

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS
TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO



BEATRIZ PARREIRA SANTOS

**ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DA COVID-19 COM O NÚMERO DE CÓPIAS
DO GENE *TSPY***

**Ribeirão Preto
2022**

BEATRIZ PARREIRA SANTOS

**ANÁLISE DE ASSOCIAÇÃO DA COVID-19 COM O NÚMERO DE CÓPIAS
DO GENE *TSPY***

Trabalho de Conclusão de Curso
apresentado ao Curso de Ciências
Biomédicas da Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto da Universidade de São
Paulo como requisito parcial para a
obtenção do título de Bacharel em Ciências
Biomédicas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Ester Silveira
Ramos

Coorientadores: Prof^a Dra. Rosana Maria
dos Reis e Prof. Dr. Murilo Racy Soares

RIBEIRÃO PRETO

2022

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

"A inclusão deste trabalho na Biblioteca Digital foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Curso em sua 63ª Sessão Ordinária, realizada em 31/10/2022"

FICHA CATALOGRÁFICA

Santos, Beatriz Parreira

Análise de associação da COVID-19 com o número de cópias do gene *TSPY*

80p. il.;

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) - Universidade de São Paulo (USP), Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP), Curso de Ciências Biomédicas, 2022

Orientadora: Professora Dra. Ester Silveira Ramos
Coorientadores: Profª Dra. Rosana Maria dos Reis e Prof. Dr. Murilo Racy Soares

1. *Testis-specific protein Y-encoded*; 2. *CNV*; 3. COVID-19; 4. Cromossomo Y;

RESUMO

SANTOS, B.P. **Análise de associação da COVID-19 com o número de cópias do gene *TSPY***. 2022. 80p. Trabalho de conclusão de curso (Graduação) - Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2022.

A pandemia de *Corona virus disease* 2019 (COVID-19) já infectou milhões de pessoas, sendo os homens os mais afetados. Infecções virais, como na COVID-19, podem afetar os gametas masculinos. O *Testis-Specific Protein Y-encoded* (*TSPY*) é um gene específico do cromossomo Y e possui múltiplas cópias (aproximadamente 35 em humanos). De acordo com a literatura, embora ainda haja muita controvérsia, o número de cópias pode variar em casos específicos, como no envelhecimento e na infertilidade. Esse gene está envolvido com a regulação da meiose e divisão meiótica de espermatogônias e espermátócitos primários. O objetivo principal deste trabalho foi o de verificar a existência de associação entre o número de cópias do gene *TSPY* e a ocorrência de COVID-19 em homens adultos. Foram coletadas amostras de sangue periférico de 15 homens diagnosticados com COVID-19 há mais de 90 dias e 15 homens sem sintomas, sinais e/ou exames laboratoriais sugestivos de COVID-19, com idade entre 18 e 55 anos. O DNA extraído foi analisado por meio de *PCR* quantitativa com a utilização de sequências dos genes *TSPY*, Y-específico de cópia única *Sex-determining Region Y* (*SRY*) e o autossômico *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase* (*GAPDH*), os dois últimos como genes referência. A análise estatística indicou que o grupo COVID tende a ter o número relativo de cópias do gene *TSPY* um pouco maior que o grupo controle, porém sem diferença estatística significativa ($p=0,2137$), provavelmente devido ao número relativamente reduzido de pacientes analisados. A tendência a

um maior número de cópias no grupo com COVID-19 poderia apontar para uma maior instabilidade genômica devido à infecção viral, ou um efeito protetor do menor número de cópias do *TSPY*. Por outro lado, o período considerado, maior que 90 dias da ocorrência da COVID-19, poderia apontar que não houve um efeito, pelo menos a longo prazo, da infecção. Este é o primeiro estudo da literatura a analisar a existência de associação do número de cópias do gene *TSPY* com a COVID-19.

Palavras-chave: *Testis-specific protein Y-encoded. CNV.* COVID-19. Cromossomo Y.

ABSTRACT

SANTOS, B.P. **Analysis of the association of COVID-19 with the number of copies of the *TSPY* gene**. 2022. 80p. Undergraduate thesis – Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, São Paulo, 2022.

The Corona virus disease 2019 (COVID-19) pandemic has already infected millions of people, with men being the most affected. Viral infections, such as COVID-19, can affect male gametes. Testis-Specific Protein Y-encoded (*TSPY*) is a Y-chromosome-specific gene and has multiple copies (approximately 35 in humans). According to the literature, although there is still much controversy, the number of copies may vary in specific cases, such as aging and infertility. This gene is involved with the regulation of meiosis and meiotic division of spermatogonia and primary spermatocytes. The main objective of this study was to verify the existence of an association between the number of copies of the *TSPY* gene and the occurrence of COVID-19 in adult men. Peripheral blood samples were collected from 15 men diagnosed with COVID-19 for more than 90 days and 15 men without symptoms, signs and/or laboratory tests suggestive of COVID-19, aged between 18 and 55 years. The extracted DNA was analyzed by means of quantitative PCR using sequences from the genes *TSPY*, Y-specific single copy Sex-determining Region Y (*SRY*) and the autosomal Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (*GAPDH*), the last two as reference genes. Statistical analysis indicated that the COVID group tends to have the relative number of copies of the *TSPY* gene slightly higher than the control group, but without statistically significant difference ($p=0.2137$), probably due to the relatively small number of patients analyzed. The trend towards higher copy number in the COVID-19 group could point to greater genomic instability due to viral

infection, or a protective effect of lower *TSPY* copy number. On the other hand, the period considered, greater than 90 days of the occurrence of COVID-19, could indicate that there was no effect, at least in the long term, of the infection. This is the first study in the literature to analyze the existence of an association between the number of copies of the *TSPY* gene and COVID-19.

Keywords: Testis-specific protein Y-encoded. CNV. COVID-19. Y Chromosome .

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 - A) Idiograma do cromossomo Y contendo as regiões pseudoautossômicas (<i>PAR 1</i> e <i>PAR2</i>) e a Região Macho Específica. B) Idiograma do cromossomo Y com a localização do gene <i>SRY</i> e <i>TSPY</i>	13
Figura 2 - Mecanismo de entrada do SARS-COV-2 na célula via receptor da enzima ACE2.....	18
Figura 3 - Curvas de dissociação dos genes <i>TSPY</i> , <i>SRY</i> e <i>GAPDH</i>	27
Figura 4 - Gráficos mostrando as curvas de amplificação para as sequências dos genes: (A) <i>TSPY</i> . (B) <i>SRY</i> . (C) Curva de amplificação do gene <i>GAPDH</i> . (D) Curvas de amplificação dos três genes em conjunto para comparação.....	29
Figura 5 - Média do número de cópias do gene <i>TSPY</i> nos grupos COVID e NÃO COVID.....	31
Figura 6 - Box plot análise número de cópias do gene <i>TSPY</i> nos grupos COVID e NÃO COVID.....	32

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Genes e sequências utilizadas no trabalho.....28

Tabela 2 - Análise das do número de cópias do gene *TSPY* nos grupos COVID e não COVID.....30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACE2 - Enzima conversora da angiotensina 2

AMELY - Amelogenin Y-Linked

AZF - Fator de azoospermia

CNVs - Variações no número de cópias

COVID-19 - *Coronavirus disease* 2019

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

EDTA - ácido etilenodiamino tetra-acético

FIV - Fertilização *in Vitro*

GAPDH - Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase

GU - Trauma geniturinário

Kb - Kilo base

mRNA - RNA mensageiro

MSY - Male specific region

NAHR - Recombinação homóloga não alélica

NOA - Non-obstructive azoospermia

PARs - Pseudoautosomal regions

PCR - Polymerase Chain Reaction

pg - Picogramas

qPCR- Quantitative real time PCR

RBD - Receptor-binding domain

S - Proteína S

SARS-COV-2 - coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave

SRY- Sex-determining Region Y

TMPRSS2 - Protease transmembrana serina 2

TSPY- Testis-specific protein Y-encoded

TSPY1 -Testis-specific protein Y-encoded 1

XCI - X Chromosome Inactivation Center)

XIC - X chromosome inactivation

Yp - Braço longo do cromossomo Y

Yq - Braço curto do cromossomo Y

SUMÁRIO

Introdução.....	12
1. O cromossomo Y.....	12
2. Variações no número de cópias (CNVs).....	14
3. Os genes <i>TSPY</i> e <i>SRY</i>	15
4. <i>Corona virus disease 2019</i> (COVID-19).....	16
5. Genética, Epigenética e COVID-19.....	20
Objetivos.....	22
1. Objetivo Geral.....	22
Pacientes, Material e Métodos.....	23
1. Coleta do Material.....	23
1.1 Aspectos éticos.....	23
1.2 Casuística.....	23
1.3 Coleta de sangue.....	23
1.4 Critérios de seleção.....	24
2. Extração e Quantificação do DNA.....	24
3. Análise da variação de cópias do gene <i>TSPY</i>	25
4. Análise estatística.....	28
Resultados.....	29
Discussão.....	33
Conclusão.....	37
Referências Bibliográficas.....	38
Apêndices.....	46
Anexos.....	48

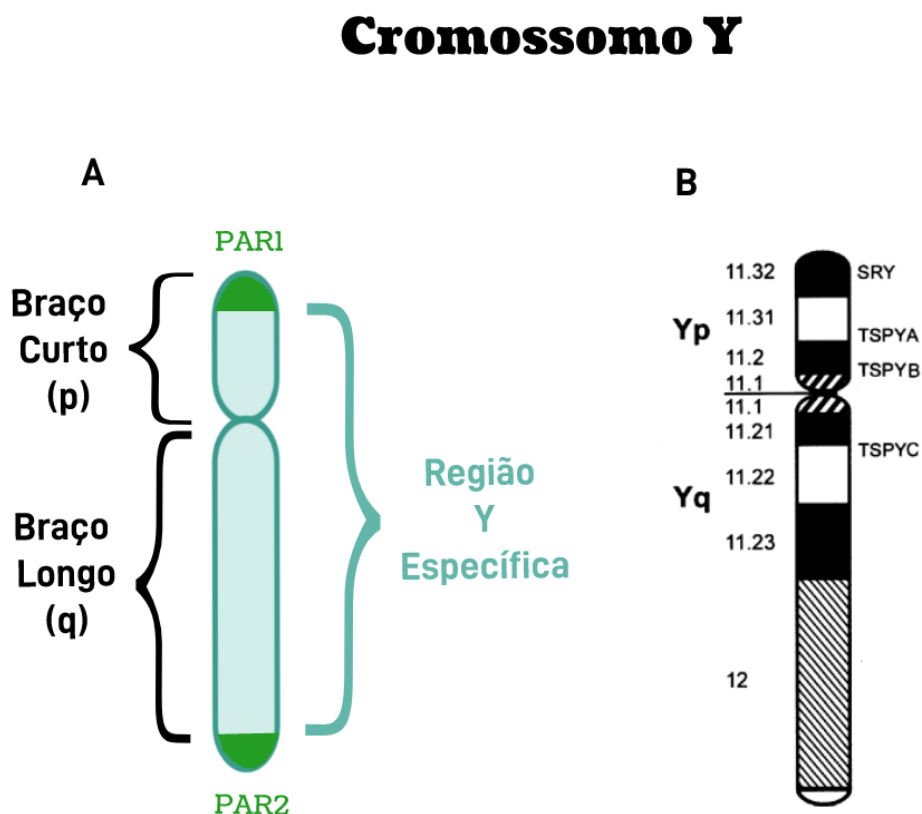
INTRODUÇÃO

1. O cromossomo Y

O cromossomo Y, é geneticamente determinante do sexo em humanos, por estar presente no genoma masculino e não no feminino. Marcadores específicos como os genes *sex-determining region Y (SRY)*, *Amelogenin Y-Linked (AMELY)* e a proteína *testis specific protein Y-linked 1 (TSPY1)* podem ser utilizados para identificação de sexo por meio do DNA. O mesmo cromossomo é o mais singular deles e se difere dos outros em tamanho, estrutura genômica, caminho evolutivo, padrão evolutivo e conteúdo (BASHAMBOO, 2003; BUTLER, 2014).

O Y pode ser subdividido em 2 importantes regiões: as regiões pseudoautossômicas, denominadas *PAR1* e *PAR2*, que correspondem a um domínio de homologia X-Y relacionado ao pareamento na meiose; e as sequências que raramente recombina com o cromossomo X são parte da região macho específica (*MSY*) (Figura 1). Essas divisões são a base molecular que indica como o cromossomo Y mantém a herança paterna na forma de haplótipo (NAVARRO-COSTA, 2012; DESCHEPPER 2017).

Figura 1 - A) Idiograma do cromossomo Y contendo as regiões pseudoautossômicas (*PAR 1* e *PAR2*) e a Região Macho Específica. B) Idiograma do cromossomo Y com a localização dos genes *SRY* e *TSPY*.



Fonte: SANTOS, 2022; Modificado de ROTTGER et al., 2002

A região *MSY* é dividida em regiões de eucromatina e heterocromatina. A primeira contém três sequências: a X-transposta que mantém 99% de identidade com o cromossomo X, a X-degenerada que apresenta genes de cópia única ou

pseudogenes ligados ao X, e a região amplicon que contém múltiplas cópias de genes expressos predominantemente e/ou exclusivamente nos testículos (SKALETSKY et al., 2003; KRAUSZ e CASAMONTI, 2017).

O cromossomo Y apresenta um grande número de sequências repetitivas no braço longo (Yq), como os palíndromos P1-P8, cujas sequências chegam a 99% de simetria. A região amplicon abrange sequências de genes multicópias como a região do fator de azoospermia (*AZF*) e o cluster *TSPY* ou *testis-specific protein Y*. Regiões repetitivas promovem aumento na expressão de genes e previnem sua perda na transmissão multigeracional, além disso, pode ser que as repetições compensem mutações que possam ocorrer (ROZEN, et al., 2003; XU e PANG, 2022).

2. Variações no número de cópias (CNVs)

Uma CNV é definida como um marcador genômico com segmentos de mais de 1kb cujo número aumenta ou diminui em comparação com o genoma de referência. É um fenômeno importante para a variabilidade genômica (FEUK et al., 2006).

As CNVs estão relacionadas, inclusive, com o desenvolvimento de doenças, e com a expressão diferencial de genes supressores de tumor e oncogenes (SHAO et al., 2019). Em pesquisas de infertilidade, as CNVs são candidatas para estudos de efeito na contagem de espermatozóides ou outros fenótipos, especialmente nas regiões *AZF* (JOBLING, 2008).

No cromossomo Y, a maioria das CNVs são geradas por recombinação homóloga não-alélica (*NAHR*) (JOBLING, 2008). E, embora seja o cromossomo com a menor densidade gênica, acredita-se que suas CNVs têm relação com a

espermatogênese e podem estar envolvidas no desenvolvimento de câncer (HALLAST et al., 2021, XU e PANG, 2022).

3. Os genes *TSPY* e *SRY*

O gene *TSPY* foi um dos primeiros genes isolados do cromossomo Y e possui função macho-específica (ZHANG, 1992; LAU et al., 2019). O número de cópias varia de indivíduo para indivíduo, o estimado é 35 cópias, sendo assim, uma quantidade grande que torna esse gene um marcador sensível para a identificação do sexo em amostras até mesmo pequenas com 4pg de DNA (JACOT et al., 2013), degradadas ou com mistura de DNA feminino e masculino (POMA et al., 2022).

Idade, etnia e outros fatores fisiológicos e genéticos são possíveis influenciadores da variação do número de cópias do *TSPY* sobre a espermatogênese (DUMANSKI e PIOTROWSKI, 2012). Há também estudos que apontam a diferença de CNVs entre tecidos de um mesmo indivíduo no modelo bovino (OLUWOLE et al., 2016). Em outro trabalho com humanos, a saliva, que é um tecido com alta proliferação, apresentou menor número de cópias do que o sangue e o espermatozoide no mesmo homem. Em vista disso, fatores individuais, as requisições de cada tecido e o ambiente celular influenciam nas CNVs do gene *TSPY* (CRUZ, 2018).

Já o gene *SRY* está localizado na região Yp11.3 ou seja no braço curto do Y (Figura 1) (LAYMAN, 2003), e é essencial para a determinação do sexo masculino em mamíferos, haja vista que sua presença leva ao desenvolvimento dos testículos (OKASHITA e TASHIBANA 2021). Mutações no *SRY* resultam na síndrome de Swyer e disgenesia gonadal XY, cujos indivíduos diagnosticados podem ser inférteis (JAGER et al., 1990; OSTRER, 2000; JEDIDI et al., 2018).

Múltiplas cópias do gene *SRY* já foram descritas em roedores como ratos, ratazanas e roedores africanos (NAGAMINE, 1994; LUNDRIGAN e TUCKER, 1997; BULLEJOS et al., 1999; TURNER, et al., 2007). Em humanos, já foram identificados casos em um estudo com homens expostos a alta taxa de radiação mas não em homens controle (PREMI et al., 2006, 2009). Entretanto ainda faltam estudos para esclarecer com mais clareza.

A síndrome 47,XYY também chamada de síndrome do duplo Y ou síndrome de Jacobs, é uma aneuploidia que ocorre em 1 a cada mil nascimentos de homens. O fenótipo dos pacientes varia muito, porém, estatura alta, hipotonia, macropenis e macroorquidismo ou super desenvolvimento de órgãos sexuais são alguns dos resultados mais comuns (BARDSLEY et al., 2013). Foram relatados casos de infertilidade em homens XYY e a prevalência desta síndrome em homens com azoospermia é ao menos 3 vezes maior que a população geral (RIVES et al., 2005; EL-DAHTORY e ELSHEIKHA, 2009; ABDEL et al., 2012; KIM et al., 2013; BORJIAN et al., 2019).

4. *Corona virus disease 2019 (COVID-19)*

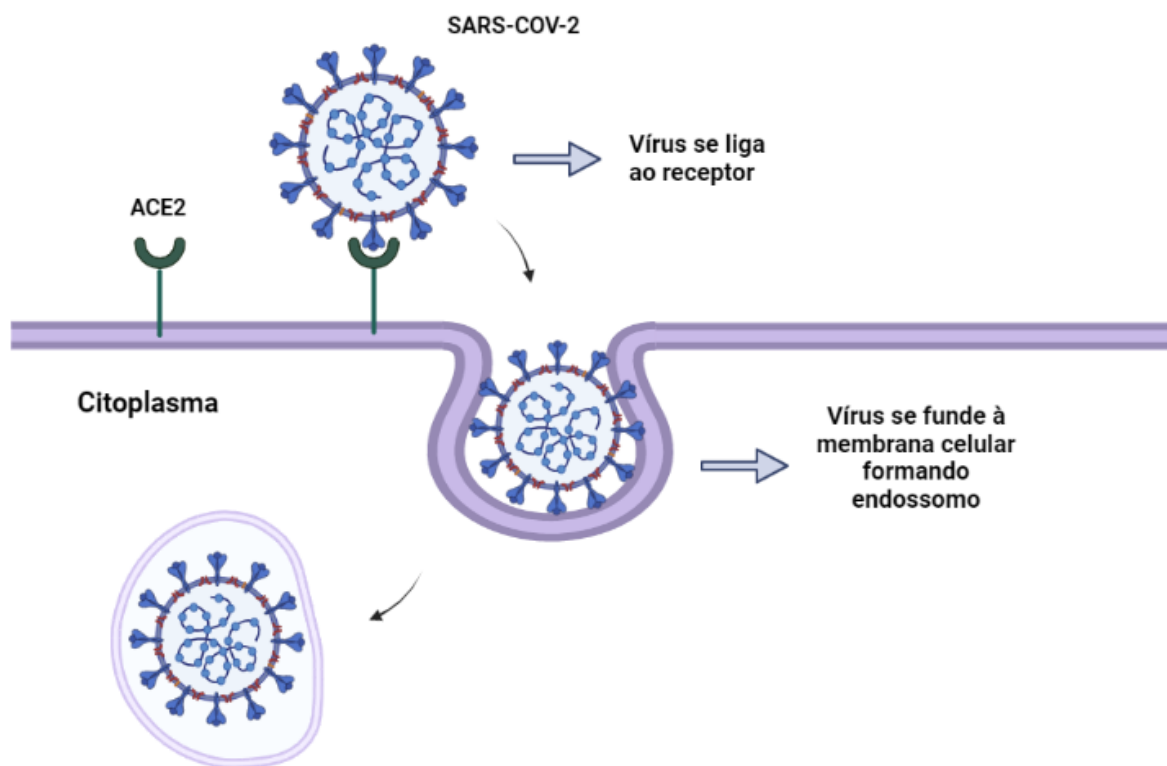
A pandemia de COVID-19, causada pela síndrome respiratória aguda grave coronavírus 2 (SARS-CoV-2), já causou até o momento mais de 616 milhões de infecções e mais de 6 milhões de mortes no mundo todo, de acordo com dados da Organização Mundial da Saúde (WHO, 2022).

O quadro clínico varia de uma infecção assintomática para um desfecho fatal nos casos graves. Os fatores de risco que estão constantemente relacionados com os casos graves incluem: sexo, a idade, hipertensão, obesidade, diabetes, doenças cardiovasculares, doenças autoimune e tabagismo (ONDER et al., 2020; TARTOF et

al., 2020; ZHOU et al., 2020). Os casos de maior risco comumente são homens mais velhos (TAKAHASHI et al., 2020).

O SARS-CoV-2 tem na sua estrutura a proteína *spike* (S), mais especificamente na membrana. Essa proteína possui o *receptor-binding domain* (RBD) ou domínio de ligação ao receptor, que por sua vez permite a ligação com proteínas como a enzima conversora de angiotensina (ACE2) e proteases como a protease transmembrana serina 2 (TMPRSS2) e consequentemente a entrada do vírus na célula (Figura 2) (PEARLMAN e NETLAND, 2009; GLOWACKA et al., 2011; HEURICH et al., 2014; WALLS et al., 2020).

Figura 2 - Mecanismo de entrada do SARS-COV-2 na célula via receptor da enzima ACE2.



Fonte: Santos, 2022

O principal sistema afetado pela infecção do vírus SARS-CoV-2 é o sistema respiratório. Entretanto, outros sintomas já foram observados envolvendo órgãos de outros sistemas, tais qual o sistema gastrointestinal (ZHANG et al., 2020), sistema nervoso (MAO et al., 2020; WU et al., 2020) e sistema cardiovascular (NISHIGA et al., 2020). Isso é explicado pelo mecanismo de entrada do vírus que pode infectar células de diferentes sistemas, basta que expressem as proteínas de ligação que o

SARS-CoV-2 utiliza. O vírus já foi detectado no sangue, coração, vasos, intestino, faringe, rins, fígado, cérebro e órgãos genitais masculinos, em especial testículos e epidídimo (PUELLES et al., 2020; TRYPSTEEN., 2020).

Sabe-se que infecções virais podem afetar os gametas masculinos reduzindo a contagem e a motilidade de espermatozóides e até mesmo resultar em morte espermática, além de afetar a função dos hormônios envolvidos na reprodução e na função dos órgãos genitais por meio da produção de citocinas inflamatórias (LIU et al., 2018).

Células dos testículos como Leydig, Sertoli e espermatogônia apresentam alta expressão de ACE2 (LIU et al., 2020; WANG e XU, 2020; SHASTRI et al., 2020). Órgãos sexuais secundários incluindo glândula adrenal, vesículas seminais e próstata também expressam ACE2 e TMPRSS2 (PAUL et al., 2006; LUCAS et al., 2014; PAN et al., 2020). Um estudo com homens com azoospermia não obstrutiva (NOA) observou uma diminuição nos níveis de expressão de RNA mensageiro, (mRNA) do gene *ACE2* e do receptor MAS em comparação com homens com azoospermia obstrutiva. O que sugere que esses genes podem estar envolvidos com a infertilidade (REIS et al., 2020).

Também já se tem relatos de homens infectados por SARS-CoV-2 que manifestaram orquite, trauma geniturinário (GU), ruptura testicular, priapismo químico, desconforto escrotal, dor e fratura peniana, redução das células de Leydig, inflamação no interstício e níveis mais baixos de testosterona (SPOONER et al., 2020; YANG et al., 2020; MA et al., 2020).

5. Genética, epigenética e COVID-19

Indivíduos do sexo masculino foram mais afetados pela COVID-19 sendo relacionados a casos mais graves, e maiores taxas de internação quando comparados com mulheres (PECKHAM et al., 2020). Uma das hipóteses que pode explicar estes dados é a inativação do cromossomo X (XCI).

A XCI é regulada pelo centro de inativação do X (XIC) e determinado pelo gene *XIST* ou transcrito específico do X-inativo, que faz alterações na heterocromatina do cromossomo e objetiva garantir uma dosagem equivalente do nível de expressão de genes codificados pelo cromossomo X entre homens e mulheres (BROCKDORFF et al., 1992; PENNY et al., 1996). Em indivíduos XX, um dos X se torna silenciado durante a embriogênese através do XCI. Entretanto, alguns genes ainda continuam sendo expressos, escapando desse mecanismo (BERLETCH et al., 2011; HARPER e LYON, 2011; GENDREL et al., 2012).

O *ACE2* é um dos genes ligados ao cromossomo X que escapa da XCI. Isso pode justificar porque os homens são mais suscetíveis a COVID-19, pois as mulheres têm duas vezes mais instruções genéticas para transcrever *ACE2* e mais genes imunorreguladores ligados ao X (KGATLE et al., 2021).

As modificações epigenéticas são alterações no DNA que alteram a expressão de genes sem modificar a sequência de nucleotídeos. Os principais mecanismos que resultam em modificações epigenéticas são: metilação do DNA, modificações pós traducionais das histonas e ação de RNAs não codificadores (BHAT et al., 2022).

Vários estudos já relataram indícios destas modificações epigenéticas em genes de hospedeiros em indivíduos diagnosticados com COVID-19. Modificações que, inclusive, têm impacto na patogênese viral (BHAT et al., 2022). Em um deles,

os pesquisadores utilizaram abordagens computacionais para avaliar genes do hospedeiro diferencialmente expressos na infecção por SARS-CoV-2 e encontraram 10 fatores epigenéticos diferencialmente expressos, sendo eles: *PPARGC1A* , *PADI3* , *FOXO1* e *HELLS* regulados negativamente e *PRMT1* , *TRIM16* , *HDAC7* , *HDGF* , *DTX3L* e *PRDM1* regulados positivamente (KHAN e ISLAM, 2020).

Compreender as alterações genéticas e epigenéticas que um vírus como o SARS-CoV-2 pode induzir em diferentes genes do hospedeiro alterando sua expressão e a função de diferentes tipos celulares em vários sistemas é importante para um diagnóstico profundo e para o desenvolvimento de terapias que reduzem a gravidade da COVID-19 (KGATLE et al., 2021).

A hipótese principal do presente estudo foi a de que a COVID-19 acarreta um impacto no número de cópias do gene *TSPY*.

OBJETIVOS

1. Objetivo Geral

Verificar a existência de associação entre o número de cópias do gene *TSPY* e a COVID-19 em homens adultos.

PACIENTES, MATERIAL E MÉTODOS

1. Coleta do Material

1.1 Aspectos Éticos

Este projeto faz parte de um projeto mais completo intitulado “Análise do comprimento do DNA telomérico de espermatozóides em pacientes com história prévia de COVID-19”, processo no 4.703.281 aprovado no CEP HCFMRP-USP (Anexo C e D). Os participantes somente foram incluídos nas pesquisas após assinarem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) que foi lido e explicado por um dos pesquisadores envolvidos (Anexo B).

1.2 Casuística

A amostragem foi composta de 30 indivíduos. 15 homens diagnosticados com COVID-19 há mais de 90 dias e 15 homens sem sintomas, sinais e/ou exames laboratoriais sugestivos de COVID-19, com idade entre 18 e 55 anos. Foram realizadas 30 análises de CNVs do gene *TSPY* utilizando amostras de sangue dos indivíduos.

1.3 Coleta de Sangue

A coleta de amostras sanguíneas foi realizada no Centro de Reprodução Humana do HCFMRP-USP no início do ciclo de tratamento de Fertilização *in vitro* (FIV) ou no dia da coleta de sêmen para aqueles que não foram realizar tratamento de FIV. Foram coletados cerca de 5 ml de sangue venoso periférico em tubos estéreis, a vácuo, contendo EDTA para extração do DNA, e 4 mL de sangue venoso periférico em tubos estéreis, a vácuo, contendo ativador de coágulo (sílica) e gel

separador de soro para dosagens sorológicas hormonais e metabólicas. As amostras foram lavadas e congeladas em nitrogênio líquido até a extração do DNA.

1.4 Critérios de seleção

Os homens incluídos no estudo apresentavam idade entre 18 e 55 anos, sem distinção de raça ou classe social, e que concordaram em assinar o termo de consentimento livre e esclarecido. Foram excluídos da seleção homens com comorbidades graves, que não tinham feito algum teste que comprovasse diagnóstico para COVID-19 e que tinham sido diagnosticados a menos de 90 dias do dia da coleta de sangue.

Para obter tais informações uma ficha clínica foi preenchida junto ao paciente no dia da coleta (Anexo A). Dados dos indivíduos incluídos nos grupos estão compilados em uma tabela (Apêndice A)

Os princípios de confiabilidade dos dados que foram obtidos, a manutenção da autonomia dos participantes, o sigilo à identificação pessoal e beneficência/não-maleficência dos propósitos foram respeitados em todas as etapas do estudo.

2. Extração e quantificação do DNA

O DNA genômico das amostras foi extraído por meio do *MasterPure™ Complete DNA and RNA Purification Kit* (Epicentre, Illuminacompany), seguindo os protocolos indicados pelo fabricante. Posteriormente à extração, as amostras foram analisadas por espectrofotometria no Nanodrop 2000® (Thermo Fisher Scientific Inc) para identificação de qualidade e quantidade do DNA, seguindo os critérios de qualidade indicados pelo fabricante.

3. Análise da variação do número de cópias do gene *TSPY*

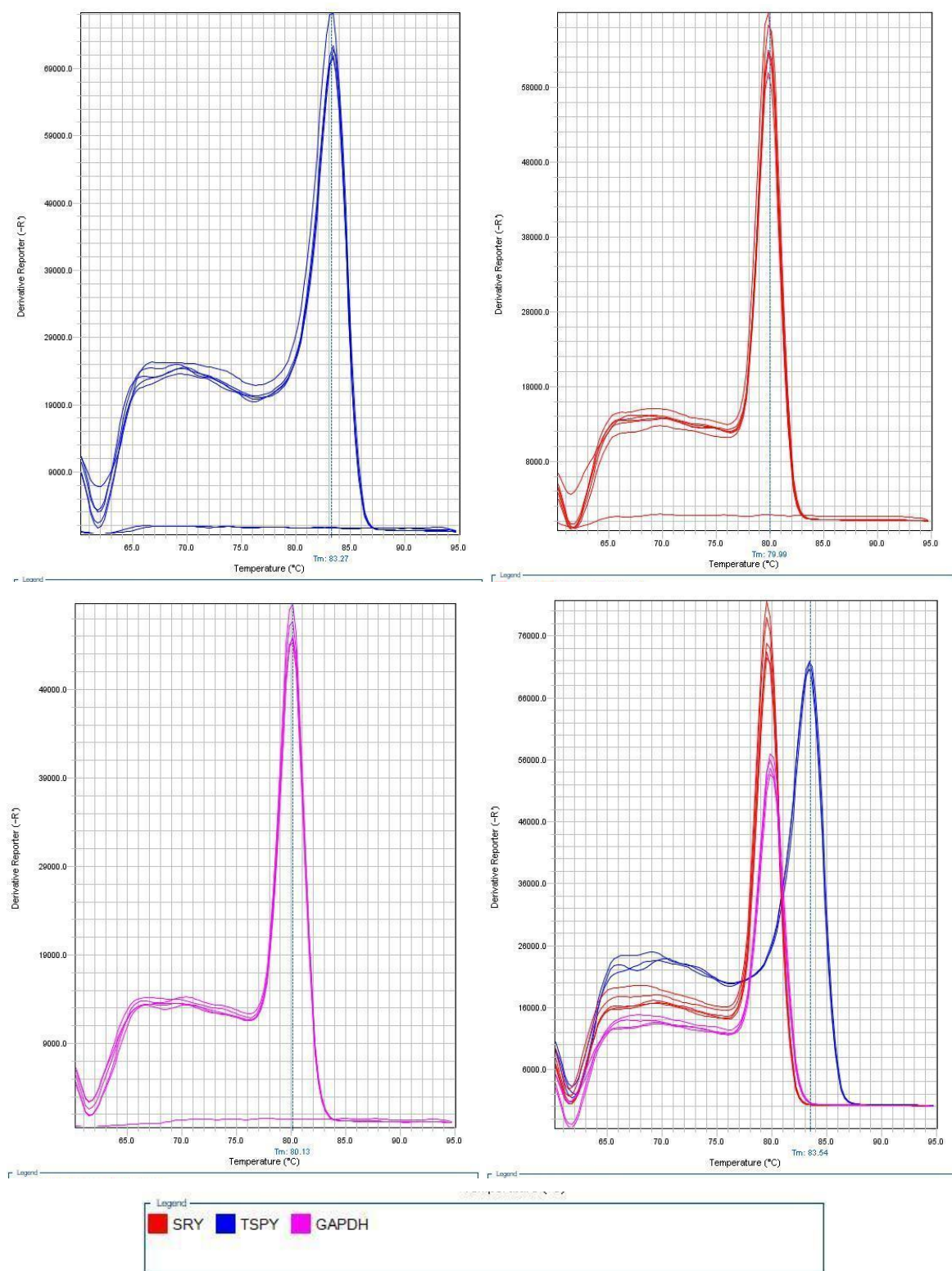
A análise da variação do número de cópias do gene *TSPY* foi realizada segundo descrito em trabalho anterior do Laboratório de Epigenética e Reprodução da FMRP-USP (CRUZ, 2018) por meio da técnica de *PCR* quantitativa (*qPCR*, do inglês *Quantitative Polymerase Chain Reaction*), no equipamento *StepOnePlus™ Real-Time PCR Systems*, seguindo as especificações do fabricante. Foram desenhados *primers* para uma sequência do gene *TSPY*, do gene de referência de cópia única *SRY*, e do gene *Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase (GAPDH)* como gene referência, a partir de sequências dos bancos de dados GenBank (NCBI) e UCSC Genome bioinformatics utilizando os programas PrimerQuest TOOL (https://www.idtdna.com/PrimerQuest/Home/Details/0_1) e Premier Biosoft International (<http://www.premierbiosoft.com/qOligo/Oligo.jsp?PID=1>) (CRUZ, 2018).

O número relativo de cópias do gene *TSPY* foi calculado usando o método ΔC_t para quantificação relativa utilizando a fórmula $2^{-\Delta C_t}$, onde o $\Delta C_t = C_{t_{\text{alvo}}} - C_{t_{\text{referência}}}$. O gene *SRY* foi utilizado como gene referência em todos os indivíduos por ser um gene de cópia única e também presente no cromossomo Y (PFAFFL, 2001; RAMOS et al., 2010).

Foram realizadas curvas-padrão de diluições seriadas de DNA para cada *primer* para determinar a eficiência das reações, segundo as especificações do fabricante (90%-110%). A eficiência foi calculada pela fórmula: $E = [10^{(-1/\text{slope})} - 1] \cdot 100$, onde $E = 100$ equivale a 100% de eficiência (Tabela 1). As curvas de dissociação de cada gene estão ilustradas na figura 3. As concentrações da reação de amplificação foram 5 μL de SYBR® Green PCR Master Mix (5X, Applied Biosystems®), 0,1 μL de cada *primer* (10 pmol, Thermo Fisher®), 2 μL de DNA (5

ng) e 2,8 µL de água ultrapura para um volume final da reação de 10 µL. As reações para cada gene foram realizadas separadamente. As condições de amplificação para todos os genes foram: 95°C por 10 minutos para ativação da enzima, seguido de 35 ciclos de desnaturação à 95°C por 15 segundos, pareamento à 60°C por 1 minuto.

Figura 3 - Curvas de dissociação dos genes *TSPY*, *SRY* e *GAPDH*



Fonte: Santos, 2022

4. Análise Estatística

O teste T de Student foi realizado para verificar se existe diferença estatística entre os grupos COVID e não COVID em relação à variável número de cópias do gene *TSPY*.

Tabela 1 - Genes e sequências utilizadas no trabalho

Gene	Sequência 5'-3'	Pb	Eficiência (%)
<i>TSPY</i>	Fw CGGCGTCGATG TGACTCTTTGG	- 176	107
	Re CGCTCTGAACTC GCTTCTGCTC	-	
<i>SRY</i>	Fw GCGATGATTACA GTCCAGC	- 174	106
	Re GAGACCACACG ATGAATGC	-	
<i>GAPDH</i>	Fw CATCCCTTCTCC CCACACAC	- 104	104
	Re AGTCCCAGGGC TTTGATTG	-	

Fw = *Primer Forward*, Re = *Primer Reverse*, Pb = *Pares de bases*

RESULTADOS

As curvas de amplificação dos genes *TSPY*, *SRY* e *GAPDH* a partir das reações da *qPCR* podem ser visualizadas na figura 4, o *threshold* para todos os genes foi 0,5 (Figura 4). Os dados com valores da média, desvio padrão e valores máximo e mínimo do número de cópias do gene *TSPY* para cada grupo amostral estão apresentados na tabela (Tabela 2).

Figura 4 – Gráficos mostrando as curvas de amplificação para as sequências dos genes: (A) *TSPY*. (B) *SRY*. (C) Curva de amplificação do gene *GAPDH*. (D) Curvas de amplificação dos três genes em conjunto para comparação.

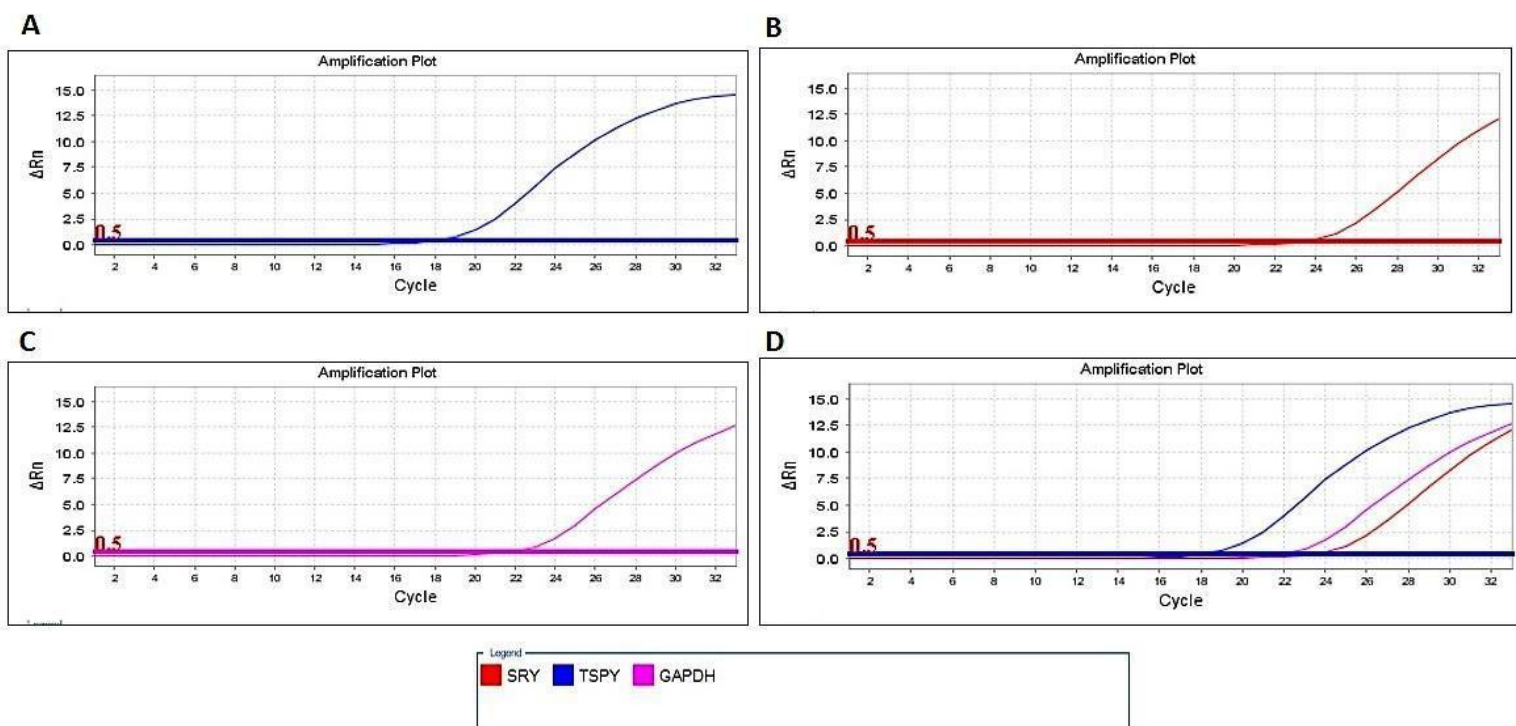


Tabela 2 - Análise das CNVs do gene *TSPY* nos grupos COVID e não COVID

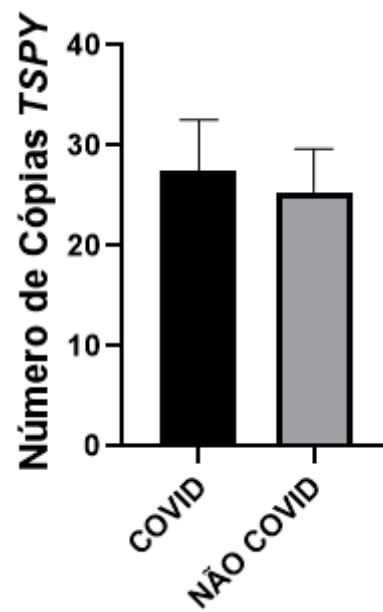
São apresentados a média e o desvio padrão do número de cópias do gene *TSPY* para cada grupo amostral e os valores máximo e mínimo do número de cópias.

	Total	COVID	NÃO COVID
N	30	15	15
Média	26,45	27,54	25,37
Desvio Padrão	4,6782	5,01	4,32
Mínimo	19,83	20,66	19,83
Máximo	35,38	35,38	31,62

Fonte: Santos, 2022

O teste de T Student foi realizado para verificar se existe diferença estatística entre os grupos COVID e não COVID em relação à variável número de cópias do gene *TSPY*. Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p=0,2137$). A diferença de valor entre as médias da variável no teste foi de 2,17.

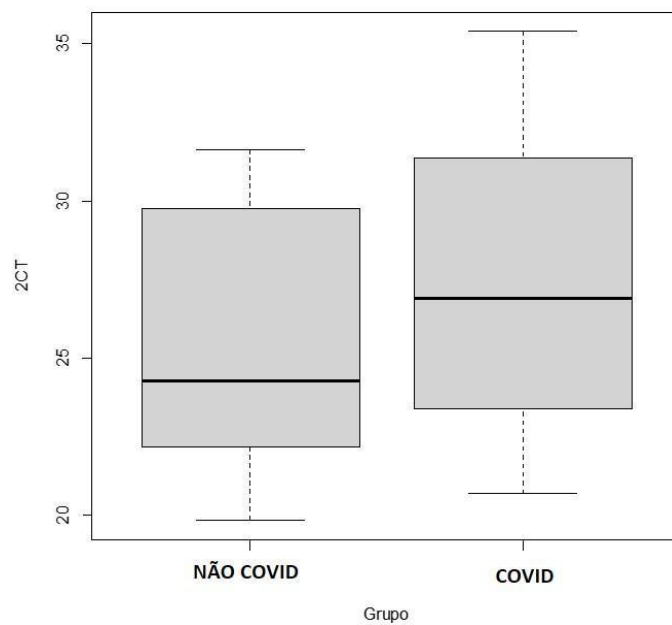
Figura 5 - Média do número de cópias do gene *TSPY* nos grupos COVID e NÃO COVID



Fonte: Santos, 2022

O grupo COVID tende a ter medida de o número de cópias do gene alvo um pouco maior (porém com valor de *P* não significativo) em comparação com o grupo NÃO COVID.

Figura 6 - Box plot análise do número de cópias do gene *TSPY* nos grupos COVID e NÃO COVID



Fonte: Santos, 2022

DISCUSSÃO

Neste trabalho foi analisada a existência ou não de associação entre o número de cópias do gene *TSPY* e a COVID-19 em homens adultos, utilizando como tecido para análise o sangue periférico de homens adultos.

A média do número de cópias relativo do gene *TSPY*, em relação ao gene de cópia única *SRY* mapeado no mesmo cromossomo Y, dos homens do grupo COVID-19 teve uma tendência a serem maiores que do grupo controle, visível em todos os gráficos e mesmo com a estratificação em diferentes idades. O número de cópias na amostragem total variou de 19-35, sendo de 20-35 no grupo COVID-19, e 19-31 no grupo controle, o que poderia indicar que o vírus tem alguma relação com as CNVs desse gene.

No entanto, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados neste trabalho, mas a baixa diferença de valor entre as médias de número cópias relativo do gene *TSPY* no teste de T Student (2,17) indica que o número amostral provavelmente foi pequeno para detectar uma diferença estatística que seja clinicamente relevante. Logo, aumentar o número amostral é essencial para testar se os resultados deste trabalho seguem a tendência observada com $n=30$.

Este trabalho também utilizou amostras de homens que foram diagnosticados com COVID-19 há pelo menos 90 dias antes da coleta das amostras, um longo intervalo. Logo os resultados são relativos a um período pós COVID-19, o que poderia apontar que não houve um efeito da infecção, pelo menos a longo prazo.

Se confirmada essa tendência, uma outra possibilidade é de que homens com mais cópias de *TSPY* sejam mais suscetíveis à COVID-19 e à manifestação do quadro clínico da doença. Deste modo, os homens com menos cópias podem ter

um fator de proteção contra a infecção. Porém, uma das limitações foi de não ter comprovação por meio de testes que os homens do grupo Não Covid, realmente não tiveram COVID-19 ou se apenas não apresentaram o quadro clínico da doença.

Um estudo de 2009 relatou correlação positiva entre o número de cópias de *TSPY1* e a contagem de espermatozoides, uma média de cópias significativamente menor em pacientes inférteis idiopáticos em comparação com homens normozoospermicos e um risco 1,5 vezes maior de parâmetros espermáticos anormais em homens com menos de 33 cópias (GIACHINI et al., 2009). Pode ser interessante futuramente analisar a variação do número de cópias em outros tecidos como o sêmen e se há diferença nos parâmetros do esperma dos grupos por meio do espermograma. Esse fato é importante, uma vez que os homens do presente estudo foram recrutados em serviço de reprodução, onde a procura por parte de homens com problemas de fertilidade não deve ser descartada.

Em trabalho populacional anterior do nosso laboratório (CRUZ, 2018), utilizando os mesmos parâmetro laboratoriais, foi constatada, em população urbana (n=125 homens), uma média de cópias do *TSPY* de 43 (desvio padrão de 13), número superior ao obtido no presente estudo, o que poderia corroborar a hipótese de problemas de fertilidade da casuística atual.

O vírus zika (ZIKV) é, assim como o SARS-COV-2, um vírus de RNA, há comprovações de que ele infecta o trato genital masculino e pode persistir no sêmen até ser transmitido sexualmente, além de alterações nos parâmetros seminais normais (BARZON et al, 2017). Achados sobre a presença do vírus da COVID-19 no sêmen são controversos. Enquanto muitos relatam resultados negativos para o vírus no sêmen (OMOLAOYE et al., 2021), o trabalho de Li e colaboradores (2020) relata que no sêmen de 38 pacientes com COVID-19, seis foram positivas para a presença

do vírus . Um outro trabalho observou a ausência de SARS-COV-2 nos tecidos testiculares em 90% dos casos, no entanto todos os tecidos analisados exibiram lesão tubular seminífera significativa, número reduzido de células de Leydig, inchaço das células de Sertoli e inflamação linfocítica leve (Yang et al., 2020). Sabe-se também que os pacientes infectados têm uma significativa redução na contagem total de espermatozoides, concentração espermática, motilidade e volume seminal (CORONA et al., 2022). Se a infecção viral por SARS-COV-2 pode induzir instabilidade genômica, inclusive no gene *TSPY*, um gene relacionado à espermatogênese, esses parâmetros seminais alterados apresentados na literatura podem ser justificados.

O vírus da Hepatite B (HBV) também já foi encontrado no esperma de pacientes com infecção crônica e já mostrou alterar parâmetros do esperma. Um estudo expôs espermatozoides a diferentes concentrações de HB, uma proteína de superfície do HBV. Conforme aumentava-se a concentração, a fragmentação do DNA espermático aumentou, a porcentagem de espermatozoides vivos diminuiu e a taxa de penetração também diminuiu significativamente (HAN et al., 2021). O HBV pode entrar nas células germinativas masculinas pela barreira hematotesticular e se integrar no genoma induzindo anormalidades cromossômicas no esperma. A integração do DNA viral nos cromossomos espermáticos é preocupante pois podem aumentar a instabilidade cromossômica e criar efeitos hereditários, no caso do HBV, a possibilidade de uma via de transmissão vertical por linhagem germinativa para próximas gerações (HUANG et al., 2003). Ou seja, infecções virais podem aumentar a instabilidade genômica.

Mais pesquisas precisam ser feitas em relação ao SARS-COV-2 para elucidar se o vírus poderia induzir CNVs e outras alterações no genoma humano e por quais mecanismos.

Aumentar o número amostral deste trabalho futuramente pode ser mais conclusivo para as análises estatísticas.

Este é o primeiro estudo da literatura a analisar a existência de associação do número de cópias do gene *TSPY* com a COVID-19.

CONCLUSÃO

Os resultados deste trabalho não permitem concluir que homens que foram infectados com SARS-COV-2 apresentam diferenças no número de cópias do gene *TSPY* em relação aos homens sem manifestações clínicas da doença, devido à falta de diferença estatística significativa.

No entanto, uma tendência a um maior número de cópias no grupo COVID-19, pode apontar para a necessidade do estudo de um maior número de casos para uma análise mais conclusiva, além da verificação de parâmetros envolvidos com a fertilidade dos casos avaliados.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDEL-RAZIC, M.M.; ABDEL-HAMID, I.A.; ELSOBKY, E. S. **Nonmosaic 47,XYY syndrome presenting with male infertility**: Case series. *Andrologia*, 44(3), 200–204. 2011.

BARDSLEY, Martha Zeger; KOWAL, Karen; LEVY, Carly; GOSEK, Ania; AYARI, Natalie; TARTAGLIA, Nicole; LAHLOU, Najiba; WINDER, Breanna; GRIMES, Shannon; ROSS, Judith L. **47, XYY syndrome: clinical phenotype and timing of ascertainment**. *J. Pediatr.* 1085–1094. 2013.

BARZON, Luisa; LAVEZZO, Enrico; PALÚ, Giorgio. **Zika virus infection in semen: effect on human reproduction**. *The Lancet Infectious Diseases*, Volume 17, Issue 11, Pages 1107-1109, 2017.

BASHAMBOO, Anu; GIRAN, Harleen Mangat; AZFER, Asim; ALI, Sher. **Genomics of the Human Y Chromosome and Molecular Diagnosis**. *Proc. Indian natn Sci Acad.* 2003.

BERLETCH, Joel B.; YANG, Fan; XU, Jun; CARREL, Laura; DISTECHE, Christine M. **Genes that escape from X inactivation**. *Hum Genet.* 2011 Aug;130(2):237-45. 2011.

BHAT, Swati; RISHI, Praveen; HADHA, Vijayta D. **Understanding the epigenetic mechanisms in SARS CoV-2 infection and potential therapeutic approaches**. *Virus Res.* 2022.

BOROUJENI, Parnaz Borjian; SABBAGHIAN, Marjan; DIZAJI, Ahmad Vosough; MORADI, Shabnam Zarei; ALMADANI, Navid; LASHKARI, Faranak Mohammadpour; ZAMANIAN, Mohamad Reza; MEYBODI, Anahita Mohseni. **Clinical aspects of infertile 47,XYY patients**: A retrospective study. *Human Fertility (Cambridge, England)*, 22(2), 88–93. 2019.

BROCKDORFF, Neil; ASHWORTH, Alan; KAY, Graham F.; MCCABE, Veronica M.; NORRIS, Dominic P.; COOPER, Penny J.; SWIFT, Sally; RASTAN, Sohaila. **The Product of the Mouse Xist Gene Is a 15 Kb Inactive X-Specific Transcript Containing No Conserved ORF and Located in the Nucleus**. *Cell*, 1992.

BULLEJOS, M.; SÁNCHEZ, A.; BURGOS, M.; HERA, C.; JIMÉNEZ R.; DÍAZ de la guardia, R. **Multiple, polymorphic copies of SRY in both males and females of the vole *Microtus cabreræ***. *Cytogenet Cell Genet* 79: 167–171. 1997.

BUTLER, Erin; LI, Richard. **Genetic Markers for Sex Identification in Forensic DNA Analysis**. CUNY Academic Works. 2014.

CORONA, G.; VENA, W.; PIZZOCARO, A.; PALLOTI F.; PAOLI D.; RASTRELLI, G.; BALDI, E.; CILLONI N.; GACCI, M.; SEMERARO, F.; SALONIA A.; MINHAS, S.; PIVONELLO, R.; SFORZA, A.; VIGNOZZI, L.; ISIDORI, A.M.; LENZI, A.; MAGGI, M.; LOMBARDO, F.; **Andrological effects of SARS-Cov-2 infection: a systematic review and meta-analysis.** J Endocrinol Invest. 2022

CRUZ, Juliana de Oliveira. **Variação do número de cópias do gene *TSPY* em indivíduos saudáveis da população brasileira.** Orientador: Ester Silveira Ramos. 2018. 85 f. Dissertação (Mestrado em Genética) - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2018.

DESCHEPPER, Christian F. **Viewing the male-specific chromosome Y in a new light.** Eur J Hum Genet. 2017.

DUMANSKI, Jan P.; PIOTROWSKI, Arkadiusz. **Genomic Structural Variants.** Methods Mol Biol v. 838. p. 249–272, 2012.

EL-DAHTORY, Faeza; ELSHEIKHA, Hany M. **Male infertility related to an aberrant karyotype, 47,XYY: Four case reports.** Cases Journal. 2009.

FEUK, Lars; CARSON Andrew R.; SCHERER Stephen W. **Structural variation in the human genome.** Nat Rev Genet. 2006.

GIANCHINI, Claudia; NUTI, Francesca; TURNER, Daniel J.; LAFACE, Ilaria; XUE, Yali; DAGUIN, Fabrice; FORTI, Gianni; TYLER-SMITH, Chris; KRAUSZ, Csilla. **TSPY1 copy number variation influences spermatogenesis and shows differences among Y lineages.** J Clin Endocrinol Metab. 2009

GLOWACKA, Ilona; BERTRAM, Stephanie; MULLER, Marcel A.; ALLEN, Paul; SOILLEUX, Elizabeth; PFEFFERLE, Susanne; STEFFEN, Imke; TSEGAYE, Theodros Solomon; HE, Yuxian; GNIRSS, Kerstin; NIEMEYER, Daniela; SCHNEIDER, Heike; DROSTEN, Christian; POHLMANN, Stefan. **Evidence that TMPRSS2 activates the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein for membrane fusion and reduces viral control by the humoral immune response.** J. Virol. 85:4122–4134. 2011

HALLAST, Pille; KIBENA, Laura; PUNAB, Margus; ARCIERO, Elena; ROOTSI, Siiri; GRIGOROVA, Marina; FLORES, Rodrigo; JOBLING, Mark A.; POOLAMETS, Olev; POMM, Kristjan; KORROVITS, Paul; RULL, Kristiina; XUE, Yali; TYLER-SMITH, Chris; LAAN, Maris. **A common 1.6 mb Y-chromosomal inversion predisposes to subsequent deletions and severe spermatogenic failure in humans.** Elife.2021.

HAN, TING-TING; HUANG, Ji-Hua; GU, Jiang; XIE, Qing-Dong; ZHONG, Ying; HUANG, Tian-Hua. **Hepatitis B virus surface protein induces sperm dysfunction through the activation of a Bcl2/Bax signaling cascade triggering AIF/Endo G-mediated apoptosis.** Andrology. May;9(3):944-955. 2021.

HEURICH, Adeline; HOFMANN-WINKLER, Heike; GIERER, Stefanie; LIEPOLD, Thomas; JAHN, Olaf; POHLMANN, Stefan. **TMPRSS2 and ADAM17 Cleave ACE2 differentially and only proteolysis by TMPRSS2 augments entry driven by the severe acute respiratory syndrome coronavirus spike protein.** J. Virol. 2014;88:1293. 2014.

HUANG, Jian-Min; HUANG, Tian-Hua; QIU, Huan-Ying; FANG, Xiao-Wu; ZHUANG, Tiang-Gang; LIU, Hong-Xi; WANG, Yong-Hua; DENG, Li-Zhi; QIU, Jie-Wen. **Effects of hepatitis B virus infection on human sperm chromosomes.** World J Gastroenterol. 2003 Apr;9(4):736-40. 2003

JACOT, Terry A.; ZALENSKAYA, Irina; MAUCK, Christine; ARCHER, David F; DONCEL, Gustavo F. **TSPY4 is a novel sperm-specific biomarker of semen exposure in human cervicovaginal fluids; potential use in HIV prevention and contraception studies.** Contraception. 88(3): 387–395. 2013.

JAGER, Ralf J.; ANVRET, Maria; HALL, Kerstin; SCHERER, Gerd. **A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY.** Nature, 348(6300), 452–454. 1990.

JEDIDI, Ines; OUCHARI, Mouna; YIN, Qinan. **Sex chromosomes-linked single-gene disorders involved in human infertility.** European Journal of Medical Genetics. 2018.

JOBLING, M. **A. Copy number variation on the human Y chromosome.** Cytogenet Genome Res. 2008.

KIM, Ina W.; KHADILKAR, Arjun C.; KO, Edmund Y.; SABANEH JR., Edmund S. **47,XXX syndrome and male infertility.** Rev Urol. 2013;15(4):188-96. 2013.

KRAUSZ, C.; CASAMONTI, E. **Spermatogenic failure and the Y chromosome.** Hum Genet. 2017.

LAU, Yun-Fai Chris; LI, Yunmin; KIDO, Tatsuo. **Battle of the sexes: contrasting roles of testis-specific protein Y-encoded (TSPY) and TSPX in human oncogenesis.** Asian J Androl. 2019 May-Jun;21(3):260-269. 2019.

LAYMAN, Lawrence C. **Genetic causes of human infertility.** Endocrinology and Metabolism Clinics of North America, 32(3), 549–572. 2003.

LI, Diangeng; JIN, Meiling; BAO, Pengtao; ZHAO, Weiguo; ZHANG, Shixi. **Clinical Characteristics and Results of Semen Tests Among Men With Coronavirus Disease 2019.** JAMA network open, 3(5), e208292. 2020.

LING, Ma; XIE, Wen; LI, Danyang; SHI, Lei; MAO, Yanhong; XIONG, Yao; ZHANG, Yuanzhen; ZHANG, Ming. **Effect of SARS-CoV-2 infection upon male gonadal function: A single center-based study.** medRxiv. 2020.

LIU, Xixi; CHEN, Yidong; TANG, Wenhao; ZHANG, Li; CHEN, Wei; YAN, Zhiqiang; YUAN, Peng; YANG, Ming; KONG, Siming; YAN, Liying; QIAO, Jie. **Single-cell transcriptome analysis of the novel coronavirus (SARS-CoV-2) associated gene ACE2 expression in normal and non-obstructive azoospermia (NOA) human male testes.** *Science China-Life Sciences*. 2020.

LIU, Weihua; HAN, Ruiqin; WU, Han; HAN, Daishu. **Viral threat to male fertility.** *Andrologia*. 2018;50:e13140, 2018.

LUNDRIGAN, Barbara L.; TUCKER, Priscilla K. **Evidence for multiple functional copies of the male sex-determining locus, Sry, in African murine rodents.** *J MolEvol*45: 60–65, 1997.

MAO, Ling; JIN, Huijuan; WANG, Mengdie; HU, Yu; CHEN, Shengcai; HE, Quanwei; CHANG, Jiang; HONG, Candong; ZHOU, Yifan; WANG, David; MIAO, Xiaoping; LI, Yanan; HU, Bo. **Neurologic manifestations of hospitalized patients with coronavirus disease 2019 in Wuhan, China.** *JAMA Neurol*. 2020;77:1–9. 2020.

NAGAMINE, Claude M. **The testis-determining gene, SRY, exists in multiple copies in Old World rodents.** *Genet Res* 64: 151–159, 1994.

NAVARRO-COSTA, Paulo. **Sex, rebellion and decadence: the scandalous evolutionary history of the human Y chromosome.** *Biochim Biophys Acta*. 2012.

NISHIGA, Masataka; WANG, Dao Wen; HAN, Yaling; LEWIS, David B.; WU, Joseph C. **COVID-19 and cardiovascular disease: from basic mechanisms to clinical perspectives.** *Nat. Rev. Cardiol*. 2020;17:543–558. 2020

ONDER, Graziano; REZZA, Giovanni; BRUSAFERRO, Silvio. **Case-fatality rate and characteristics of patients dying in relation to COVID-19 in Italy.** *JAMA*;323:1775–1776. 2020

OKASHITA, N.; TACHIBANA M. **Transcriptional Regulation of the Y-Linked Mammalian Testis-Determining Gene SRY.** *Sex Dev*;15:351-359. 2021.

OLUWOLE, Olutobi A.; REVAY, Tamas; MAHBOUBI, Kiana; FAVETTA, Laura A.; KING, W. Allan. **Somatic Mosaicism in Bulls Estimated from Genome-Wide CNV Array and TSPY Gene Copy Numbers.** *Cytogenetic and Genome Research*, 149(3), 176–181, 2016.

OSTRER, Harry. **Sexual Differentiation.** *Seminars in Reproductive Medicine*, 18(01), 041–050. 2000.

PAN, Feng; XIAO, Xingyuan; GUO, Jingtao; SONG, Yarong; LI, Honggang; PATEL, Darshan P.; SPIVAK, Adam M.; ALUKAL, Joseph P.; ZHANG, Xiaoping; XIONG, Chengliang; LI, Philip S.; HOTALING, James M. **No evidence of severe acute**

respiratory syndrome–coronavirus 2 in semen of males recovering from coronavirus disease 2019. *Fertil. Steril.* 2020;113:1135–1139. 2020.

PAUL, Martin; MEHR, Ali Poyan; KREUTZ, Reinhold. **Physiology of local renin-angiotensin systems.** *Physiol Rev.* 2006 Jul;86(3):747-803. 2006

PEARLMAN, Stanley; NETLAND, Jason. **Coronaviruses post-SARS: update on replication and pathogenesis.** *Nat Rev Microbiol.* 2009 Jun;7(6):439-50. 2009.

PECKHAM, Hannah; DE GRUIJTER, Nina M.; RAINE, Charles; RADZISZEWSKA, Anna; CIURTIN, Coziana; WEDDERBURN, Lucy R.; ROSSER, Elizabeth C.; WEBB, Kate; DEAKIN, Claire T. **Male Sex Identified by Global COVID-19 Meta-Analysis as a Risk Factor for Death and ITU Admission.** *Nat Commun* (2020) 11:1–10. 2020.

PENNY, Graeme D.; KAY, Graham F.; SHEARDOWN, Steven A.; RASTAN, Sohaila; BROCKDORFF, Neil. **Requirement for Xist in X Chromosome Inactivation.** *Nature* (1996) 379:131–7. 1996.

POMA, Anna; CESARE, Patrizia; BONFIGLI, Antonella; VOLPE, Anna Rita; COLARINA, Sabrina; VECCHIOTTI, Giulia; FORGIONE, Alfonso; ZARIVI, Osvaldo. **A qPCR-duplex assay for sex determination in ancient DNA.** *PLoS One.* 2022.

PREMI, Sanjay; SRIVASTAVA, Jyoti; CHANDY, Sebastin Pandinjarel; AHMAD, Jamal; ALI, Sher. **Tandem duplication and copy number polymorphism of the SRY gene in patients with sex chromosome anomalies and males exposed to natural background radiation.** *Mol Human Reprod*12: 113–121. 2006.

PREMI, Sanjay; SRIVASTAVA, Jyoti; PANNEER, Ganesan; ALI, Sher. **Startling mosaicism of theY-chromosome and tandem duplication of the SRY and DAZ genes in patients with Turner syndrome.** *PLoS One*3: e3796, 2008.

PUELLES, Victor G.; LUTGEHETMANN, Mrc; LINDENMEYER, Maja T.; SPERHAK, Jan P.; WONG, Milagros N.; ALLWEISS, Lena; CHILLA, Silvia; HEINEMANN, Axel; WANNER, Nicola; LIU, Shuya; BRAUN, Fabian; LU, Shun; PFEFFERLE, Susanne; SCHRODER, Ann S.; EDLER, Carolin; GROSS, Oliver; GLATZEL, Markus; WICHMANN, Dominic; WIECH, Thorsten; KLUGE, Stefan; PUESCHEL, Klaus; AEPFELBACHER, Martin; HUBER, Tobias B. **Multiorgan and renal tropism of SARS-CoV-2.** *N. Engl. J. Med.* 2020;383:590–592. 2020.

REIS, Augusto B.; ARAÚJO, Fabiano C.; PEREIRA, Virginia M.; DOS REIS, Adelina M.; SANTOS, Robson A.; REIS, Fernando M. **Angiotensin (1–7) and its receptor Mas are expressed in the human testis: implications for male infertility.** *Journal of Molecular Histology*, 41(1), 75–80. 2010.

RIVES, Nathalie; MILAZZO, Jean Pierre; MIRAUX, Ludivine; NORTH, Marie-Odile; SIBERT, Louis; MACÉ, Bertrand. **From spermatocytes to spermatozoa in an infertile XYY male.** *International Journal of Andrology*, 28(5), 304–310. 2005.

ROTTGER, Susanne; YEN, Pauline H.; SCHEMPP, Werner. **A fiber-FISH contig spanning the non-recombining region of the human Y chromosome.** *Chromosome research : an international journal on the molecular, supramolecular and evolutionary aspects of chromosome biology. Chromosome Research* 10,621–635. 2002.

ROZEN, Steve; SKALETISKY, Helen; MARSZALEK, Janet D.; MINX, Patrick J.; CORDUM, Holland S.; WATERSTON, Robert H.; WILSON, Richard K.; PAGE, David C. **Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes.** *Nature* 423:873–876. 2003.

SHAO, Xin; LV, Ning; LIAO, Jie; LONG, Jinbo; XUE, Rui; AI, Ni; XU, Donghang; FAN, Xiaohui. **Copy number variation is highly correlated with differential gene expression: a pan-cancer study.** *BMC Med Genet*. 2019.

SHASTRI, Aditi; WHEAT, Justin; AGRAWAL, Sachee; CHATERJEE, Nirjhar; PRADHAN, Kith; GOLDFINGER, Mendel; KORNBLUM, Noah; STEIDL, Ulrich; VERMA, Amit; SHASTRI, Jayanthi. **Delayed clearance of SARS-CoV2 in male compared to female patients: High ACE2 expression in testes suggests possible existence of gender-specific viral reservoirs.** *medRxiv*. 2020.

SKALETISKY, Helen; KURODA-KAWAGUCHI, Tomoko; MINX, Patrick J; CORDUM, Holland S.; HILLIER, LaDeana; BROWN, Laura G.; REPPING, Sjoerd; PYNTIKOVA, Tatyana; ALI, Johar; BIERI, Tamberlyn; CHINWALLA, Asif; DELEHAUNTY, Andrew; DELEHAUNTY, Kim; DU, Hui; FEWELL, Ginger; FULTON, Lucinda; FULTON, Robert; GRAVES, Tina; HOU, Shun-Fang; LATRIELLE, Philip; PAGE, David C. **The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes.** *Nature*, 423(6942), 825–837. 2003.

SPOONER, Jesse; LEE, Linda; KINAHAN, John; METCALFE, Michael; HOAG, Nathan. **Male genitalia injuries: Unspoken collateral damage from the COVID-19 pandemic.** *Can Urol Assoc J*. 2020;14(7):E294–96. 2020.

TAKAHASHI, Takehiro; ELLINGSON, Mallory K.; WONG, Patrick; ISRAELOW, Benjamin; LUCAS, Carolina; KLEIN, Jon; SILVA, Julio; MAO, Tianyang; OH, Ji Eun; TOKUYAMA, Maria; LU, Peiwen; VENKATARAMAN, Arvind; PARK, Annsea; LIU, Feimei; MEIR, Amit; SUN, Jonathan; WANG, Eric Y.; CASANOVAS-MASSANA, Arnau; WYLLIE, Anne L.; VOGELS, Chantal B. F.; EARNEST, Rebecca; LAPIDUS, Sarah; OTT, Isabel M.; MOORE, Adam J.; Yale IMPACT Research Team; SHAW, Albert; FOURNIER, John B.; ODIO, Camila D.; FARHADIAN, Shelli; CRUZ, Charles Dela; GRUBAUGH, Nathan D.; SCHULZ, Wade L.; RING, Aaron M.; KO, Albert I.; OMER, Saad B.; IWASAKI, Akiko. **Sex differences in immune responses that underlie COVID-19 disease outcomes.** *Nature*. 588:315–320. 2020

TARTOF, Sara Y.; QIAN, Lei; HONG, Vennis; WEI, Rong; NADJAFI, Ron F.; FISCHER, Heidi; LI, Zhuoxin; SHAW, Sally F.; CAPAROSA, Susan L.; NAU, Claudia L.; SAXENA, Tanmai; RIEG, Gunter K.; ACKERSON, Bradley K.; SHARP, Adam L.; SKARBINSKI, Jacek; NAIK, Tej K.; MURALI, Sameer B. **Obesity and mortality among patients diagnosed with COVID-19: Results from an integrated health care organization.** *Annals of Internal Medicine.* 173:773–781. 2020.

TRYPSTEEN, Wim; CLEEMPUT, Jolien Van; SNIPPENBERG, Willem van; GERLO, Sarah; VANDEKERCKHOVE, Lino. **On the whereabouts of SARS-CoV-2 in the human body: a systematic review.** *PLoS Pathog.* 2020;16:e1009037–e1009037. 2020.

TURNER, Monte E.; MARTIN, Carey; MARTINS, Almir S.; DUNMIRE, Jeffrey; FARKAS, Joel; ELY, Daniel L.; MILSTED, Amy. **Genomic and expression analysis of multiple Sry loci from a single Rattus norvegicus Y chromosome.** *BMC Genet* 8:11, 2007.

WALLS, Alexandra C.; PARK, Young-Jun; TORTORICI, M. Alejandra; WALL, Abigail; MCGUIRE, Andrew T.; VEESLER, David. **Structure, function, and antigenicity of the SARS-CoV-2 spike glycoprotein.** *Cell.* 2020;181:281–292.e286. 2020.

WANG, Zhengpin; XU, Xiaojiang. **scRNA-seq Profiling of Human Testes Reveals the Presence of the ACE2 Receptor, A Target for SARS-CoV-2 Infection in Spermatogonia, Leydig and Sertoli Cells.** *Cells.* 2020;9[4]. 2020.

WHO - World Health Organization. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard.** Disponível em: <https://covid19.who.int/> Acesso em 11/10/2022.

WU, Ping; DUAN, Fang; LUO, Chunhua; LIU, Qiang; QU, Xingguang; LIANG, Liang; WU, Kaili; **Characteristics of ocular findings of patients with coronavirus disease 2019 (COVID-19) in Hubei Province, China.** *JAMA Ophthalmol.* 2020;138:575–578. 2020.

XU, Yong; PANG, Qiangian. **Repetitive DNA Sequences in the Human Y Chromosome and Male Infertility.** *Front Cell Dev Biol.* 2022.

YANG, Ming; CHEN, Shuo; HUANG, Bo; ZHONG, Jing-Min; SU, Hua; CHEN, Ya-Jun; CAO, Qin; MA, Lin; HE, Jun; LI, Xue-Fei; LI, Xiang; ZHOU, Jun-Jie; Fan, Jun; LUO, Dan-Ju; CHANG, Xiao-Na; ARKUN, Knarik; ZHOU, Ming; NIE, Xiu. **Pathological findings in the testes of COVID-19 patients: Clinical implications.** *Eur Urol Focus.* 2020;6(5):1124–29. 2020.

ZHANG, Jin-jin; DONG, Xiang; CAO, Yi-yuan; YUAN, Ya-Dong; YANG, Yi-Bin; YAN, You-qin; akdis cEZMI A.; GAO, Ya-Dong. **Clinical characteristics of 140 patients**

infected with SARS-CoV-2 in Wuhan, China. *Allergy*. 2020 Jul;75(7):1730-1741. 2020.

ZHANG, Julie S.; YANG-FENG, Teresa L.; MULLER, Ulrich; MOHANDAS, T.K.; DE JONG, Pieter J.; LAU, Yan-Fai Chris. **Molecular isolation and characterization of an expressed gene from the human Y chromosome.** *Hum Mol Genet*. 1992;1:717–26. 1992.

ZHOU, Fei; YU, Ting; DU, Ronghui; FAN, Guohui; LIU, Ying; LIU, Zhibo; XIANG, Jie; WANG, Yeming; SONG, Bin; GU, Xiaoying; GUAN, Lulu; WEI, Yuan; LI, Hui; WU, Xudong; XU, Jiuyang; TU, Shengjin; ZHANG, Yi; CHEN, Hua; CAO, Bin. **Clinical course and risk factors for mortality of adult in patients with COVID-19 in Wuhan, China: a retrospective cohort study.** *Lancet*. 395:1054–1062. 2020.

APÊNDICES

Apêndice A - Tabela com informações quanto aos indivíduos incluídos no trabalho. Qual o grupo referente (COVID ou Não COVID), sua idade, e parâmetros do semen como volume, concentração total de espermatozoides, porcentagem referente à motilidade: progressiva, não progressiva e espermatozóides imóveis e % de células vivas.

			Espermograma						
Indivíduo	Grupo	Idade	Perda de material durante a coleta	Volume (ml)	Concentração total (concentração por mL x volume)	Motilidade progressiva (%)	Motilidade não-progressiva (%)	Imóvel (%)	Vitalidade (%) (vivos)
1	COVID-19	30	NÃO	2,4	108	46	38	16	85
2	COVID-19	29	NÃO	5	145	9	69	22	79
3	COVID-19	18	NÃO	1,9	51,3	20	55	25	86
4	COVID-19	26	NÃO	2,7	270	63	15	22	80
5	COVID-19	30	NÃO	9	261	41	30	29	82
6	COVID-19	33	NÃO	4,1	545,3	35	30	35	84
7	COVID-19	40	NÃO	3,2	377,6	59	24	17	88
8	COVID-19	34	NÃO	4,2	157,5	18	54	20	78
9	COVID-19	36	NÃO	3	253,5	44	23	33	76
10	COVID-19	34	NÃO	3,7	201,65	30	51	19	94
11	COVID-19	42	NÃO	2,4	290,4	47	17	36	68
12	COVID-19	45	NÃO	5,3	121,9	20	40	40	69
13	COVID-19	43	SIM	0,3	3	8	18	74	48
14	COVID-19	42	SIM	2,4	3,6	5	22	73	31
15	COVID-19	44	NÃO	0,5	10	25	31	44	70
16	Não-COVID	25	NÃO	2,6	390	50	31	19	88
17	Não-COVID	25	SIM	1,9	173,85	45	24	31	85
18	Não-COVID	23	NÃO	1,5	87	4	23	73	61
19	Não-COVID	30	NÃO	3,9	222,3	40	44	16	85

20	Não-COVID	28	NÃO	1,9	91,2	26	56	18	93
21	Não-COVID	40	NÃO	3,4	49,3	21	50	29	83
22	Não-COVID	36	NÃO	2,2	165	13	56	31	78
23	Não-COVID	37	NÃO	2,4	295,2	39	29	32	70
24	Não-COVID	40	NÃO	1,3	85,15	45	31	24	86
25	Não-COVID	37	NÃO	3,5	252	5	50	45	79
26	Não-COVID	41	NÃO	4,9	147	38	35	27	93
27	Não-COVID	41	NÃO	5,4	318,6	0	44	56	81
28	Não-COVID	41	NÃO	2,8	210	30	35	35	88
29	Não-COVID	55	NÃO	1,2	11,4	24	51	25	82
30	Não-COVID	44	NÃO	2,2	173,8	50	27	23	84

ANEXOS

Anexo A - Ficha Clínica

FICHA CLÍNICA

Data:

Nome:

Registro HC:

Telefone (opcional):

Data de nascimento:

Idade:

Peso:

Altura:

Tipo sanguíneo (sistema ABO e fator Rh):

☐ A ☐ B ☐ AB ☐ O

☐ Rh+ ☐ Rh-

Diagnóstico de COVID ☐ Sim ☐ Não

Data de início de sintomas:

Data de diagnóstico:

Metodologia: ☐ Teste rápido ☐ RT-PCR ☐ ELISA ☐ Outro:

Classificação clínica da COVID-19:

☐ Assintomático ☐ Leve ☐ Moderada ☐ Grave ☐ Crítica

Atendimento de emergência ☐ Sim ☐ Não

Hospitalização ☐ Sim ☐ Não

Tempo de internação: ☐ sem internação

Permanência hospitalar por mais de 24h ☐ Sim ☐ Não

Ventilação mecânica ☐ Sim ☐ Não

Suporte de oxigênio (oxigenoterapia) ☐ Sim ☐ Não

Local de internação: ☐ Enfermaria ☐ CTI/UTI

Manifestações clínicas:

☐ Ageusia ☐ Anosmia ☐ Cefaleia ☐ Diarreia

☐ Disfagia ☐ Dispneia ☐ Febre ☐ Mialgia ☐ Tosse seca ☐ Tosse produtiva

Outras:

Medicamento utilizado no tratamento COVID-19 ☐ Sim ☐ Não

☐ Antes da infecção ☐ Durante a infecção ☐ Após a infecção Qual:

Sequela pós Covid-19 () Sim () Não Qual:

Vacina SARSCOV-2 (nome comercial/fabricante):

() Covishield (AstraZeneca/Oxford) () CoronaVac (Butantan/Sinovac)

() Comirnaty (PFIZER/BioNTech) () Janssen (Johnson & Johnson) () Outra:

Data 1ª dose: Data 2ª dose:

Data 3ª dose: Qual:

Comorbidades: () Sim () Não

() Diabetes () Obesidade () Hipertensão arterial () Hipercolesterolemia

() Hipertriglicemia

() Doença auto imune (Ex: artrite reumatóide/doença celíaca)

() Doença bacteriana ou viral ou fúngica (Ex: sífilis/hepatite/herpes/candidíase)

Outra:

Dentre os itens abaixo, assinalar apenas os que possui:

Sensação febril ou febre persistente nos últimos 3-5 dias? () Sim () Não

Tabagismo: Atual () Sim () Não.

Pregresso mais de 90 dias () Sim () Não

Etilismo moderado ou alto () Sim () Não

Uso de drogas ilícitas: Atual () Sim () Não.

Pregresso mais de 90 dias () Sim () Não

Doenças genéticas e/ou sindrômicas () Sim () Não Qual:

Câncer () Sim () Não Qual:

Data de finalização do tratamento:

Trauma de testículo nos últimos 5 anos () Sim () Não

Neoplasia de testículo () Sim () Não

Orquite / epididimite / prostatite / uretrite () Sim () Não

Doenças endocrinológicas (em tratamento) () Sim () Não Qual:

Tratamentos com andrógenos atual ou pregresso (últimos 5 anos) () Sim () Não

Uso de medicação () Sim () Não Qual:

Filho(s) () Sim () Não Data(s) de nascimento:

Realiza atividade física? () Sim () Não

Qual:

Frequência: () Diária () Semanal Ocupação profissional:

OBSERVAÇÕES:

**** Classificação do consumo de bebida alcoólica:**

- Baixo – < 1 dose por dia ou <7 doses por semana
- Moderado – de 1 a 3 doses por dia ou de 7 a 21 doses por semana
- Alto – > 3 doses por dia ou > 21 doses por semana

1 drink ou dose = 12 g de álcool 1 dose de uísque = 40 mL

1 dose de cerveja = 330 mL 1 dose de cachaça = 30 mL

1 taça de vinho de 200 mL = 2 doses

Fonte: Voskoboinik A et al. Alcohol and Atrial Fibrillation A Sobering Review. J Am Coll Cardiol 2016.

Classificação Clínica

CASO LEVE: Pacientes assintomáticos, ou oligossintomáticos, que realizaram apenas tratamento domiciliar

CASO SEVERO: Pacientes com necessidade de tratamento hospitalar, intubados ou Não

Classificação da COVID -19:

DOENÇA LEVE: Paciente com síndrome gripal (febre , tosse, dor de garganta, mal estar, cefaleia, mialgia, etc.) sem sintomas respiratórios como falta de ar, dispneia ou anormalidades radiológicas

DOENÇA MODERADA: Paciente com evidência clínica ou radiológica de doença respiratória e Sat O₂ > ou = a 94% em ar ambiente

DOENÇA GRAVE: Paciente com frequência respiratória > 30 irpm , sat O₂ < 94% em ar ambiente (ou, em pacientes com hipóxia crônica, uma redução de 3% do nível de base) Taxa de PaO₂/FiO₂ < 300 mmHg ou opacidade em > 50% do pulmão

DOENÇA CRÍTICA: Paciente com falência respiratória, choque séptico e/ou disfunção de múltiplos órgãos

* Nota técnica GVIMS/GGTES/ANVISA No 07/2020. ORIENTAÇÕES PARA PREVENÇÃO E VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA DAS INFECÇÕES POR SARS-CoV- 2 (COVID-19) DENTRO DOS SERVIÇOS DE SAÚDE – 05/08/2020

Anexo B: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO E PARA GUARDA DE MATERIAL BIOLÓGICO**

Título do estudo: Estudo da influência do SARS-CoV-2 na qualidade espermática e na metilação e hidroximetilação do DNA dos espermatozoides de pacientes previamente diagnosticados com COVID-19

Investigadores principais:

Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis, Dr. Murilo Racy Soares, Daniela Gama de Melo

INFORMAÇÃO AO PACIENTE

Convidamos o senhor a participar do estudo intitulado “Estudo da influência do SARS-CoV-2 na qualidade espermática e na metilação e hidroximetilação do DNA dos espermatozoides de pacientes previamente diagnosticados com COVID-19”. Este estudo tem a finalidade de investigar a informação genética de homens que tiveram COVID-19 ou não.

POR QUE VOCÊ ESTÁ SENDO CONVIDADO A PARTICIPAR?

A COVID-19 pode estar relacionada ao aumento da infertilidade masculina. Ainda não sabemos explicar todas as manifestações clínicas (sintomas) da COVID-19, inclusive, se essa doença provoca ou não alterações nos parâmetros seminais (dos espermatozoides). Acredita-se que a COVID-19 tenha relação com

alterações no funcionamento de genes importantes para a formação de espermatozoides.

OBJETIVO DO ESTUDO

Nesse estudo serão analisadas: a quantidade e a qualidade dos espermatozoides, o DNA do espermatozóide e das células do sangue para medir a porção terminal do DNA (chamada telômero) e padrões epigenéticos, e também será analisada a presença do vírus (chamado de SARS-CoV-2) no sêmen de homens que tiveram COVID-19. O DNA é a central de informações de uma célula, onde todas as características que herdamos de nossos pais estão armazenadas. É como se fosse uma torre de controle, de onde são distribuídas as informações para que cada célula execute sua tarefa. Alterações na estrutura dos genes modificam a forma com que a célula se comporta e essas alterações podem ser denominadas como epigenéticas (conhecidas como metilação e hidroximetilação). Alterações epigenéticas modificam estruturas ligadas ao DNA (quantidade de acessórios que interagem e se ligam ao nosso DNA). A análise do DNA através das ferramentas biotecnológicas pode ajudar a entender as causas da COVID-19 e o comprometimento da qualidade seminal. Esse estudo também pode ajudar na busca de um exame para diagnóstico mais precoce e também auxiliar na compreensão de possíveis alterações que a COVID-19 provoca.

Para este estudo serão incluídos homens cuja causa da infertilidade do casal não seja devido a alterações nos espermatozoides. No grupo de estudo serão convidados a participar homens que foram, previamente ao tratamento, diagnosticados com COVID-19. No grupo controle serão convidados homens que não foram diagnosticados previamente com COVID-19.

O QUE ENVOLVE A SUA PARTICIPAÇÃO?

Todos os voluntários realizarão a coleta de sêmen para a análise da qualidade dos espermatozoides, por meio do espermograma, estudo do DNA (fragmentação do DNA espermático, comprimento dos telômeros e análise epigenética) e da carga viral do vírus que causa a COVID-19. Para realizarmos esta análise, será necessária a coleta de uma amostra de sêmen, após um período de abstinência sexual de um a dois dias. A coleta do material será em uma sala reservada do Laboratório de Andrologia do Centro de Reprodução Humana do HC-FMRP/USP, sem exposição do doador ou qualquer tipo de identificação que o constranja. Os possíveis danos são em relação ao desconforto da coleta do sêmen por masturbação, que será amenizado pelas condições de privacidade do local da coleta. Todos os voluntários também irão coletar uma amostra de 10 ml de sangue para dosagens hormonais e para análise do DNA das células sanguíneas. Os possíveis desconfortos estão relacionados à dor da picada da agulha ou hematoma após a coleta de sangue. Suas amostras de sangue e sêmen serão processadas e armazenadas em freezer à -80°C sob responsabilidade dos pesquisadores, e serão transportadas para o laboratório de pesquisa do HC-FMRP/USP, onde serão processados os exames. Solicitamos também os dados de contato do senhor, para que seja possível encontrá-lo posteriormente. Através dos contatos, garantimos fornecer as informações de seu interesse, além de receber informações sobre eventuais benefícios provenientes deste estudo.

POSSÍVEIS BENEFÍCIOS

Os resultados deste estudo poderão trazer conhecimento adicional para os casos de homens que tiveram COVID-19, no sentido de propiciar um tratamento mais eficaz.

O QUE ACONTECE SE VOCÊ NÃO QUISER PARTICIPAR?

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária. Se você decidir não participar, não haverá penalidade, perda de benefícios ou redução na qualidade dos cuidados médicos. Se forem disponíveis novas informações que possam afetar a sua vontade de continuar nesta pesquisa, você terá conhecimento destas informações.

E SE VOCÊ QUISER SAIR DO ESTUDO APÓS TER ACEITADO PARTICIPAR?

Você pode descontinuar sua participação neste estudo a qualquer momento sem penalidade ou perda dos benefícios que de outra forma você teria direito. Caso você deseje retirar o seu consentimento, favor notificar o investigador, através do número de telefone listado neste termo de consentimento livre e esclarecido. Você tem o direito de se retirar do estudo completamente (isto significa que você não deseja ser contatado por qualquer pessoa do estudo depois da sua retirada). Você será informado de forma oportuna sobre qualquer nova informação relacionada à sua segurança que possa influenciar sua disposição em continuar participando do estudo.

SIGILO E DIVULGAÇÃO DE INFORMAÇÕES PESSOAIS

Você será identificado por um número em toda documentação e avaliação, estando seu nome em segredo absoluto.

Todas as informações coletadas durante este estudo, incluindo o acesso ao seu prontuário médico, dados pessoais, dados de pesquisa (por exemplo, idade, peso, altura, pressão arterial, hábitos e medicamentos em uso), datas de consultas e procedimentos, relatórios médicos e resultados de exames, serão mantidas em sigilo e somente os pesquisadores responsáveis pela pesquisa poderão ter acesso as suas informações.

ARMAZENAMENTO DO MATERIAL BIOLÓGICO – BIORREPOSITÓRIO

As amostras biológicas cedidas para pesquisa serão armazenadas no Biorrepositório identificado como “Estudo da influência do SARS-CoV-2 na qualidade espermática e na metilação e hidroximetilação do DNA dos espermatozoides de pacientes previamente diagnosticados com COVID-19” e tem como objetivo, como o próprio nome diz, armazenar amostras de sangue periférico e de DNA dos voluntários participantes da pesquisa.

Você terá toda garantia da possibilidade de acesso gratuito aos resultados obtidos com a utilização do seu material biológico (Resolução CNS nº 441 de 2011, item II.b): informações de armazenamento, incluindo as garantias de qualidade da conservação e integridade de seu material biológico; informações genéticas associadas ao seu material biológico humano armazenado; bem como as medidas para garantir a privacidade e a confidencialidade; a designação das pessoas que poderão ter acesso a sua informação genética, em caso de óbito ou condição incapacitante (Portaria MS 2201 de 2011, artigo 8).

Todos os resultados de exames somente serão acessíveis aos pesquisadores responsáveis pela pesquisa e não será permitido o acesso a terceiros (Resolução nº 340 item V.1.f).

Com a finalização do estudo, o material biológico continuará sendo armazenado no prazo máximo de dez anos para qualquer necessidade de replicação dos resultados. Após este período, o material será devidamente descartado de forma sigilosa.

REGISTRO DO ESTUDO PESQUISA

A pesquisa não será registrada.

CUSTOS E REMUNERAÇÃO

As amostras para o estudo serão coletadas no mesmo dia da consulta médica presencial, portanto não haverá necessidade da sua vinda ao laboratório apenas para a coleta de material de pesquisa, e está garantida ao participante da pesquisa e seu acompanhante o ressarcimento de eventuais despesas decorrentes da participação no estudo nos dias em que for necessária sua presença, conforme previsto na Resolução CNS nº 466 de 2012, itens II.21 e IV.3.g. Caso o voluntário da pesquisa sinta-se lesado de alguma forma, pode recorrer aos dispositivos legais para eventuais indenizações, lembrando-se que não haverá quebra de sigilo e que os espermatozoides ou sangue coletados não serão utilizados de forma alguma para qualquer outro tipo de procedimento que não fora proposto por esta pesquisa.

NO CASO DE DANO RELACIONADO À PESQUISA

Caso você sofra algum dano como resultado de qualquer atividade da pesquisa, os pesquisadores responsáveis e a própria instituição irão proporcionar assistência imediata, bem como se responsabilizarem pela assistência integral pelo tempo que for necessário no que se refere a complicações e danos decorrentes da pesquisa (Resolução CNS nº 466 de 2012, item V.6). De forma alguma, o presente termo renuncia os direitos legais do participante ou isenta o investigador, a instituição, o patrocinador ou seus representantes das responsabilidades legais caso haja algum dano.

CONTATO PARA MAIS INFORMAÇÕES

Os pesquisadores estarão disponíveis para responder a quaisquer perguntas que você possa ter em relação as tratativas descritas ou os procedimentos do estudo. Se você tiver alguma dúvida sobre esta pesquisa, você pode entrar em contato com a Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis no Centro de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto-USP – Fone: (16) 3602-2926, Dr. Murilo Racy Soares (16) 98819-1259 – murilors@usp.br ou Daniela Gama de Melo (16)98112-2249.

Se você tem alguma dúvida sobre seus direitos como um participante de pesquisa, entre em contato com o médico do estudo ou o seu médico de confiança. Caso você quiser falar com alguém não diretamente envolvido neste estudo sobre os seus direitos, preocupações, você pode se comunicar com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo no Campus Universitário, S/N, Monte Alegre, Prédio Central, Subsolo - 14048-900 – Ribeirão Preto/SP, em (16) 3602 2228 com horário de funcionamento de Segunda a Sexta-feira das 08hrs00min às 17hrs00min.

Você também poderá entrar em contato, caso se sentir coagido para aceitar ou continuar a participar da pesquisa.

CONSENTIMENTO

Ao assinar e datar este formulário, você irá confirmar que foi suficientemente informado sobre a natureza, a finalidade, a duração e os riscos deste estudo. Confirma também que foi capaz de discutir dúvidas em detalhes com o pesquisador, e que estas, foram completamente e satisfatoriamente respondidas.

Você receberá uma via assinada deste formulário e a outra via ficará com o pesquisador.

O Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) é um colegiado interdisciplinar e independente, que existe nas instituições que realizam pesquisas envolvendo seres humanos no Brasil, criado para defender os interesses dos sujeitos da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos (Normas e Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos - Resolução do Conselho Nacional de Saúde (CNS), nº 466 de 2012).

Nome do Participante

Assinatura

Data e horário

Nome do Pesquisador

Assinatura

Data e horário

Nome da Testemunha (se necessário)

Assinatura

Data e horário

Anexo C – Aprovação Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Análise do comprimento do DNA telomérico de espermatozóides em pacientes com história prévia de COVID-19

Pesquisador: Murilo Racy Soares

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa na área da genética da reprodução humana (reprogenética));(Trata-se de pesquisa na qual esteja prevista a dissociação irreversível dos dados dos participantes da pesquisa);

Versão: 2

CAAE: 46294121.4.0000.5440

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.703.281

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de pesquisa a ser realizado nessa instituição, tendo como investigador principal, o Dr Murilo Racy Soares. Estão listados como co-investigadores: Dr. Roberto Marins de Carvalho, Profa.Dra.Rosana Maria dos Reis, Prof.Dr.Rui Alberto Ferriani, Prof.Dr.Rodrigo do Tocantins Calado De Saloma Rodrigues, Profa. Dra. Maria Celia Mendes e Profa. Dra.Cristiana Libardi Miranda Furtado.

Introdução:

O papel do SARS-CoV-2, o vírus causador da COVID-19, na função testicular ainda é desconhecido, porém diversos estudos têm mostrado que a infecção por diferentes microrganismos pode resultar em aumento do índice de fragmentação do DNA e alterações no comprimento do DNA telomérico em espermatozoides. ACE2 e TMPRSS2 são moléculas centrais de entrada e que permitem a infecção celular por SARS-CoV-2. Os dados sobre a distribuição de ACE2 nos tecidos humanos são conflitantes, porém análises do sistema gênito-urinário masculino têm demonstrado expressão consistente de ACE2 nos túbulos proximais renais, nos gametócitos, nos túbulos seminíferos e células intersticiais dos testículos. Também foi detectada associação inversa entre os níveis do receptor ACE2 e a espermatogênese, revelando um possível mecanismo de como o SARS-CoV-2 pode causar infertilidade. A fragmentação do DNA em espermatozoides é principalmente resultado da apoptose e do excesso de espécies reativas de oxigênio, que está associada a diferentes etiologias, incluindo uso de drogas, tabagismo, temperatura testicular elevada e infecções. O comprimento dos telômeros é um marcador de dano ao DNA, considerado um biomarcador para o envelhecimento biológico, e que também tem sido relacionado à reprodução humana, desenvolvimento embrionário, formação de células gaméticas, fatores ambientais, estresse oxidativo, doenças cardiovasculares, diabetes e câncer. Portanto, evidências sugerem que a infecção por SARS-CoV-2 em homens pode ocasionar a fragmentação do DNA espermático e pode modificar o comprimento telomérico nas células somáticas e germinativas. O grupo de estudo será constituído por homens com antecedente de infecção por SARS-CoV-2 e o grupo controle será constituído por homens não infectados por SARS-CoV-2.

Casuística e Metodologia:

O grupo de estudo e o grupo controle serão compostos por 42 homens em cada grupo, totalizando 84 voluntários. Serão coletadas amostras de sangue periférico e de espermatozoides, que serão submetidas a exame de espermograma, dosagens de testosterona, LH, FSH, SHBG e sorologias IGM e IGG para COVID-

19. Idade, peso e altura, e histórico de doenças crônicas serão obtidos. A análise da fragmentação do DNA espermático será feita a partir da técnica de dispersão de cromatina por meio de kit específico. Após a extração de DNA das amostras será realizada a análise do comprimento telomérico pelo método quantitativo da reação em cadeia da polimerase.

Metodologia Proposta:

Critérios de Elegibilidade

Critérios para diagnóstico prévio de COVID-19:

Grupo de estudo: comprovação de diagnóstico ou tratamento de COVID-19 ou comprovação de infecção por SARS-CoV-2 em seu histórico médico ou recordatório e que tenham sido curados há no mínimo três meses (CDC, 2020; SIRACUSANO et al., 2020).

Grupo controle: voluntários que não foram infectados por SARS-CoV-2 ou diagnosticados com COVID-19. Serão realizadas sorologias de IGG e IGM durante o ciclo de FIV em todos os voluntários da pesquisa, na tentativa de detectar anticorpos.

Critérios de gravidade da infecção por COVID-19:

Para avaliar a gravidade da infecção por SARS-CoV-2 serão utilizados os critérios descritos na literatura científica (GANDHI et al., 2020; PHILIPS et al., 2020; SINGH et al., 2020) e sujeitos a atualização, conforme descritos na Tabela 1. Tabela 1. Critérios para classificação da COVID-19 de acordo com a gravidade:.

Assintomático ou pré-sintomático: Teste SARS-CoV-2 positivo; sem sintomas.

Doença Leve: Sintomas leves (por exemplo, febre, tosse ou mudança no sabor ou cheiro); sem dispnéia. Doença moderada: Evidência clínica ou radiográfica de doença do trato respiratório inferior; saturação de oxigênio 94%. Doença grave: Saturação de oxigênio <94%; frequência respiratória 30 respirações / min; infiltrados pulmonares > 50%.

Doença grave: Insuficiência respiratória, choque e disfunção ou falha multiórgão. Coleta seminal e espermograma.

A coleta seminal para análise no estudo será realizada no início do ciclo de tratamento para FIV. Antes da coleta, os pacientes serão orientados a ficar de abstinência ejaculatória de dois a cinco dias. A coleta do sêmen será feita em um frasco coletor plástico, estéril, apirogênico e de boca larga, mediante masturbação e é realizada em uma sala privativa e apropriada. Após a coleta será realizado o espermograma de acordo com os protocolos adotados (Björndahl et al.,2015) e com a utilização de materiais estéreis, apirogênicos e descartáveis, e aplicação dos valores de referência indicados pela OMS (WHO, 2010).

Aférese de sangue periférico

A coleta de amostra sanguíneas será realizada no Centro de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da FMRP-USP no início do ciclo de tratamento de FIV. Serão coletados cerca de 5 ml de sangue venoso periférico em tubos estéreis, a vácuo, contendo EDTA para extração do DNA e 4 ml de sangue venoso periférico em tubos estéreis, a vácuo, contendo ativador de coágulo (sílica) e gel separador de soro para dosagens sorológicas hormonais e metabólicas.

Dados clínicos e laboratoriais

Serão avaliados os seguintes dados de cada paciente: idade, peso, altura, IMC, assim como dosagens de testosterona, LH, FSH, SHBG e sorologias IGM e IGG para COVID-19. A testosterona, LH, FSH e SHBG serão dosados pelo método de quimioluminescência através do aparelho Siemens Immulite® 2000 XPI(DiagnosticProducts Corporation Los Angeles, CA, USA®); as sorologias para COVID-19 serão realizadas pela melhor metodologia disponível na época da aprovação deste projeto pelos órgãos competentes.

Análise por biologia molecular

As análises por biologia molecular serão realizadas nas dependências do Laboratório de Biologia da Reprodução do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia - Número 3, localizado no Complexo Multiusuário da FMRP-USP. A

análise da fragmentação do DNA espermático, extração de ácidos nucleicos e análise do comprimento dos telômeros serão realizadas seguindo os protocolos dos fabricantes.

Critério de Inclusão:

Os critérios de inclusão para participação da pesquisa são: homens sem distinção de raça ou classe social, com idade entre 18 e 55 anos, independente se a causa da infertilidade conjugal seja devido a fator masculino, e que concordarem em assinar o TCLE.

O grupo de estudo será composto por homens que apresentem infecção prévia por COVID- 19. O grupo controle será composto por homens que não foram infectados por SARS-CoV-2 ou diagnosticados com COVID-19.

Critério de Exclusão:

Serão excluídos na seleção dos voluntários homens que não possuam quantidade mínima de espermatozoides para a realização das técnicas propostas.

Também serão considerados critérios de exclusão na pesquisa homens que possuírem histórico de tabagismo, uso excessivo de álcool ou consumo de drogas, anomalias genéticas, traumas testiculares, suspeita de infecções urogenitais, câncer, endocrinopatias, ou qualquer tratamento que possa influenciar nas funções testiculares.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Comparar a qualidade seminal, a fragmentação do DNA espermático e o comprimento telomérico do DNA de espermatozoides de homens com infertilidade conjugal que contraíram infecção por SARS-CoV-2 prévio com aqueles que não contraíram.

Objetivo Secundário:

Em homens infectados e não infectados por SARS-CoV-2 com diagnóstico de infertilidade conjugal:

- 1) Avaliar a qualidade espermática;
- 2) Avaliar o índice de fragmentação do DNA espermático;
- 3) Avaliar o comprimento telomérico em células somáticas;
- 4) Avaliar comprimento telomérico em células germinativas;
- 5) Comparar a qualidade espermática, o índice de fragmentação do DNA espermático, o comprimento telomérico em células somáticas e germinativas;
- 6) Comparar os dados clínicos e laboratoriais;
- 7) Associar o grau de severidade da COVID-19 a qualidade espermática, o índice de fragmentação do DNA espermático, o comprimento telomérico em células somáticas e germinativas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não são previstos riscos aos participantes. A doação dos espermatozoides não deve interferir no tratamento e no risco a saúde dos homens.

Os princípios de confiabilidade dos dados que serão obtidos, a manutenção da autonomia dos participantes, o sigilo à identificação pessoal e beneficência/não-maleficência dos propósitos serão respeitados em todas as etapas do estudo.

Benefícios: Não há benefícios diretos para os participantes do estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Desenho:

Trata-se de um estudo observacional, transversal. O grupo de estudo será constituído por homens com antecedente de infecção por SARS-CoV-2 e o grupo controle será constituído por homens não infectados por SARS-CoV-2. Os homens serão recrutados no Ambulatório de Infertilidade Conjugal do Setor de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, do

HCFMRP-USP, independente da causa da infertilidade conjugal, ou seja, na presença ou ausência de fator masculino de infertilidade.

Os critérios de inclusão para participação da pesquisa são: homens sem distinção de raça ou classe social, com idade entre 18 e 55 anos, independente se a causa da infertilidade conjugal seja devido a fator masculino, e que concordarem em assinar o TCLE.

O grupo de estudo será composto por homens que apresentem infecção prévia por COVID- 19. O grupo controle será composto por homens que não foram infectados por SARS-CoV-2 ou diagnosticados com COVID-19. Serão excluídos na seleção dos voluntários homens que não possuam quantidade mínima de espermatozoides para a realização das técnicas propostas. Também serão considerados critérios de exclusão na pesquisa homens que possuam histórico de tabagismo, uso excessivo de álcool ou consumo de drogas, anomalias genéticas, traumas testiculares, suspeita de infecções urogenitais, câncer, endocrinopatias, ou qualquer tratamento que possa influenciar nas funções testiculares.

Devido aos critérios de inclusão e exclusão da pesquisa se basearem em dados clínicos e laboratoriais, existirá a necessidade de obtenção desses dados no prontuário dos pacientes.

JUSTIFICATIVA

Como a atividade da telomerase é interrompida na maioria das células adultas, os telômeros estão sujeitos a encurtamento gradual, resultando em um fenômeno conhecido como senescência replicativa. O número de divisões celulares é de fato limitado, conhecido como “o limite Hayflick”, o qual representa um relógio celular que induz a parada permanente do crescimento. Em contraste, diferentemente do que acontece nas células somáticas, a atividade da telomerase nas células germinativas masculinas é desativada posteriormente à espermatogênese. Este evento pode explicar em parte porque os espermatozoides possuem telômeros mais longos por mais tempo do que outros tipos celulares. A alta atividade da telomerase na espermatogônia do tipo

A, reduz-se lentamente até a completa inativação da enzima nos espermatozoides maduros (ROCCA et al., 2019). De maneira geral, fatores de infertilidade masculina como baixa contagem e baixa motilidade de espermatozoides e fragmentação de DNA estão associados a comprimento telomérico mais curto (VASILOPOULOS et al., 2019). Portanto, a crescente evidência do papel dos telômeros e do comprimento dos telômeros na reprodução humana, de fato, expandiu a visão histórica de considerá-los apenas um marcador de envelhecimento. O comprimento dos telômeros possui potencial prognóstico na infertilidade de homens atingidos pela infecção de SARS-CoV-2. Recentemente, artigos científicos do grupo de pesquisa coordenado pela Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis foram publicados envolvendo a análise do comprimento dos telômeros e a fragmentação de DNA em espermatozoides (SANTANA et al., 2019) e a análise do comprimento telomérico e atividade da enzima telomerase em leucócitos, oócitos e células do cumulus (PEDROSO et al., 2020). Ainda, estudos de avaliação de comprimento telomérico em espermatozoides intitulados “Impacto da criopreservação de sêmen humano no comprimento telomérico” e “Comprimento telomérico de espermatozoides de homens com varicocele” estão sendo desenvolvidos, respectivamente, pela aluna de iniciação científica da

FMRP- USP Letícia Breda Busso e pelo aluno de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP Victor César De Paula S. do Nascimento.

Os dados resultantes desta pesquisa poderão ser de extrema importância para a compreensão da etiopatogenia da COVID-19, pois esta pesquisa visa esclarecer se a infecção por SARS-CoV-2 promove alterações nas células somáticas e germinativas em homens, por meio de análise de qualidade seminal, da fragmentação do DNA espermático e do comprimento dos telômeros.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O projeto de pesquisa foi adequadamente apresentado.

Na página frontal do projeto de pesquisa diz-se que o pesquisador é o Dr. Roberto Marins de Carvalho, porém em outros documentos como a Folha de Rosto e o documento Informações Básicas do Projeto consta como investigador principal o Dr. Murilo Racy Soares.

Os pesquisadores precisam esclarecer essa questão. PENDÊNCIA ATENDIDA.

Na Folha de Rosto a anuência da instituição proponente foi dada pelo Professor Doutor Rui Ferriani que é um dos co-investigadores do projeto, portanto, configurando-se conflito de interesse. Desse modo, a anuência da instituição deve ser dada por outra pessoa que não faça parte da equipe da pesquisa. PENDÊNCIA ATENDIDA.

Foram apresentados o cronograma e orçamento do estudo. Diz-se que os pesquisadores solicitarão auxílio financeiro para o desenvolvimento do projeto junto aos Órgãos de Fomento.

Solicita-se a criação de biorrepositório vinculado a esse estudo. Essa informação é dada de forma adequada no termo de consentimento livre e esclarecido.

O termo de consentimento livre e esclarecido está escrito em linguagem acessível, contendo as informações pertinentes, contemplando, dessa forma as exigências da Resolução 466/12.

Recomendações: Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa Versão 2 (07/05/2021), assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 1 (12/04/2021), podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1728875.pdf	07/05/202 116:15:25		Aceito
Projeto Detalhado /Brochura Investigador	Projeto_Versao2.pdf	07/05/202 116:14:10	Murilo Racy Soares	Aceito
Outros	Carta_Resposta.pdf	05/05/202 21:26:06	Murilo Racy Soares	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	05/05/202 121:25:10	Murilo Racy Soares	Aceito
Outros	Aprovacao_Depto_GO.pdf	28/04/202 115:02:53	Murilo Racy Soares	Aceito

Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	BIORREPOSITORIO.pdf	28/04/202 114:59:08	Murilo Racy Soares	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	28/04/202 114:57:48	Murilo Racy Soares	Aceito
TCLE/ Termos de Assentimento/Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	12/04/202 118:36:51	Murilo Racy Soares	Aceito
Outros	Aprovacao_UPC_11547.jpg	11/04/202 118:34:18	Murilo Racy Soares	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	11/04/202 118:29:40	Murilo Racy Soares	Aceito

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Sim

RIBEIRAO PRETO, 11 de Maio de 2021

Assinado por:

MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA

(Coordenador(a))

Anexo D - Adendo parecer de aprovação Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Estudo da influência do SARS-CoV-2 na qualidade espermática e na metilação e hidroximetilação do DNA dos espermatozoides de pacientes previamente diagnosticados com COVID-19

Pesquisador: Murilo Racy Soares

Área Temática: Genética Humana:

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

(Trata-se de pesquisa na qual esteja prevista a dissociação irreversível dos dados dos participantes da pesquisa;);

Versão: 3

CAAE: 46294121.4.0000.5440

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SAO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 5.114.454

Apresentação do Projeto:

Trata-se de emenda ao projeto de pesquisa conforme documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1857634_E1.pdf de 11/11/2021.

JUSTIFICATIVA DA EMENDA

Ao Comitê de Ética em Pesquisa de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP Em referência ao projeto intitulado “Análise do comprimento do DNA telomérico de espermatozoides em pacientes com história prévia de COVID-19” (CAAE 46294121.4.0000.5440), solicito a inclusão de novas metodologias de análise por técnicas de biologia molecular descritas no projeto intitulado “Estudo da influência

do SARS-CoV-2 na qualidade espermática e na metilação e hidroximetilação do DNA dos espermatozoides de pacientes previamente diagnosticados com COVID-19”, submetido por meio da Plataforma Brasil ao CEP, na qualidade de adendo ao projeto original. Em adição a metodologia original proposta, que consiste na análise dos parâmetros seminais e análise do DNA telomérico de homens que foram previamente diagnosticados com COVID-19, será incluída a análise de fragmentação do DNA espermático, análise de metilação e hidroximetilação do DNA espermático e a detecção de material genético do vírus SARS-CoV-2 nos voluntários que forem inseridos na pesquisa à partir da aprovação da nova versão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. Devido à natureza de urgência imposta pela pandemia de COVID-19 e a necessidade do avanço do conhecimento científico relacionada a essa nova doença, a introdução de novos parâmetros e de novas metodologias de análise se fazem de suma importância.

Cordialmente, Profa. Dra. Rosana Maria dos Reis Dr. Murilo Racy Soares.

RESUMO DO PROJETO DE PESQUISA:

Introdução: O papel do SARS-CoV-2, o vírus causador da COVID-19, na função testicular ainda é desconhecido, porém diversos estudos têm mostrado que a infecção por diferentes microorganismos pode resultar em aumento do índice de fragmentação do DNA e alterações no comprimento do DNA telomérico em espermatozoides. ACE2 e TMPRSS2 são moléculas centrais de entrada e que permitem a infecção celular por SARS-CoV-2. Os dados sobre a distribuição de ACE2 nos tecidos humanos são conflitantes, porém análises do sistema gênito-urinário masculino tem demonstrado expressão consistente de ACE2 nos túbulos proximais renais, nos gametócitos, nos túbulos seminíferos e células intersticiais dos testículos. Também foi detectada associação inversa entre os níveis do receptor ACE2 e a espermatogênese, revelando um possível mecanismo de como o SARS-CoV-2 pode causar infertilidade. A fragmentação do DNA em espermatozoides é principalmente resultado da apoptose e do excesso de espécies reativas de oxigênio, que está associada a diferentes etiologias, incluindo uso de drogas, tabagismo, temperatura testicular elevada e infecções. O comprimento dos telômeros é um marcador de dano ao DNA, considerado um biomarcador para o envelhecimento biológico, e que também têm sido relacionado à reprodução humana, desenvolvimento embrionário, formação de células gaméticas, fatores ambientais, estresse oxidativo, doenças cardiovasculares, diabetes e câncer.

Portanto, evidências sugerem que a infecção por SARS-CoV-2 em homens pode ocasionar a fragmentação do DNA espermático e pode modificar o comprimento telomérico nas células somáticas e germinativas. Objetivo: Comparar a qualidade seminal, a fragmentação do DNA espermático e o comprimento telomérico do DNA de espermatozoides de homens com infertilidade conjugal que contraíram infecção por SARS-CoV-2 prévio com aqueles que não contraíram. Desenho do estudo: Trata-se de um estudo observacional, transversal. O grupo de estudo será constituído por homens com antecedente de infecção por SARS-CoV-2 e o grupo controle será constituído por homens não infectados por SARS-CoV-2. Casuística e Metodologia: O grupo de estudo e o grupo controle serão compostos por 42 homens em cada grupo, totalizando 84 voluntários. Serão coletadas amostras de sangue periférico e de espermatozoides, que serão submetidas a exame de espermograma, dosagens de testosterona, LH, FSH, SHBG e sorologias IGM e IGG para COVID-19. Idade, peso e altura, e histórico de doenças crônicas serão obtidos. A análise da fragmentação do DNA espermático será feita a partir da técnica de dispersão de cromatina por meio de kit específico. Após a extração de DNA das amostras será realizada a análise do comprimento telomérico pelo método quantitativo da reação em cadeia da polimerase.

Resumo:

Introdução: O papel do SARS-CoV-2, o vírus causador da COVID-19, na função testicular ainda é desconhecido, porém diversos estudos têm mostrado que a infecção por diferentes microorganismos pode resultar em aumento do índice de fragmentação do DNA e alterações no comprimento do DNA telomérico em espermatozoides. ACE2 e TMPRSS2 são moléculas centrais de entrada e que permitem a infecção celular por SARS-CoV-2. Os dados sobre a distribuição de ACE2 nos tecidos humanos são conflitantes, porém análises do sistema genito-urinário masculino tem demonstrado expressão consistente de ACE2 nos túbulos proximais renais, nos gametócitos, nos túbulos seminíferos e células intersticiais dos testículos. Também foi detectada associação inversa entre os níveis do receptor ACE2 e a espermatogênese, revelando um possível mecanismo de como o SARS-CoV-2 pode causar infertilidade. A fragmentação do DNA em espermatozoides é principalmente resultado da apoptose e do excesso de espécies reativas de oxigênio, que está associada a diferentes etiologias, incluindo uso de drogas, tabagismo, temperatura testicular elevada e infecções. O comprimento dos

telômeros é um marcador de dano ao DNA, considerado um biomarcador para o envelhecimento biológico, e que também têm sido relacionado à reprodução humana, desenvolvimento embrionário, formação de células gaméticas, fatores ambientais, estresse oxidativo, doenças cardiovasculares, diabetes e câncer. Portanto, evidências sugerem que a infecção por SARS-CoV-2 em homens pode ocasionar a fragmentação do DNA espermático e pode modificar o comprimento telomérico nas células somáticas e germinativas. **Objetivo:** Comparar a qualidade seminal, a fragmentação do DNA espermático e o comprimento telomérico do DNA de espermatozoides de homens com infertilidade conjugal que contraíram infecção por SARS-CoV-2 prévio com aqueles que não contraíram.

Desenho do estudo: Trata-se de um estudo observacional, transversal. O grupo de estudo será constituído por homens com antecedente de infecção por SARS-CoV-2 e o grupo controle será constituído por homens não infectados por SARS-CoV-2. **Casuística e Metodologia:** O grupo de estudo e o grupo controle serão compostos por 42 homens em cada grupo, totalizando 84 voluntários. Serão coletadas amostras de sangue periférico e de espermatozoides, que serão submetidas a exame de espermograma, dosagens de testosterona, LH, FSH, SHBG e sorologias IGM e IGG para COVID-19. Idade, peso e altura, e histórico de doenças crônicas serão obtidos. A análise da fragmentação do DNA espermático será feita a partir da técnica de dispersão de cromatina por meio de kit específico. Após a extração de DNA das amostras será realizada a análise do comprimento telomérico pelo método quantitativo da reação em cadeia da polimerase.

Objetivo da Pesquisa:

Conforme documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1857634_E1.pdf de 11/11/2021.

Objetivo Primário:

Comparar a qualidade seminal, a metilação e a hidroximetilação do DNA de espermatozoides e a metilação e a hidroximetilação do DNA de células somáticas de homens que contraíram previamente infecção por SARS-CoV-2 com aqueles que não contraíram.

Objetivo Secundário:

Em homens infectados e não infectados previamente por SARS-CoV-2:1) Avaliar a qualidade espermática (análise seminal e fragmentação do DNA); 2) Avaliar a presença do RNA viral no fluido espermático; 3) Avaliar a presença do RNA viral no sangue periférico; 4) Avaliar a metilação do DNA espermático e do DNA somático;5) Avaliar a hidroximetilação do DNA espermático e do DNA somático; 6) Comparar a qualidade espermática com a metilação e hidroximetilação do DNA espermático; 7) Relacionar a presença do vírus nas células somáticas e germinativas com alterações na metilação e hidroximetilação; 8) Relacionar a presença do vírus nas células somáticas e germinativas ao grau de severidade da COVID-19 e tempo desde a detecção da infecção; 9) Comparar os dados clínicos e perfil hormonal; 10) Associar o grau de severidade da COVID-19 ao tempo desde a detecção da infecção, a qualidade espermática, a metilação e hidroximetilação espermática, a metilação e hidroximetilação somática.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Conforme documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1857634_E1.pdf de 11/11/2021.

Riscos:

Não são previstos riscos aos participantes. A doação dos espermatozoides não deve interferir no tratamento e no risco a saúde dos homens. Os princípios de confiabilidade dos dados que serão obtidos, a manutenção da autonomia dos participantes, o sigilo à identificação pessoal e beneficência/não-maleficência dos propósitos serão respeitados em todas as etapas do estudo.

Benefícios:

Não há benefícios diretos para os participantes do estudo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Conforme documento PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1857634_E1.pdf de 11/11/2021. Ao Comitê de Ética em Pesquisa de Ética em Pesquisa do HCFMRP-USP

Em referência ao projeto intitulado “Análise do comprimento do DNA telomérico de espermatozoides em pacientes com história prévia de COVID-19” (CAAE 46294121.4.0000.5440), solicito a inclusão de novas metodologias de

análise por técnicas de biologia molecular descritas no projeto intitulado “Estudo da influência do SARS-CoV-2 na qualidade espermática e na metilação e hidroximetilação do DNA dos espermatozoides de pacientes previamente diagnosticados com COVID-19”, submetido por meio da Plataforma Brasil ao CEP, na qualidade de adendo ao projeto original.

Em adição a metodologia original proposta, que consiste na análise dos parâmetros seminais e análise do DNA telomérico de homens que foram previamente diagnosticados com COVID-19, será incluída a análise de fragmentação do DNA espermático, análise de metilação e hidroximetilação do DNA espermático e a detecção de material genético do vírus SARS-CoV2 nos voluntários que forem inseridos na pesquisa à partir da aprovação da nova versão do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Devido à natureza de urgência imposta pela pandemia de COVID-19 e a necessidade do avanço do conhecimento científico relacionada a essa nova doença, a introdução de novos parâmetros e de novas metodologias de análise se fazem de suma importância.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos da emenda foram devidamente apresentados ao CEP, são eles:

- Projeto_adendo_versao1.pdf;
- Relatorio_de_pesquisa_adendo.pdf;
- Carta_Adendo.pdf;
- TCLE_adendo.pdf.

Recomendações: Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012 e suas complementares, a EMENDA submetida em 11/11/2021, assim como o projeto de pesquisa Versão 1 (11/11/2021) e Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 1 (11/11/2021), podem ser enquadrados na categoria APROVADO. O CEP tomou ciência do Relatório parcial de pesquisa datado em 11/11/2021.

Considerações Finais a critério do CEP:

Emenda ao Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da

pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

O presente projeto, seguiu nesta data para análise da CONEP e só tem o seu início autorizado após a aprovação pela mesma.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1857634_E1.pdf	11/11/2021 16:22:12		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_adendo_versao1.pdf	11/11/2021 16:20:46	Rosana Maria dos Reis	Aceito
Outros	Relatorio_de_pesquisa_adendo.pdf	11/11/2021 14:00:28	Rosana Maria dos Reis	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_Adendo.pdf	11/11/2021 14:00:13	Rosana Maria dos Reis	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_adendo.pdf	11/11/2021 13:56:54	Rosana Maria dos Reis	Aceito

Projeto Detalhado /Brochura Investigador	Projeto_Versao2.pdf	07/05/2021 16:14:10	Murilo Racy Soares	Aceito
Outros	Carta_Resposta.pdf	05/05/2021 21:26:06	Murilo Racy Soares	Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto.pdf	05/05/2021 21:25:10	Murilo Racy Soares	Aceito
Outros	Aprovacao_Depto_GO.pdf	28/04/2021 15:02:53	Murilo Racy Soares	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	BIORREPOSITARIO.pdf	28/04/2021 14:59:08	Murilo Racy Soares	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	28/04/2021 14:57:48	Murilo Racy Soares	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	12/04/2021 18:36:51	Murilo Racy Soares	Aceito
Outros	Aprovacao_UPC_11547.jpeg	11/04/2021 18:34:18	Murilo Racy Soares	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	11/04/2021 18:29:40	Murilo Racy Soares	Aceito

Situação do Parecer: Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP: Sim

RIBEIRAO PRETO, 19 de Novembro de 2021

Assinado por:

MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador(a))