomalies. *Clinical Genetis*, (91), 208–216. <http://doi.org/10.1111/cge.12900>

Mohini, J., & Deshpande, J. . (2010). POLYMERASE CHAIN REACTION: METHODS , PRINCIPLES AND APPLICATION, 81–97. <http://doi.org/https://doi.org/10.7439/ijbr.v2i1.83>

Navarro-Costa, P., Plancha, C. E., & Gonçalves, J. (2010). Genetic Dissection of the AZF Regions of the Human Y Chromosome : Thriller or Filler for Male (In)fertility? *Journal of Biomedicine and Biotechnology*. <http://doi.org/10.1155/2010/936569>

Nevin, C., & Carroll, M. (2015). Sperm DNA Methylation, Infertility and Sperm DNA

Methylation , Infertility and Transgenerational Epigenetics. *HSOA Journal of Human Genetics & Clinical Embryology*, 1(1), 1–9. <http://doi.org/https://doi.org/10.24966/ggs-2485/100004>

Ng, P. C., & Henikoff, S. (2003). SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3812–3814. <http://doi.org/10.1093/nar/gkg509>

Noveski, P., Popovska-Jankovic, K., Kubelka-Sabit, K., Filipovski, V., Lazarevski, S., Plaseski, T., & Plaseska-Karanfilsk, D. (2016). MicroRNA expression profiles in testicular biopsies of patients with impaired spermatogenesis. *Andrology*, 4, 1020–1027. <http://doi.org/10.1111/andr.12246>

O'Connor, C. (2008). Meiosis, Genetic Recombination, and Sexual Reproduction. Obtido 20 de Março de 2018, de <https://www.nature.com/scitable/topicpage/meiosis-genetic-recombination-and-sexual-reproduction-210>

Ong, T., Marshall, S., & Karczeski, B. (2017). Cystic Fibrosis and Congenital Absence of the Vas Deferens. Obtido 28 de Junho de 2018, de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1250/>

Pingoud, A., Wilson, G. G., & Wende, W. (2014). Type II restriction endonucleases - A historical perspective and more. *Nucleic Acids Research*, 42(12), 7489–7527. <http://doi.org/10.1093/nar/gku447>

Plon, S. E., Eccles, D. M., Easton, D., Foulkes, W. D., Genuardi, M., Greenblatt, M. S., ... Tavtigian, S. V. (2008). Sequence Variant Classification and Reporting: Recommendations for Improving the Interpretation of Cancer Susceptibility Genetic Test Results. *Human Mutation*, 29(11), 1282–1291. <http://doi.org/10.1002/humu.20880>

Prober, J. M., Trainor, G. L., Dam, R. J., Hobbs, F. W., Robertson, C. W., Zagursky, R. J., ... Baumeister, K. (1987). A system for Rapid DNA Sequencing with fluorescent Chain-Terminating Dideoxynucleotides. <http://doi.org/https://doi.org/10.1126/science.2443975>

Ramensky, V., Bork, P., & Sunyaev, S. (2002). Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Research*, 30(17), 3894–3900. <http://doi.org/10.1093/nar/gkf493>

Repping, S., Daalen, S. K. M. Van, Korver, C. M., Brown, L. G., Marszalek, J. D., Gianotten, J., ... Rozen, S. (2004). A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region, 83, 1046–1052. <http://doi.org/10.1016/j.ygeno.2003.12.018>

Repping, S., Skaletsky, H., Brown, L., Van Daalen, S. K. M., Korver, C. M., Pyntikova, T., ... Rozen, S. (2003). Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nature Genetics*, 35(3), 247–251. <http://doi.org/10.1038/ng1250>

Robberson, B. L., Cote, G. J., & Berget, S. M. (1990). Exon Definition May Facilitate Splice Site Selection in RNAs with Multiple Exons, 10(1), 84–94. <http://doi.org/10.1128/MCB.10.1.84>

Roche Diagnostics GmbH. (2008). MagNA Pure LC 2.0 Instrument Operator's Manual. Obtido de 15 de Fevereiro de 2018, de

http://www.diagnostics1.com/MANUAL/MagNAPureLC_OP_final_lowRes_080623.pdf

Schinas, J., Bacani, J., Kelsey, M., Ferreira, P., Macgillivray, B., Macleod, P., ... Huntsman, D. (2004). Germline E-cadherin mutations in hereditary diffuse gastric cancer: assessment of 42 new families and review of genetic screening criteria, *J Med Gene*(41), 508–517. <http://doi.org/10.1136/jmg.2004.018275>

Schlatt, S., & Ehmcke, J. (2014). Seminars in Cell & Developmental Biology Regulation of spermatogenesis: An evolutionary biologist's perspective. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 29, 2–16. <http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.03.007>

Smith, L. B., & Walker, W. H. (2014). The Regulation of Spermatogenesis by Androgens. *Semin Cell Dev Biol.*, 2–13. <http://doi.org/10.1016/j.semcdb.2014.02.012>.The

Song, S. H., Chiba, K., Ramasamy, R., & Lamb, D. J. (2016). Recent advances in the genetics of testicular failure, (December 2015), 350–355. <http://doi.org/10.4103/1008-682X.178857>

Stouffs, K., Gheldof, A., Tournaye, H., Vandermaelen, D., Bonduelle, M., Lissens, W., & Seneca, S. (2016). Sertoli Cell-Only Syndrome: Behind the Genetic Scenes, 2016. <http://doi.org/10.1155/2016/6191307>

Stukenborg, J.-B., Kjartansdóttir, K. R., Reda, A., Colon, E., Albersmeier, J. P., & Söder, O. (2014). Male Germ Cell Development in Humans. *Hormone Research in Paediatrics*, 81(1), 2–12. <http://doi.org/10.1159/000355599>

Swerdlow, H., & Gesteland, R. (1990). Capillary gel electrophoresis for rapid, high resolution DNA sequencing. *Nucleic Acids Research*, 18(6), 1415–1419.

Talerico, M., & Berget, S. M. (1994). Intron Definition in Splicing of Small Drosophila Introns, 14(5), 3434–3445. <http://doi.org/10.1128/MCB.14.5.3434>

Tang, L., Zeng, W., Clark, R. K., & Dobrinski, I. (2011). Characterization of the porcine testis-expressed gene 11 (Tex11), 11(June), 147–151. <http://doi.org/10.4161/spmg.1.2.16680>

Thorvaldsdóttir, H., Robinson, J. T., & Mesirov, J. P. (2012). Integrative Genomics Viewer (IGV): high-performance genomics data visualization and exploration. *Oxford University Press*, 14(2), 178–192. <http://doi.org/10.1093/bib/bbs017>

Tüttelmann, F., Krallmann, C., Stratis, Y., Hoffmann, M., Hankamp, L., Burkhardt, S., ... Röpke, A. (2018). P01.39C / C - Extended genetic analyses in infertile men with non-obstructive azoospermia. *52nd European Human Genetics Conference - Milão*.

Vincze, T., Posfai, J., & Roberts, R. J. (2003). NEBcutter: A program to cleave DNA with restriction enzymes. *Nucleic Acids Research*, 31(13), 3688–3691. <http://doi.org/10.1093/nar/gkg526>

Vogt, P. H. (2004). Genomic heterogeneity and instability of the AZF locus on the human Y chromosome. *Molecular and Cellular Endocrinology*, 224, 1–9. <http://doi.org/10.1016/j.mce.2004.06.008>

Vogt, P. H., Edelmann, A., Kirsch, S., Henegariu, O., Hirschmann, P., Kiesewetter, F., ... Haidl, G. (1996). Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Human Molecular Genetics*, 5(7), 933–943. <http://doi.org/10.1093/hmg/5.7.933>

Wang, G., & Cooper, T. A. (2007). Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nature Reviews Genetics*, 8, 749–761. <http://doi.org/10.1038/nrg2164>

Wang, Z., & Burge, C. B. (2008). Splicing regulation: From a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA*, 14, 802–813. <http://doi.org/10.1261/rna.876308.802>

Web Books Publishing. (2017). Molecular Biology Web Book - RNA splicing. Obtido 17 de Agosto de 2018, de <http://www.web-books.com/MoBio/Free/Ch5A4.htm>

WHO. (2010). WHO laboratory manual for the Examination and processing of human semen. Obtido 15 de Fevereiro de 2018, de http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/44261/9789241547789_eng.pdf;jsessionid=7C394D38E0D68A712EEE25CBE88542A8?sequence=1

Xiao, X., Mruk, D. D., Wong, C. K. C., & Yan Cheng, C. (2014). Germ Cell Transport Across the Seminiferous Epithelium During Spermatogenesis. *Physiology*, 29(4), 286–298. <http://doi.org/10.1152/physiol.00001.2014>

Yang, F., Gell, K., Heijden, G. W. Van Der, Eckardt, S., Leu, N. A., Page, D. C., ... Wang, P. J. (2008). Meiotic failure in male mice lacking an X-linked factor Meiotic failure in male mice lacking an X-linked factor, 682–691. <http://doi.org/10.1101/gad.1613608>

Yang, F., Silber, S., Leu, N. A., Oates, R. D., Marszalek, J. D., Skaletsky, H., ... Wang, P. J. (2015). TEX 11 is mutated in infertile men with azoospermia and regulates genome-wide recombination rates in mouse, 7(9). <http://doi.org/https://doi.org/10.15252/emmm.201404967>

Yatsenko, A. N., Georgiadis, A. P., Röpke, A., Berman, A. J., Jaffe, T., Olszewska, M., ... Tüttelmann, F. (2015). Mutations, Meiotic Arrest, and Azoospermia in Infertile Men, 2097–2107. <http://doi.org/10.1056/NEJMoa1406192>

CAPÍTULO 8 - ANEXOS

Tabela 8.1. – Iniciadores usados no contexto do trabalho experimental. Os iniciadores *forward* têm uma cauda 21M13F e os iniciadores *reverse* têm uma cauda M13R (as respectivas sequências das caudas encontram-se na tabela abaixo) (Schinas et al., 2004). Concentração inicial (C.I.), Tamanho do fragmento esperado (pb) e sequência 5'-3' dos Iniciadores: F - *Forward* e R - *Reverse* dos 29 exões de *TEX11*.

Exão	C.I.F.	F	C.I.R.	R	pb
1	428,4ng/ μ L	5'-atggagtctgtctctgttcc-3'	597,2ng/ μ L	5'-gctgcttcgaactcctga-3'	245
2	514,0ng/ μ L	5'-catttgccaatgatttagaca-3'	573,0ng/ μ L	5'-cgatgattctcattttaaccaa-3'	314
3	304,2ng/ μ L	5'-tgaaaataccgttgagggtg-3'	625,2ng/ μ L	5'-caaccagggaacaatggtt-3'	329
4	463,2ng/ μ L	5'-cctcaattgtctttctttgg-3'	593,2ng/ μ L	5'-ttgatggttctctttcagt-3'	336
5-6	240,4ng/ μ L	5'-tgttcttttctttctga-3'	660,6ng/ μ L	5'-tcagatgactgctttt-3'	571
7	523,2ng/ μ L	5'-gacaaataacctgtcatttaacc-3'	709,0ng/ μ L	5'-cttcagcaacctttggag-3'	260
8	518,0ng/ μ L	5'-aattgagaagtttgataaggaagc-3'	554,2ng/ μ L	5'-tgttctcctcctcctca-3'	536
9	631,3ng/ μ L	5'-tctcctaaggaaattgtttctaca-3'	372,2ng/ μ L	5'-agattagctattggcacaaca-3'	423
10	364,0ng/ μ L	5'-gccaggaatatagccattactgt-3'	432,0ng/ μ L	5'-ctgaatgtttgtccccc-3'	530
11	396,0ng/ μ L	5'-ggaaatcctcaggatagaac-3'	524,8ng/ μ L	5'-gatggtgctgagaagaa-3'	404
12	520,0ng/ μ L	5'-tttgaaggattgcaccaga-3'	218,2ng/ μ L	5'-gagcttgagaccaaccttg-3'	485
13	537,8ng/ μ L	5'-tggctattttgctcacactg-3'	586,0ng/ μ L	5'-caatgatttcttccactcc-3'	391
14	625,6ng/ μ L	5'-gggagaggagacaatagacc-3'	665,0ng/ μ L	5'-taggaaatgtcatcgctga-3'	419
15	524,2ng/ μ L	5'-ggaaagatagggtagcgacatc-3'	535,0ng/ μ L	5'-gttcttatgtcagtgccagag-3'	386
16	520,4ng/ μ L	5'-atcccagccatttggact-3'	337,2ng/ μ L	5'-tctcaaccagctggaaa-3'	313
17	530,8ng/ μ L	5'-gttggcattttctgtg-3'	638,2ng/ μ L	5'-cttggtgcagaactcctt-3'	496
18	255,2ng/ μ L	5'-gcaaatgtcctgtttt-3'	330,4ng/ μ L	5'-cgaagcagaggaggtga-3'	436
19	514,2ng/ μ L	5'-ccctcccagagtaacaagt-3'	771,6ng/ μ L	5'-tctcctgggtcatatcct-3'	336
20	433,4ng/ μ L	5'-gcatttcttagtcaattctcagg-3'	397,2ng/ μ L	5'-attctcaagtactaacacagcaa-3'	264
21	346,8ng/ μ L	5'-agcaggattaacaatttctaga-3'	350,4ng/ μ L	5'-tggatcttcattgtagctgtg-3'	286
22	425,2ng/ μ L	5'-aaccttgagaaacccttact-3'	489,8ng/ μ L	5'-gaatgtgggcatactttct-3'	430
23	461,2ng/ μ L	5'-tctcattcaaacaggaattgc-3'	403,2ng/ μ L	5'-gcctccctgatgcagtctt-3'	329
24	477,4ng/ μ L	5'-tgaacagtaaggaaatgtgcaa-3'	766,6ng/ μ L	5'-caccagaaattgtgccac-3'	390
25	466,6ng/ μ L	5'-tgtctacagcagtgaagatgacc-3'	541,2ng/ μ L	5'-tgttctccttctaatgcca-3'	473
26	594,2ng/ μ L	5'-atgctactctgccagaaagt-3'	620,2ng/ μ L	5'-gcattctgtgaacagctcc-3'	477
27	360,0ng/ μ L	5'-ccagataaaaccagggaag-3'	313,0ng/ μ L	5'-gcagtaccaccagcatttt-3'	535
28	280,0ng/ μ L	5'-gctgacaaacctcaagtgc-3'	362,8ng/ μ L	5'-gaaggacagagaacagggg-3'	586
29	372,8ng/ μ L	5'-gggaagcttcccacattt-3'	573,6ng/ μ L	5'-tgtcccagatgctgactgt-3'	241
M13	100,0pmol/ μ L	5'-tgtaaaacgacggcag-3'	100,0pmol/ μ L	5'-caggaacagctatgac-3'	36

Tabela 8.2. – Informações sobre os reagentes.

Reagente	Marca	Validade	Lote	Concentração
Seakem® LE	Lonza	01/18	0000352867	-
Nusieve® 3:1	Lonza	11/15	0000428596	-
100bp	BIORON	02/17	BI350/14-7	0,2mg/mL
Set 4dNTPs	BIORON	09/17	BI283	100mM/cada

Tabela 8.3. – Constituição dos tampões de PCR utilizados no decorrer do trabalho experimental.

Tampão	Constituição	Marca
AB	100mM Tris-HCl (pH 8,3 a 20°C) + 500 mM KCl	Applied Biosystems
Paris	0,670M TrisHCl (pH 8,8 a 20°C) + 0,067M MgCl ₂ + 0,166M (NH ₄) ₂ SO ₄	-

Tabela 8.4. – Constituição dos tampões de restrição enzimática utilizados no decorrer do trabalho experimental.

Tampão	Constituição	Marca
Buffer C	10mM TrisHCl (pH 7,9°C a 37°C) + 10mM MgCl ₂ + 50mM NaCl	Promega
NEB4	50mM Acetato de Potássio + 20mM Tris-acetato + 10mM Acetato de Magnésio + 1mM DTT (pH 7,9 a 25°C)	New England Biolabs
M	100mM TrisHCl (pH 7,5 a 25°C) + 100mM MgCl ₂ + 10mM Dithiothreitol + 1000mM NaCl	Amersham

Tabela 8.5. – Coberturas médias por exão. O cálculo da cobertura média é feito da seguinte forma: $Cobertura\ Média = (N^{\circ}\ de\ leituras\ identificadas \times 250) / Tamanho\ da\ sequência\ amplificada\ para\ todos\ os\ exões\ c/ iniciadores^*$.

*Tamanho da sequência amplificada para todos os exões c/ iniciadores = 10113

^(a)Controlo masculino (normozoospermico); ^(b)Controlo feminino.

Amostra	Nº Leituras Identificadas	Cobertura Média/Exão
INO1 ^(a)	12840	317
INO2 ^(b)	25718	636
INO3	5134	127
INO4	8214	203
INO5	31934	789
INO6	24624	609
INO7	19744	488
INO8 ^(a)	29188	722
INO9	8854	219
INO10	18194	450
INO11	9590	237
INO12	20398	504
INO13	29770	736
INO14	8520	211
INO15	11576	286
INO16	8282	205

INO17	5446	135
INO18	13634	337
INO19	9950	246
INO20	24064	595
INO21	16528	409
INO22	5978	148
INO23	21042	520
INO24	16898	418
INO25	6798	168
INO26	13898	344
INO27	25886	640
INO28	19326	478
INO29	43684	1080
INO30	38154	943
INO31	31436	777
INO32	38248	946
INO33	24844	614
INO34	20806	514
INO35	5004	124
INO36	7950	197
INO37	8644	214
INO38	14744	364
INO39	8052	199
INO40	12294	304
INO41	10298	255
INO42	13062	323
INO43	8894	220
INO44	12124	300
INO46	13500	334
INO47	17606	435
INO48	19312	477
INO49	13170	326
INO50	31788	786
INO51	9380	232
INO52	10052	248
INO55	15682	388
INO56	19560	484
INO57	9418	233
INO58	9828	243
INO59	8836	218

INO60	14056	347
INO61	21310	527
INO62	17186	425
INO63	15966	395
INO64	20296	502
INO65	7752	192
INO66	11806	292
INO67	10072	249
INO68	7288	180
INO69	3504	87
INO70	9934	246
INO71	11012	272
INO72	19348	478
INO73	19828	490
INO74	6638	164
INO75	6868	170
INO76	8694	215
INO77	19830	490
INO78	13638	337
INO79	25230	624
INO80	30942	765
INO81	7598	188
INO83	37054	916
INO84	6790	168
INO85	12062	298
INO86	14880	368
INO87	12006	297

Tabela 8.6. – Alterações detetadas e respetivo total de amostras e frequência por alteração.

^(a)Presente em todas as amostras exceto INO28, INO33, INO39, INO41, INO48, INO57 e INO77; ^(b) Frequência relativa aos alelos analisados nas amostras+controles; ^(c)Presente em todas as amostras; ^(d)Controlo masculino (normozoospermico); ^(e)Controlo feminino; ^(f)Falso positivo.

Alteração (HGVS)		Amostras+Controles	Total de Amostras+Controles (Frequência) ^(b)
cDNA	Proteína		
c.2730+188C>A	-	INO21	1 (0,012)
c.2730+137A>G	-	INO41	1 (0,012)
c.2566-3T>C	-	^(a)	72 (0,857)
c.2566-4A>T	-	^(a)	72 (0,857)
c.2566-47T>A	-	INO7	1 (0,012)

c.2565+58T>C	-	INO14	3 (0,036)
		INO23	
		INO71	
c.2541T>C	p.Asp847=	INO38	2 (0,024)
		INO61	
c.2336-58G>A	-	INO14	1 (0,012)
c.2319T>A	p.Thr773=	(c)	84 (1,000)
c.2112+39G>T	-	INO77	1 (0,012)
c.1995+124G>A	-	INO1 ^(d)	12 (0,143)
		INO4	
		INO16	
		INO17	
		INO19	
		INO22	
		INO28	
		INO30	
		INO43	
		INO46	
		INO71	
INO80			
c.1925-37A>G	-	INO75	1 (0,012)
c.1654-23C>T	-	INO2 ^(e)	44 (0,523)
		INO5	
		INO6	
		INO7	
		INO8 ^(c)	
		INO10	
		INO11	
		INO13	
		INO14	
		INO21	
		INO23	
		INO24	
		INO25	
		INO26	
		INO27	
INO28			
INO29			
INO31			
INO32			

		INO34	
		INO35	
		INO36	
		INO37	
		INO38	
		INO40	
		INO47	
		INO49	
		INO50	
		INO55	
		INO57	
		INO58	
		INO59	
		INO61	
		INO62	
		INO64	
		INO67	
		INO68	
		INO72	
		INO73	
		INO74	
		INO75	
		INO76	
		INO79	
		INO85	
c.1654-25A>G	-	INO2 ^(e)	18 (0,214)
		INO3	
		INO12	
		INO15	
		INO18	
		INO20	
		INO41	
		INO42	
		INO44	
		INO51	
		INO63	
		INO65	
		INO66	
		INO70	
		INO83	

		INO84	
		INO86	
		INO87	
c.1351G>A	p.Glu451Lys	INO38	2 (0,024)
		INO61	
c.971-73G>A	-	INO31	1 (0,012)
c.942C>T	p.Gly314=	INO52	1 (0,012)
c.889-27T>C	-	INO33	4 (0,048)
		INO39	
		INO48	
		INO77	
c.738-16dupT	-	INO1 ^(d)	43 (0,512)
		INO2 ^(e)	
		INO4	
		INO5	
		INO6	
		INO7	
		INO8 ^(e)	
		INO9	
		INO13	
		INO14	
		INO16	
		INO19	
		INO22	
		INO23	
		INO24	
		INO25	
		INO26	
		INO28	
		INO30	
		INO31	
		INO33	
INO34			
INO35			
INO40			
INO47			
INO48			
INO49			
INO50			
INO52			

		INO55	
		INO57	
		INO58	
		INO59	
		INO61	
		INO62	
		INO64	
		INO67	
		INO68	
		INO69	
		INO72	
		INO73	
		INO74	
		INO85	
c.652-170T>C	-	INO72	1 (0,012)
c.571-26T>C	-	INO1 ^(d)	8 (0,095)
		INO4	
		INO9	
		INO17	
		INO19	
		INO22	
		INO43	
		INO46	
		INO80	
c.450C>T	p.Ala150=	INO67	1 (0,012)
c.389A>G	p.Lys130Arg	INO14	6 (0,071)
		INO23	
		INO26	
		INO28	
		INO56	
		INO67	
		INO77	
c.290-22T>C	-	INO14	1 (0,012)
c.289+35G>A	-	INO2 ^(e)	35 (0,417)
		INO6	
		INO7	
		INO8 ^(d)	
		INO10	
		INO11	
		INO13	

		INO21	
		INO24	
		INO25	
		INO27	
		INO31	
		INO32	
		INO34	
		INO36	
		INO37	
		INO40	
		INO47	
		INO49	
		INO50	
		INO55	
		INO57	
		INO58	
		INO59	
		INO64	
		INO68	
		INO72	
		INO73	
		INO74	
		INO75	
		INO76	
		INO79	
		INO83	
		INO85	
		INO87	
c.204+30A>G	-	INO57	1 (0,012)
c.82+60A>G^(e)	-	INO83	1 (0,012)

Tabela 8.7. - Amostras e respetivas alterações e localização das mesmas no gene *TEX11*.

ID (Obs.)-Observações sobre a alteração, REF-Alelo de referência; ALT-Alelo alterado.

^(a)Controlo masculino (normozoospermico); ^(b)Controlo feminino

AMOSTRA	ID (Obs.)	REF	ALT	Alteração (HGVS)		Exão/Intrão
				cDNA	Proteína	
INO1 ^(a)	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25

	rs12014919	C	T	c.1995+124G>A	-	IVS22
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs17301944	T	C	c.571-26T>C	-	IVS6
INO2 ^(b)	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	G	A	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5980983	T	C	c.1654-25A>G	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	C	T	c.289+35G>A	-	IVS3
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
INO3	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs5980983	T	C	c.1654-25A>G	-	IVS17
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
INO4	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs12014919	C	T	c.1995+124G>A	-	IVS22
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs17301944	A	G	c.571-26T>C	-	IVS6
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	T	A	c.2566-4A>T	-	IVS27
INO5	rs1325094	G	A	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
INO6	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	G	A	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	C	T	c.289+35G>A	-	IVS3
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
INO7	rs763757854	T	A	c.2566-47T>A	-	IVS27
	rs4844240	A	T	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	G	A	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	C	T	c.289+35G>A	-	IVS3
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
INO8 ^(a)	rs1325094	G	A	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	C	T	c.289+35G>A	-	IVS3
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25

INO9	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs17301944	A	G	c.571-26T>C	-	IVS6
INO10	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	G	A	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5937008	C	T	c.289+35G>A	-	IVS3
INO11	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	T	A	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	A	T	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	T	A	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5937008	C	T	c.289+35G>A	-	IVS3
INO12	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs5980983	T	C	c.1654-25A>G	-	IVS17
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO13	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	G	A	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	C	T	c.289+35G>A	-	IVS3
INO14	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs41303711	A	G	c.2565+58T>C	-	IVS27
	rs12690066	C	T	c.2336-58G>A	-	IVS25
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	G	A	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	Não descrita	TA	T	c.738-24delA	-	IVS8
	rs6525433	T	C	c.389A>G	p.Lys130Arg	Ex.5
	Não descrita	A	G	c.290-22T>C	-	IVS3
INO15	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs5980983	T	C	c.1654-25A>G	-	IVS17
INO16	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs12014919	C	T	c.1995+124G>A	-	IVS22
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8

INO17	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs12014919	C	T	c.1995+124G>A	-	IVS22
INO18	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs5980983	T	C	c.1654-25A>G	-	IVS17
INO19	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs12014919	C	T	c.1995+124G>A	-	IVS22
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs17301944	A	G	c.571-26T>C	-	IVS6
INO20	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs5980983	T	C	c.1654-25A>G	-	IVS17
INO21	Não descrita	G	T	c.2730+188C>A	-	IVS28
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	G	A	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5937008	C	T	c.289+35G>A	-	IVS3
INO22	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs12014919	C	T	c.1995+124G>A	-	IVS22
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs17301944	A	G	c.571-26T>C	-	IVS6
INO23	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs41303711	A	G	c.2565+58T>C	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	G	A	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs6525433	T	C	c.389A>G	p.Lys130Arg	Ex5
INO24	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	G	A	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	C	T	c.289+35G>A	-	IVS3
INO25	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27

	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	G	A	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	C	T	c.289+35G>A	-	IVS3
INO26	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	G	A	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs6525433	T	C	c.389A>G	p.Lys130Arg	Ex5
INO27	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	G	A	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5937008	C	T	c.289+35G>A	-	IVS3
INO28	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs12014919	C	T	c.1995+124G>A	-	IVS22
	rs1325094	G	A	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs6525433	T	C	c.389A>G	p.Lys130Arg	Ex5
INO29	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
INO30	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs12014919	G	A	c.1995+124G>A	-	IVS22
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
INO31	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs188603291	G	A	c.971-73G>A	-	IVS11
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
INO32	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
INO33	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs6653304	T	C	c.889-27T>C	-	IVS10
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8

INO34	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
INO35	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
INO36	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
INO37	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
INO38	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs16991177	T	C	c.2541T>C	p.Asp847=	Ex.27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs4844247	G	A	c.1351G>A	p.Glu451Lys	Ex.15
INO39	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs6653304	T	C	c.889-27T>C	-	IVS10
INO40	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
INO41	rs12010019	A	G	c.2730+137A>G	-	IVS28
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs5980983	A	G	c.1654-25A>G	-	IVS17
INO42	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs5980983	A	G	c.1654-25A>G	-	IVS17
INO43	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25

	rs12014919	C	T	c.1995+124G>A	-	IVS22
	rs17301944	T	C	c.571-26T>C	-	IVS6
INO44	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs5980983	A	G	c.1654-25A>G	-	IVS17
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO46	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs12014919	C	T	c.1995+124G>A	-	IVS22
	rs17301944	T	C	c.571-26T>C	-	IVS6
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO47	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
INO48	rs6653304	T	C	c.889-27T>C	-	IVS10
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO49	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO50	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO51	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs5980983	A	G	c.1654-25A>G	-	IVS17
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO52	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs139872637	C	T	c.942C>T	p.Gly314=	Ex.11
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO55	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25

	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
INO56	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
INO57	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
	Não descrita	A	G	c.204+30A>G	-	IVS2
INO58	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
INO59	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
INO60	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
INO61	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs16991177	T	C	c.2541T>C	p.Asp847=	Ex.27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs4844247	G	A	c.1351G>A	p.Glu451Lys	Ex.15
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
INO62	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
INO63	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs5980983	A	G	c.1654-25A>G	-	IVS17
INO64	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25

	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
INO65	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs5980983	A	G	c.1654-25A>G	-	IVS17
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO66	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs5980983	A	G	c.1654-25A>G	-	IVS17
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO67	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	Não descrita	C	T	c.450C>T	p.Ala150=	Ex5-6
	rs6525433	A	G	c.389A>G	p.Lys130Arg	Ex.5-6
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO68	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO69	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO70	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs5980983	A	G	c.1654-25A>G	-	IVS17
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO71	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs41303711	T	C	c.2565+58T>C	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs12014919	C	T	c.1995+124G>A	-	IVS22
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO72	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	Não descrita	T	C	c.652-170T>C	-	IVS7
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27

INO73	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
INO74	rs1536250	A	G	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	T	A	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	A	T	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	G	A	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	C	T	c.289+35G>A	-	IVS3
INO75	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	Não descrita	A	G	c.1925-37A>G	-	IVS21
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
INO76	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
INO77	Não descrita	G	T	c.2112+39G>T	-	IVS23
	rs6653304	T	C	c.889-27T>C	-	IVS10
	rs6525433	A	G	c.389A>G	p.Lys130Arg	Ex.5-6
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO78	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO79	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO80	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs12014919	C	T	c.1995+124G>A	-	IVS22
	rs17301944	T	C	c.571-26T>C	-	IVS6
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO81	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO83	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27

	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs5980983	A	G	c.1654-25A>G	-	IVS17
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
INO84	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs5980983	A	G	c.1654-25A>G	-	IVS17
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO85	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs1325094	C	T	c.1654-23C>T	-	IVS17
	rs5902674	TC	TTC	c.738-16dupT	-	IVS8
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO86	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs5980983	A	G	c.1654-25A>G	-	IVS17
	rs1536250	T	C	c.2566-3T>C	-	IVS27
INO87	rs1536251	A	T	c.2566-4A>T	-	IVS27
	rs4844240	T	A	c.2319T>A	p.Thr773=	Ex.25
	rs5980983	A	G	c.1654-25A>G	-	IVS17
	rs5937008	G	A	c.289+35G>A	-	IVS3