



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA
DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NO GENE RECEPTOR
DE ANDRÓGENO EM HOMENS COM
INFERTILIDADE IDIOPÁTICA**

WYARA ELANNE DE JESUS CASTRO MESQUITA

ORIENTADORA: Profa. Dra. Rosália Santos Amorim Jesuino

GOIÂNIA-GO

2009



UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA

**ANÁLISE DE ALTERAÇÕES NO GENE RECEPTOR
DE ANDRÓGENO EM HOMENS COM
INFERTILIDADE IDIOPÁTICA**

WYARA ELANNE DE JESUS CASTRO MESQUITA

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Goiás, para a obtenção do título de Mestre em Biologia.

Área de concentração: Biologia Molecular e Celular.

ORIENTADORA: Profa. Dr^a. Rosália Santos Amorim Jesuíno.

GOIÂNIA-GO

2009

Aos meus pais, pela amor, amizade, dedicação e incentivo que me foi oferecido hoje e sempre, sendo exemplos de vida para mim. E aos meus queridos Avós, *in memoriam*, que sempre torceram por mim e pelo meu sucesso.

AGRADECIMENTOS

Foram muitos os que me ajudaram durante todo o mestrado e na conclusão desta dissertação.

Meus Sinceros agradecimentos a...

A Deus toda honra e glória, com gratidão e louvor por tudo que tens feito em minha vida, resta-me retribuir à ti.

A professora e orientadora desta dissertação, Rosália Santos Amorim Jesuíno pela confiança e dedicação.

A professora Katia Karina Verolli de Oliveira Moura por ter me possibilitado o ingresso à pesquisa e pelos valiosos ensinamentos e sugestões durante toda minha formação, inclusive no decorrer desta dissertação de mestrado.

Ao programa de Mestrado em Biologia da UFG, em especial a coordenação do curso, pela credibilidade.

A CAPES pelo auxílio concedido, através da bolsa de estudo, durante os dois anos de curso, Mestrado, para que pudesse me dedicar exclusivamente à pesquisa e conclusão do mesmo.

Aos meus colegas de mestrado e laboratório, pela colaboração, companherismo e paciência me ofertados durante os dois anos de Mestrado.

Aos meus amigos e parentes que contribuíram com ricas reflexões e ensinamentos, estando sempre presentes, caminhando comigo, me apoiando e incentivando.

Aos meus pais, pelo amor e dedicação, paciência, auxílio, amizade, incentivo e exemplo que me deram e fizeram de mim o que sou hoje.

"Nosso cérebro é o melhor brinquedo já criado: nele se encontram todos os segredos, inclusive o da felicidade."

Charles Chaplin

RESUMO

A infertilidade masculina idiopática está relacionada a defeitos na espermatogênese normal, devido a causas genéticas. A espermatogênese é um processo dependente de altos níveis de hormônios sexuais masculinos, os andrógenos. E os andrógenos, por sua vez, exercem sua função quando associados ao receptor androgênico (RA), proteína codificada pelo gene *RA*. Mutações no gene *RA* levam a síntese do RA não funcional, o que acarreta em falhas no processo de espermatogênese e consequentemente causam infertilidade masculina. O trabalho teve como principal objetivo verificar a ocorrência ou não de mutação no gene *RA* em pacientes com infertilidade masculina idiopática do Centro de Reprodução Humana do HC-UFG. Foram analisadas 206 amostras de pacientes, sendo 95 normais e 111 alterados para o espermograma. As amostras foram amplificadas para os exons 1, 4, 6, 7 e 8 do gene *RA* e os resultados submetidos às análises estatísticas, teste U, quiquadrado e regressão logística. Foi verificada a existência de relação entre alteração no espermograma e mutação no gene *RA*. A análise da relação entre espermograma e mutação no gene *RA* dos cinco exons avaliados foi significativa somente para os exons 1 e 7. Os pacientes com alteração numérica para o espermograma apresentaram uma frequência maior de mutações no exon 7, os pacientes teratozoospermicos no exon 1 e os astenozoospermicos no exon 7. Os exons 4, 6 e 8 não apresentaram relação estatística significativa para alterações no espermograma. Dentre os resultados referentes aos hábitos sociais, o etilismo mostrou-se significativo para mutações no gene *RA*. A realização desse estudo vem reafirmar a relação entre presença de mutações no gene *RA* como prováveis causas de defeitos na espermatogênese e, consequentemente, infertilidade masculina idiopática, não dependendo exclusivamente do fator gênico, mas da associação entre este fator e o meio ambiente onde o homem está inserido.

Palavra-chave: infertilidade masculina, espermatogênese, síndrome de insensibilidade ao andrógeno (AIS), andrógenos, receptor de andrógeno, gene *RA*.

ABSTRACT

Male idiopathic infertility is related to defects in normal spermatogenesis, due to genetic causes. The spermatogenesis is a dependent process on high levels of male sex hormones, the androgens. The androgen, in turn, perform its function when associated with the androgen receptor (AR), protein encoded by *AR* gene. Mutation in *AR* gene lead to a synthesis of non functional AR, which results in the failure of the process of spermatogenesis and, consequently, causes male infertility. This work has as its main objective the verification of the occurrence of mutation in the *AR* gene in patients with male idiopathic infertility who come from the HC-UFG Human Reproduction Center. Samples were analyzed from 206 patients. The result was that 95 patients were found to be normal while 111 with an altered result for the spermogram. The samples were amplified for exons 1, 4, 6, 7 and 8 of the *AR* gene and the results subjected to statistical analysis, Mann Whitney, logistic regression, and chi tests. The existence of the relationship between defects of sperm and *AR* gene mutation was verified. The analysis of the relationship between the spermogram and the *AR* gene mutation in five evaluated exons was significant only for exons 1 and 7. Patients with numerical unsettled spermogram had a higher frequency of mutations in exon 7, teratozoospermics in exon 1 and exon 7 in astenozoospermics patients. Exons 4, 6 and 8 showed no meaningful statistical relationship in reference to the alteration of the spermogram. Among results related to social custom, alcohol proved to be significant for mutation in the *AR* gene. This study has reaffirmed the relationship between the presence of mutation in *AR* genes as probable causes of defects in spermatogenesis. Consequently, male idiopathic infertility depends not only on the genetic factor, but also on the association between this factor and the environment where man inhabits.

Key words: male infertility, spermatogenesis, androgen insensitivity syndrome (AIS), androgens, androgen receptor, *AR* genes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Espermatogênese: produção de espermatozóides, divisões meióticas.....	20
Figura 2.	Espermatozóide: Esquema mostrando as modificações que a célula sofre até formar o espermatozóide maduro.....	22
Figura 3.	Esquema do espermatozóide, mostrando suas três partes distintas e sua constituição.....	23
Figura 4.	Esquema mostrando a conversão da testosterona.....	24
Figura 5.	Esquema mostrando a estrutura organizacional do receptor de andrógeno (RA).....	26
Figura 6.	Domínios funcionais do gene <i>RA</i>, apresentando os domínios de transativação, interação com co-ativadores, fosforilação, ligação ao DNA, ligação ao andrógeno, e região <i>hinge</i>.....	28
Figura 7.	Esquema mostrando os diferentes receptores nucleares em comparação com o receptor de andrógeno (hAR) e as regiões de similaridade entre eles....	28
Figura 8.	Mecanismo de ação dos andrógenos.....	30
Figura 9.	Representação esquemática da localização dos oligonucleotídeos Exon 1, Exon 4, Exon 6, Exon 7 e Exon 8 no cromossomo X que compreende o gene <i>RA</i>, que codifica três domínios principais.....	44
Figura 10.	Gel de agarose 2% dos produtos de amplificação por PCR dos exons 1, 4, 6, 7 e 8 do gene <i>RA</i>.....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1.	Distribuição dos resultados do espermograma dos pacientes com infertilidade idiopática do Laboratório de Reprodução Humana do HC-UFG.....	42
Tabela 2.	Seqüência dos <i>primers</i> utilizados para amplificação dos exons do gene <i>RA</i> por PCR.....	43
Tabela 3.	Reagentes utilizados para amplificação do DNA para os diferentes exons analisados, exon 1 e 4 e exon 6, 7 e 8 do gene <i>RA</i>	44
Tabela 4.	Descrição das ciclagens utilizadas para amplificação das amostras para o exon 1 e 4, exon 6 e exon 7 e 8 do gene <i>RA</i>	45
Tabela 5.	Comparação entre as médias de idade dos pacientes normais e pacientes alterados.....	47
Tabela 6.	Tabulação dos dados sobre os hábitos sociais dos pacientes, colhidos por meio de questionário.....	47
Tabela 7.	Distribuição da freqüência das análises moleculares dos exons 1, 4, 6, 7 e 8 do gene <i>RA</i> , no espermograma categorizado.....	48
Tabela 8.	Distribuição da freqüência genotípica das amostras dos pacientes do grupo normal e alterado para o espermograma.....	49
Tabela 9.	Distribuição da freqüência das idades dos pacientes que apresentaram alterados para o espermograma associando as análises moleculares dos exons 1, 4, 6, 7 e 8 do gene <i>RA</i>	50
Tabela 10.	Distribuição da freqüência das análises moleculares dos exons 1, 4, 6, 7 e 8 do gene <i>RA</i> no espermograma categorizado.....	52
Tabela 11.	Tabulação comparativa dos hábitos sociais dos pacientes com as análises moleculares dos exons 1, 4, 6, 7 e 8 do gene <i>RA</i>	54

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 1. Freqüência dos resultados categorizados dos espermogramas dos pacientes estudados que se submeteram ao espermograma no Laboratório de Reprodução Humana do HC-UFG de 2006-2007..... 48**

LISTA DE ABREVIATURAS

$\mu\text{g/mL}$	Micrograma por mililitro
AF-1	Domínio de transativação 1
AF-2	Domínio de transativação 2
AF-5	Domínio de transativação 5
AIS	Síndrome de insensibilidade ao andrógeno
Ala474Val	Mutação de substituição, onde a alanina é substituída por uma valina no codon 474
Ala645Asp	Mutação de substituição, onde a alanina é substituída por um aspartato no codon 645
Ala871Gly	Mutação de substituição, onde a alanina é substituída por uma glicina no codon 871
ARE	Elemento de resposta ao andrógeno
Arg607Gln	Mutação de substituição, onde a arginina é substituída por uma glutamina no codon 607
Arg615His	Mutação de substituição, onde a arginina é substituída por uma histidina no codon 615
Arg855His	Mutação de substituição, onde a arginina é substituída por uma histidina no codon 855
Asn233Lys	Mutação de substituição, onde a asparagina é substituída por uma lisina no codon 233
BRCA	<i>Breast cancer</i> (gene supressor de tumor associado ao câncer de mama)
CAG	Sequência de trinucleotídeo (citosina, adenina, guanina)
CAIS	Síndrome de insensibilidade androgênica completa
CONEP	Comissão Nacional de Ética em Pesquisa
DBD	Domínio de ligação ao DNA
DE	Desreguladores endócrinos
DHT	Hormônio sexual, dihidrotestosterona
DNA	Ácido desoxirribonucléico
dNTPs	deoxinucleotídeos trifosfato

<i>Enhancer</i>	Sequência específica do DNA
FIV	Fertilização <i>in vitro</i>
FSH	Hormônio folículo estimulante
Gly589Glu	Mutação de substituição, na qual a glicina é substituída por uma glutamato no codon 589
GGN	Sequência trinucleotídica (guanina, guanina, nucleotídeo (normalmente citosina))
GGT) ₃ GGG(GGT) ₂ (GGC) _n	Sequência nucleotídica
Gln798Glu	Mutação de substituição, no qual o glutamina é substituído por um ácido glutâmico no codon 798
Gly506Asp	Mutação de substituição, no qual a glicina é substituído por um aspartato no codon 506
Gly64Arg	Mutação de substituição, na qual a glicina é substituída por uma arginina no codon 64
GTFs	Fator de transcrição geral
H ₂ O Mili Q	Água pura, deionizada e destilada
His570Arg	Mutação de substituição, na qual a histidina é substituída por uma arginina no codon 570
hAR	Receptor de andrógeno heterogêneo
<i>heat shock</i>	Proteína de choque térmico
hGR	Receptor de glicocorticóides heterogêneo
<i>Hinge</i>	Região de dobradiça do Receptor de andrógeno
His874Tyr	Mutação de substituição, na qual a histidina é substituída por uma tirosina no codon 874
hMR	Receptor de mineralocorticóides heterogênio
hPR	Receptor de progesterona heterogêneo
hRE α	Receptor de estrógeno α heterogêneo
hRE β	Receptor de estrógeno β heterogêneo
Hsp	Proteína de choque térmico (<i>heat shock</i>)
Kb	kilobase
kDa	kilodaltons
LBD	Domínio de ligação ao andrógeno
Leu547Phe	Mutação de substituição, na qual a leucina é substituída por

	uma fenilalanina no codon 547
Leu821Val	Mutação de substituição, na qual a leucina é substituída por uma valina no codon 821
LH	Hormônio luteinizante
Met866Val	Mutação de substituição, na qual a metionina é substituída por uma valina no codon 866
Met886Val	Mutação de substituição, na qual a metionina é substituída por uma valina no codon 886
MAIS	Síndrome de insensibilidade ao andrógeno suave
Met780Ile	Mutação de substituição, na qual a metionina é substituída por uma isoleucina no codon 780
MgCl ₂	Cloreto de magnésio
<i>Missense</i>	Mutação de substituição
mL	Mililitro
mRNAs	ácido ribonucléico mensageiro
n	Número de pacientes
Arg233Lys	Mutação de substituição, na qual a asparagina é substituída por uma lisina
Arg756Ser	Mutação de substituição, na qual a asparagina é substituída por uma serina
nM	Nanomolar
OMS	Organização mundial de saúde
PAIS	Síndrome de insensibilidade ao andrógeno parcial
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
<i>Primer antisense</i>	Pequena sequência nucleotídica utilizada na reação de amplificação, que amplifica no sentido 5'3'
<i>Primer sense</i>	Pequena sequência nucleotídica utilizada na reação de amplificação, que amplifica no sentido inverso 3'5'
Pro390Ser	Mutação de substituição, na qual a prolina é substituída por uma serina no codon 390
Pro817Leu	Mutação de substituição, na qual a prolina é substituída por uma leucina no codon 817

Arg774Cys	Mutação de substituição, na qual a arginina é substituída por uma cisteína no codon 774
Arg774His	Mutação de substituição, na qual a arginina é substituída por uma histidina no codon 774
Arg840Cys	Mutação de substituição, na qual a arginina é substituída por uma cisteína
Arg840His	Mutação de substituição, na qual a arginina é substituída por uma histidina no codon 840
Arg855Cys	Mutação de substituição, na qual a arginina é substituída por uma cisteína no codon 855
Arg855His	Mutação de substituição, na qual a arginina é substituída por uma histidina no codon 855
RA	Proteína receptor de androgeno
<i>RA</i>	Gene que codifica o receptor de andrógeno
Ser759Thr	Mutação de substituição, na qual a serina é substituída por uma treonina no codon 759
SBMA	Atrofia muscular bulbar e espinhal
SLN	Sinal de localização nuclear
SPSS	Pacote estatístico para ciências sociais
SUS	Sistema único de saúde
TAD	Domínio amino-terminal ou de transativação
<i>TAF's</i>	Fatores associados a proteína <i>box</i> TATA
Taq DNA polimerase	Enzima polimerase utilizada para amplificação gênica
<i>TATA</i>	Sequência nucleotídica
<i>TBP</i>	Proteína de ligação <i>box</i> TATA
TGTTCT	Sequência nucleotídica consenso
Tyr571His	Mutação de substituição, na qual a tirosina é substituída por uma histidina no codon 571
U/ μ L	Unidades por microlitros
Val866Met	Mutação de substituição, na qual a valina é substituída por uma metionina no codon 866
VDS	Sistema de vídeo documentação
WHO	<i>World health organization</i>

Xq11-12

μL

χ^2

Braço longo do cromossomo X região 1 banda 1 e 2

Microlitros

Quiquadrado

SUMÁRIO

RESUMO.....	V
ABSTRACT.....	VI
LISTA DE FIGURAS.....	VII
LISTA DE TABELAS E GRÁFICOS.....	VIII
LISTA DE GRÁFICOS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. Aspectos Gerais.....	17
1.2. Espermatogênese.....	19
1.3. Andrógenos (Hormônios Sexuais).....	23
1.4. Receptor de Andrógeno (RA).....	25
1.5. Mutações no gene que codifica para RA.....	30
1.6. Mutação no gene <i>RA</i> e defeitos na espermatogênese que levam à Infertilidade Masculina.....	34
2. JUSTIFICATIVA.....	38
3. OBJETIVO GERAL.....	41
3.1. Objetivos Específicos.....	41
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
4.1. Grupo de Estudo.....	42
4.2. Extração de DNA.....	43
4.3. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.....	43
4.4. Análise Estatística.....	46
5. RESULTADOS.....	47
6. DISCUSSÃO.....	55

7.	CONCLUSÃO.....	65
8.	PERSPECTIVAS.....	66
9.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	67
	ANEXOS.....	75
	Anexo A.....	76
	Anexo B.....	79
	Anexo C.....	80
	Anexo D.....	83

1. INTRODUÇÃO

1.1. Aspectos Gerais

A reprodução é uma das mais importantes funções dos seres vivos e o meio pelo qual ocorre a manutenção de uma espécie (Yong *et al.*, 2003). Nos organismos menos complexos, o processo reprodutivo pode ser realizado pela simples divisão celular. Porém nos animais superiores, como a espécie humana, a reprodução é um fenômeno complexo que envolve várias estruturas, requerendo um perfeito equilíbrio morfológico, funcional e comportamental (Melo *et al.*, 2005).

A infertilidade é definida como a incapacidade de um dos dois cônjuges, em decorrência de causas funcionais ou orgânicas, gerarem gravidez por um período conjugal de no mínimo dois anos, sem o uso de contraceptivos e com vida sexual normal (Thiensen *et al.*, 2002; Dam *et al.*, 2007). Estudos afirmam que o fator masculino está envolvido em 55% dos casos de infertilidade conjugal, sendo responsável por exclusivo por aproximadamente 35% dos casos, e os 20% remanescentes estão associados ao fator feminino. Em alguns casos, não é possível identificar a etiologia desta infertilidade, sendo diagnosticada como infertilidade sem causa aparente ou infertilidade idiopática (Bordin *et al.*, 2005; Telöken *et al.*, 2005).

A literatura revela que mundialmente, mais de 70 milhões de casais sofra de infertilidade, a maioria advinda de países em desenvolvimento (Ombelet *et al.*, 2008). Nos países ocidentais, os casos de infertilidade já se aproximam dos 20% (Vogt, 2004). No entanto, pesquisas afirmam que 4% a 17% dos casais com problemas de infertilidade procuram assistência médica, e apenas 5% destes não conseguem ter filhos (Bordin *et al.*, 2005; Telöken *et al.*, 2005).

Aproximadamente metade dos casos de infertilidade está relacionada à produção inadequada ou defeituosa de espermatozóides, podendo ser causada por uma variedade de desordens, as quais podem ser adquiridas ou herdáveis. As causas genéticas da infertilidade masculina são de interesse especial à biologia reprodutiva, uma vez que estas desordens podem ser passadas à prole caso os indivíduos com algum tipo de infertilidade, escolham se submeter às técnicas reprodutivas, já que por meios naturais não é possível ter filhos (Hiort *et al.*, 2000).

Lesões genéticas que causam infertilidade masculina podem ser agrupadas em três classes: (1) aneuploidias cromossômicas e rearranjos, na qual os genes específicos em um cromossomo aumentam a sua expressão ou a dosagem, alterando seu ambiente genômico normal; (2) microdeleções, onde deleções ou rearranjos de múltiplos genes mapeados em um local molecular mudam seu padrão normal de expressão; (3) um único gene defeituoso, no qual a expressão deste (também chamado de elemento-chave) é alterada ou perdida, provocando infertilidade masculina (Vogt, 2004).

Ainda, segundo Vogt (2004), as aneuploidias ou aberrações estruturais são encontradas em aproximadamente 14% dos homens azoospermicos (ou seja, pacientes com infertilidade, sem espermatozoides no sêmen), e 5% dos homens oligozoospermicos (ou seja, pacientes inférteis com uma grave redução do número de espermatozoides no sêmen).

A qualidade do sêmen está relacionada à espermatogênese normal. A espermatogênese é o processo pelo qual são produzidos os espermatozoides, e resume-se em divisão, diferenciação e meiose de células germinativas imaturas (Balk & Knudsen, 2008). A deficiência neste processo é considerada a causa mais freqüente de infertilidade masculina, correspondendo a aproximadamente 70% dos casos, e pode ter como causa implicações decorrentes de doenças sistêmicas adquiridas tais como: criptorquidismo, alterações endocrinológicas, varicocele, infecções no trato genital e/ou exposição exógena a agentes químicos e físicos (Larriba *et al.*, 2005).

A qualidade da produção de espermatozoides é constatada através de alterações detectadas no espermograma. Este exame analisa o espermatozoide quanto: - ao número de espermatozoides: oligozoospermia (menor que 20 milhões/mL), criptoospermia (menor que 1 milhão/mL), azoospermia (ausência de espermatozoides no ejaculado); - a motilidade: astenoospermia (motilidade anormal/alterada dos espermatozoides); - a morfologia: teratoospermia (morfologia anormal dos espermatozoides) (Dam *et al.*, 2007).

Sendo assim, a infertilidade masculina caracteriza-se pela incapacidade de produzir espermatozoides em número suficiente, com morfologia normal, e adequada motilidade, ou ainda a combinação deste (Angelopoulou *et al.*, 2007). Os eventos celulares que resultam na espermatogênese respondem a altos níveis de hormônios esteróides, hormônios sexuais, os andrógenos (Kang *et al.*, 2003).

Os andrógenos são sintetizados pelas células de Leydig que se encontram nos testículos. Para que o andrógeno desencadeie os eventos celulares, necessários à espermatogênese, é obrigatório a associação deste ao receptor de andrógeno (RA), um membro da superfamília de receptores nucleares. O complexo receptor-andrógeno desloca-se

para o núcleo onde reconhece uma seqüência específica do DNA cromossomal e os elementos responsivos (ARE – *androgen response element*) e recruta co-ativadores que facilitam o início da transcrição de genes regulados por andrógenos. O RA tem a capacidade de induzir a expressão gênica e promover a progressão do ciclo celular (Yong *et al.*, 2003; Balk & Knudsen, 2008).

Estudos revelam que defeitos no gene que codifica para o RA, o gene *RA*, podem resultar no desenvolvimento sexual masculino anormal, visto que os andrógenos são responsáveis por uma ampla gama de desenvolvimentos e respostas fisiológicas que levam além da espermatogênese, à diferenciação sexual masculina, ainda no período fetal e no período pós-fetal, a manutenção puberal. Acredita-se que defeitos mais sutis no gene *RA* sejam a causa de espermatogênese anormal, acarretando o fenótipo de infertilidade masculina (Dohle *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003, Rajender *et al.*, 2007).

1.2. Espermatogênese

O termo espermatogênese refere-se à seqüência inteira de eventos pelos quais células germinativas primitivas, denominadas espermatogônias, e que estão em dormência durante período fetal, são transformadas em espermatozóides (Moore & Persaud, 1995).

O processo de espermatogênese pode ser dividido em três fases principais: a) multiplicação e renovação por mitoses das células germinativas primordiais; b) meiose, que reduz os cromossomos à metade, para dar origem às células haplóides. Inicia com a duplicação e recombinação de material genético dos espermatócitos primários, e continua com uma divisão mitótica dando origem aos espermatócitos secundários, terminando com uma nova divisão para formar espermátides redondas; c) diferenciação e maturação das espermátides, para formar gametas masculinos, processo conhecido como espermiogênese. Todo o processo de espermatogênese é um processo dependente da ação de andrógenos (Figura 1) (Bassas, 2001).

Sendo assim, os hormônios responsáveis pela espermatogênese são produzidos nas células de Leydig, presente no interstício dos testículos. Os testículos são constituídos por dois compartimentos: túbulos seminíferos e tecido intertubular, que constitui o interstício. Os túbulos seminíferos são revestidos por camadas de células germinativas em diferentes estádios de desenvolvimento (espermatogônias, espermatócitos, espermátides e espermatozóides) e sustentam as células de Sertoli. O interstício consiste em um conectivo de tecidos frouxos,

sangue e vasos linfáticos, e vários tipos de células, incluindo as células de Leydig, fibroblastos, macrófagos e leucócitos. As células de Leydig além de serem sintetizadoras de testosterona (hormônio essencial para espermatogênese), são fontes predominantes para outros hormônios esteróides como o estrogênio (O'Donnell *et al.*, 2001; Akingbemi, 2005).

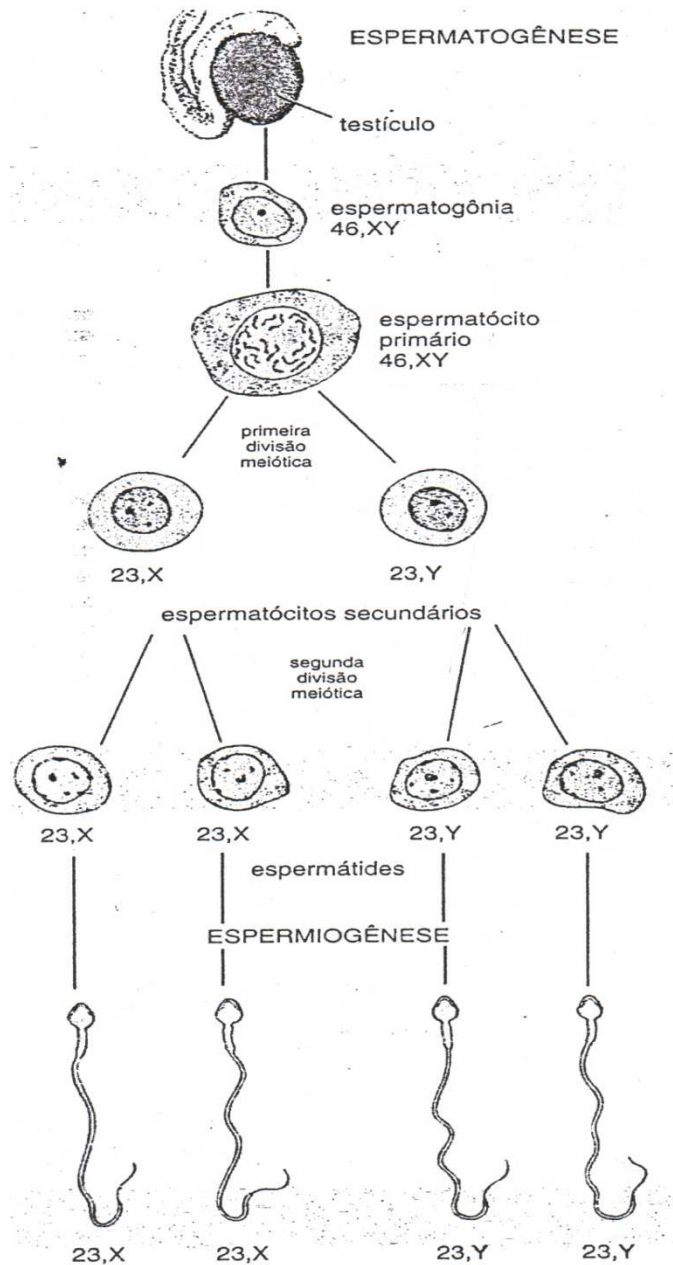


Figura 1. Espermatogênese: produção de espermatozoides, divisões meióticas (Jacob *et al.*, 1990).

As células de Sertoli são células somáticas dos testículos, essenciais para a formação testicular e para a espermatogênese. Estas células facilitam a progressão das células germinativas a espermatozói­de pelo contato direto e por controlar o meio ambiente dentro dos

túbulos seminíferos. A regulação da espermatogênese por hormônio folículo estimulante (FSH – *Follicle Stimulating Hormone*) e por testosterona ocorre pela ação desses hormônios nas células de Sertoli. Enquanto a ação da testosterona é necessária para a espermatogênese, a ação do FSH promove a produção espermatogênica pelo aumento do número de células de Sertoli (Griswold, 1998). Contudo, as células de Sertoli se proliferam apenas nos períodos fetal e pré-puberal. Ao final da segunda semana pós-natal elas iniciam maturação, perdendo sua capacidade proliferativa e de aquisição de funções, o que lhes permite apoiar a espermatogênese (Kim *et al.*, 2007).

A espermatogênese não é um processo rápido, requer muitos dias para se completar e normalmente continua ao longo de toda a vida reprodutiva. As espermatogônias que se encontravam dormentes nos túbulos seminíferos dos testículos desde o desenvolvimento fetal e por toda a infância, começam a aumentar em número na puberdade. Após estas células passarem por várias divisões mitóticas, crescerem e sofrerem alterações graduais elas se transformam em espermatócitos primários. Estes espermatócitos primários sofrem subseqüentes divisões de redução, primeira divisão meiótica, formando dois espermatócitos haplóides secundários. Em seguida, os espermatócitos haplóides secundários passam por uma segunda divisão meiótica, formando quatro espermátides haplóides. As espermátides se diferenciam gradualmente em espermatozóides maduros (Figura 2) (Jacob *et al.*, 1990; Moore & Persaud, 1995).

Portanto, quando o desenvolvimento de células germinativas se completa, as espermátides maduras são liberadas pelas células de Sertoli no lúmen do túbulo, prosseguindo até o sistema de ducto, conhecido como a rede testicular, até que se introduza no epidídimo através dos ductos eferentes. Durante a passagem através do epidídimo as espermátides sofrem uma série de alterações bioquímicas, tornando-se espermatozóides móveis capazes de fertilizar (O'Donnell *et al.*, 2001; Poirrot & Cherruau, 2005).

Os espermatozóides possuem uma topografia única entre as células, sendo conhecidas três grandes peças, facilmente distinguidas: cabeça, peça intermediária e cauda (Figura 3). Os espermatozóides normais exibem uma cabeça oval com um contorno regular contendo um núcleo, onde o material genético se encontra concentrado. A cabeça é coberta pelo acrosoma, abrangendo mais de um terço da superfície. O acrosoma, originário do aparelho de Golgi, contém enzimas digestivas usadas, entre outras coisas, para auxiliar na penetração por investidas circundantes ao óvulo (Jacob *et al.*, 1990). A peça intermediária é fina, reta e regular em esboço, possui menos de um terço da largura da cabeça, e está alinhada ao eixo longitudinal da cabeça. A cauda é delgada, desenrolada e deve apresentar um esboço regular

e, pelo menos, 45 µm de comprimento. A morfologia anormal espermática é classificada com defeitos na cabeça, na peça intermediária ou na cauda do espermatozóide (Sun *et al.*, 2006).

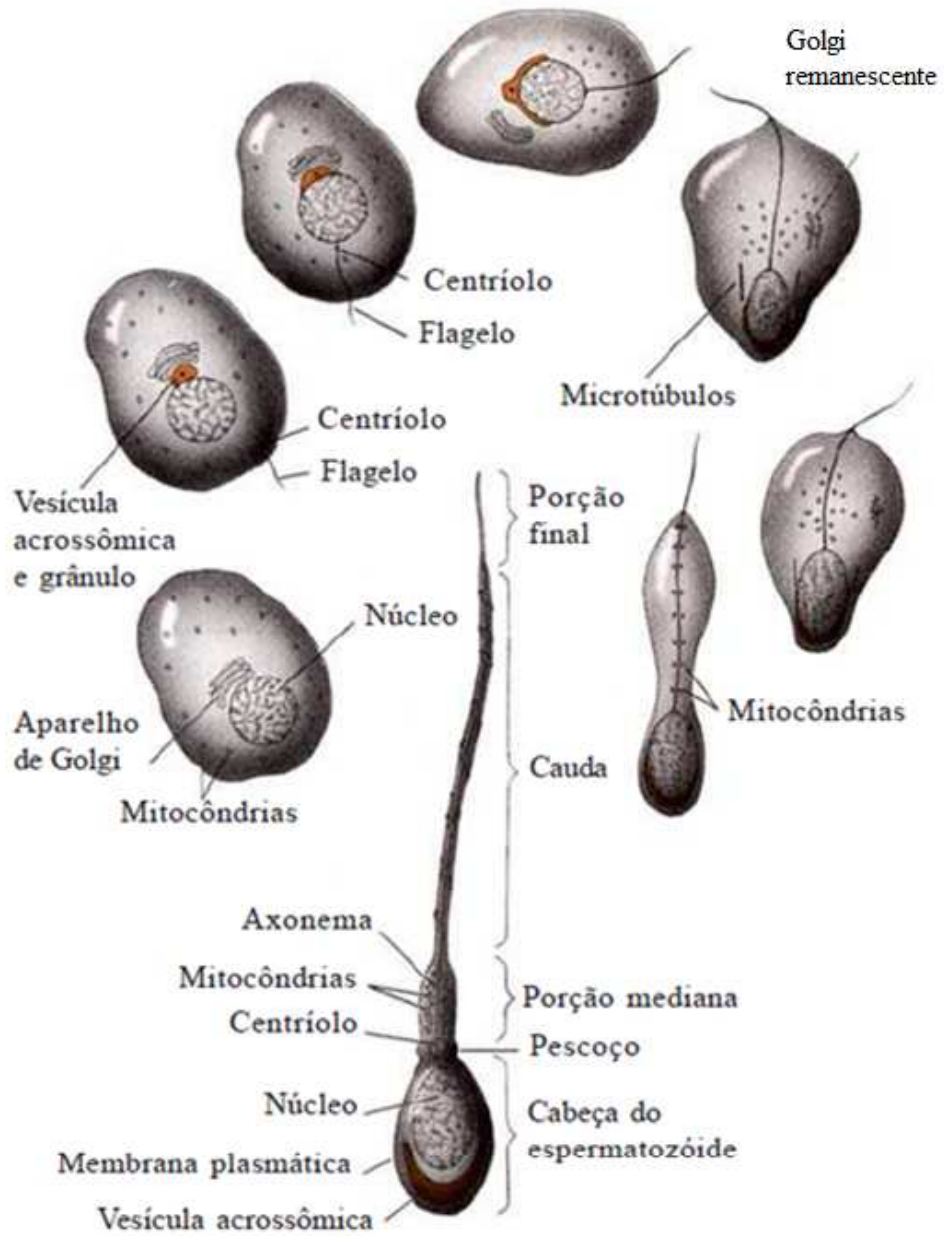


Figura 2. Espermatozóide: Esquema mostrando as modificações que a célula sofre até formar o espermatozóide maduro (Gilbert, 2003).

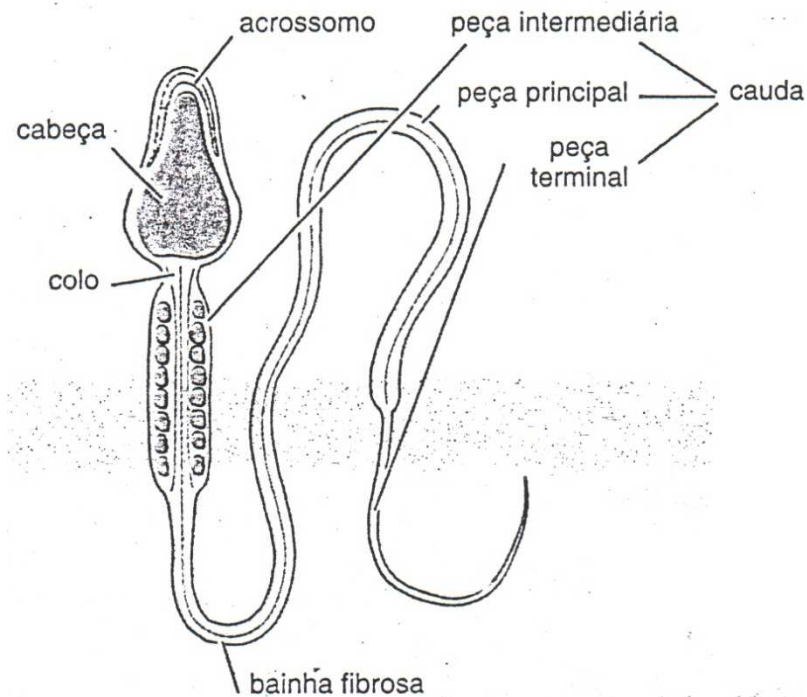


Figura 3. Esquema do espermatozóide, mostrando suas três partes distintas e sua constituição (Moore & Persaud, 1995).

1.3. Andrógenos (Hormônios Sexuais)

A testosterona é o andrógeno mais abundante no soro de indivíduos do sexo masculino, e o testículo é a sua principal fonte de produção. A glândula adrenal produz testosterona, porém em uma pequena quantidade, diretamente ou após a conversão periférica dos hormônios androstenediona e dehidroepiandrosterona, após as ações de enzimas. No epitélio da próstata, as testosteronas são convertidas para andrógenos mais potentes, dihidrotestosterona (DHT), por meio da ação residente de uma enzima, 5α -redutase (Melo *et al.*, 2005; Balk & Knudsen, 2008)

Os andrógenos são sintetizados e secretados na corrente sanguínea. A testosterona e a DHT estão presentes no sangue na concentração 10 a 100 vezes acima do nível necessário para a saturação do RA. Entretanto, aproximadamente 95% destes andrógenos circulam ligados às proteínas, como a albumina ou globulina ligadora de hormônios sexuais que limitam a sua biodisponibilidade. Algumas células responsivas aos andrógenos possuem receptores de membrana para as proteínas carreadoras de andrógeno (Melo *et al.*, 2005).

Os andrógenos têm papel importante no desenvolvimento dos órgãos reprodutores masculinos tais como o epidídimo, os vasos deferentes, a vesícula seminal, a próstata e o pênis. Além disso, os andrógenos são necessários para a puberdade, a fertilidade masculina e a função sexual masculina. Os elevados níveis de testosterona intratesticular, secretadas pelas células de Leydig, são necessários para a espermatogênese. Para exercer suas funções na espermatogênese, os andrógenos são capturados por receptores específicos, o receptor de andrógeno (RA) (Ghadessy *et al.*, 1999; Dohle *et al.*, 2003).

A testosterona e DHT atravessam a membrana da célula por difusão simples. Ao se incorporar nas células alvo e antes que possa exercer sua função específica, a testosterona será metabolizada pela aromatase em estradiol do hipotálamo, onde ocorre a determinação sexual, ou será metabolizada pela 5 α -redutase em DHT, na maioria dos órgãos reprodutivos masculinos (Figura 4). A DHT é cerca de 30 vezes mais potente que a testosterona devido à sua afinidade aumentada pelo RA (Lewin, 2001; Kang *et al.*, 2003; Melo *et al.*, 2005).

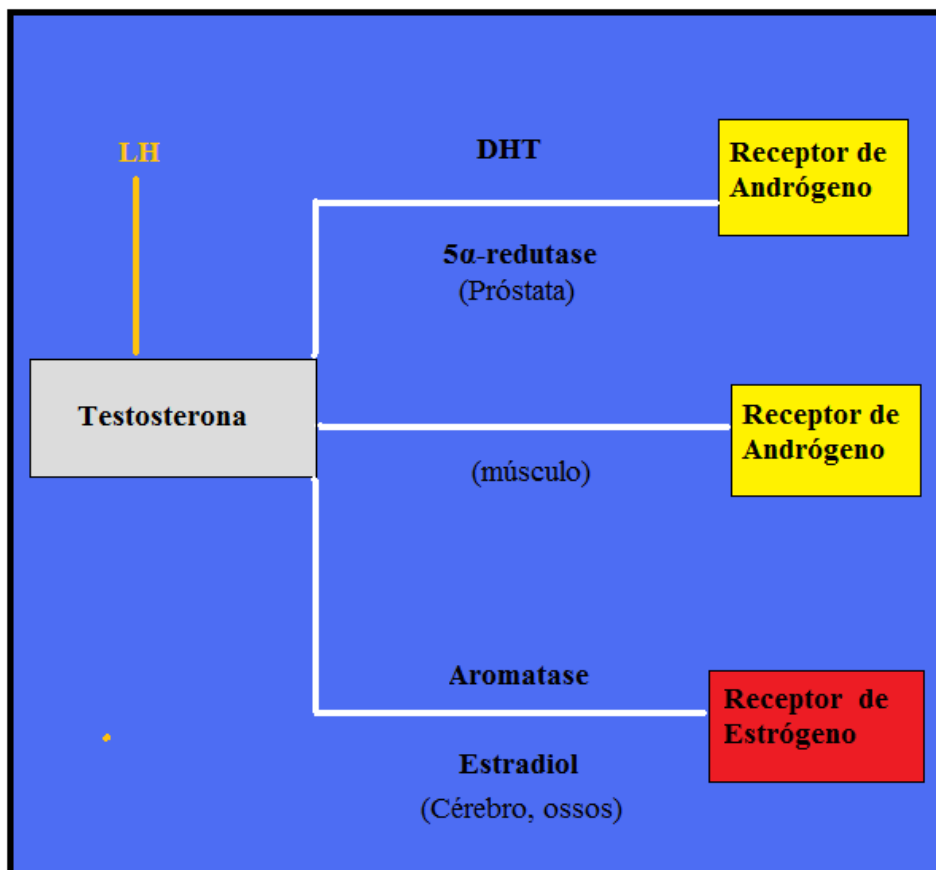


Figura 4. Esquema mostrando a conversão da testosterona. A testosterona pode sofrer a ação da 5 α -redutase e formar a dihidrotestosterona (DHT), ou da aromatase e formar o estradiol.

1.4. Receptor de Andr6geno (RA)

O RA 6 uma prote6na transcricional regulat6ria ativada por ligante que pertence 6 superf6mia de receptores nucleares, membros que incluem os glicocortic6ides, a progesterona, o estr6geno e os receptores de 6cido retin6ico (Ghadessy *et al.*, 1999; Melo *et al.*, 2005). Geralmente s6o mantidos em estado inativo por inibidores e na aus6ncia de seus ligantes (Balk & Knudsen, 2008).

O gene *RA* codifica uma fosfoprote6na, de 910-919 res6duos de amino6cidos, e est6 localizado no bra6o longo do cromossomo X, Xq11-12. O gene *RA* encontra-se em c6pia 6nica no genoma e apresenta extens6es de aproximadamente 90 quilobases (Kb). A regi6o codificante do gene *RA* 6 compreendida de 8 exons separados por 7 introns (Yong *et al.*, 2003; Mooney *et al.*, 2003; Zhu, 2005; Brinkmann, 2006; Singh *et al.* 2006).

Estudos revelam que, por meio de processamento alternativo, o gene *RA* pode codificar uma prote6na de 110 kDa (isoforma B) e outra prote6na de 87 kDa (isoforma A), a qual apresenta perda de parte da regi6o amino-terminal. A isoforma A do RA representa uma forma truncada do receptor, iniciando a tradu6o na metionina 188, assim, faltam 187 amino6cidos, portanto possui uma regi6o N-terminal parcial, em compara6o com o total comprimento da isoforma B do RA. Os mRNAs s6o de 11 Kb e 7 Kb, aproximadamente (Brinkmann, 2006; Barbaro *et al.*, 2007).

O RA 6 compreendido por tr6s dom6nios principais, um dom6nio amino-terminal ou de transativa6o (TAD – *trans activation domain*), um dom6nio de liga6o ao DNA (DBD – *DNA binding domain*), um dom6nio de liga6o ao ligante (LBD – *ligand binding domain*). Apresenta ainda uma regi6o de dobradi6a, *hinge* (Figura 5) (Yong *et al.*, 2003; Mooney *et al.*, 2003; Zhu, 2005; Singh *et al.*, 2006).

O TAD 6 codificado pelo exon 1, compreende quase a metade da mol6cula do RA. 6 constitu6do por 555 res6duos de amino6cidos e est6 envolvido na ativa6o transcricional de genes alvos. O TAD cont6m dois subdom6nios de transativa6o, AF-1 e AF-5. O dom6nio AF-1, independente do ligante, est6 localizado entre os res6duos 101-370, representando um papel essencial nas fun6es do RA atrav6s da intera6o intramolecular e/ou intermolecular com co-reguladores. O AF-5 est6 localizado entre os res6duos 360-485, e 6 necess6rio para transatividade de receptores de andr6genos constitutivamente ativos, que n6o tem o seu LBD (Figura 6) (Heinlein & Chang, 2002; Melo *et al.*, 2005; Zhu, 2005; Silva-Ramos *et al.*, 2006, Brinkmann, 2006; Rajender *et al.*, 2007).

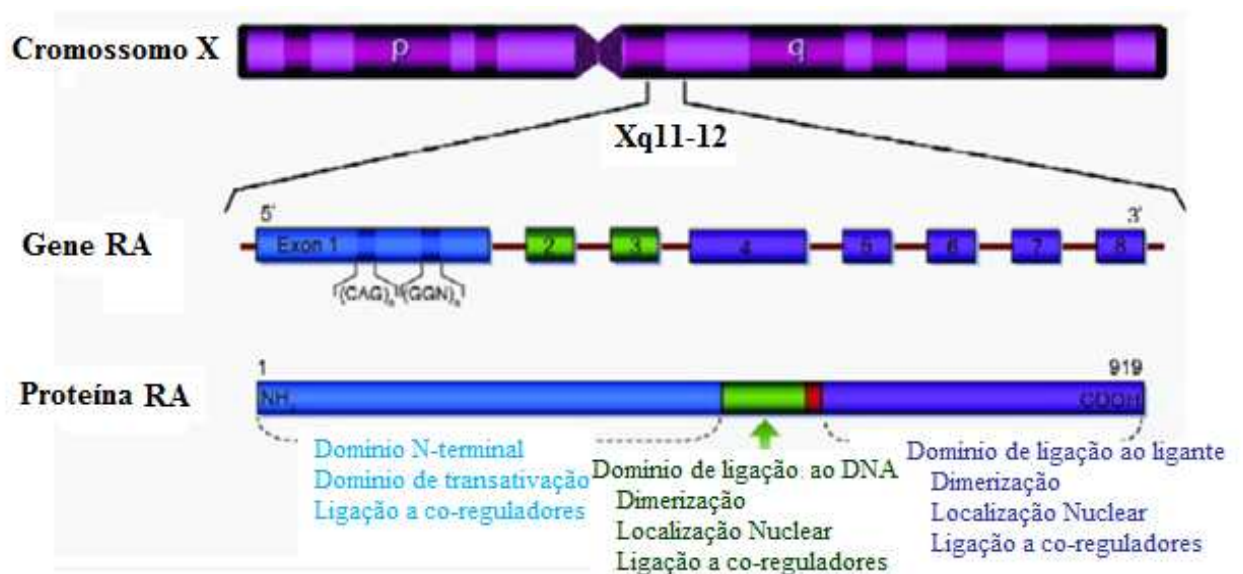


Figura 5. Esquema mostrando a estrutura organizacional do receptor de andrógeno (RA): localização no cromossomo X, gene com os oito exons separado por introns e a proteína com os três principais domínios: Domínio amino-terminal; Domínio de ligação ao DNA e Domínio de ligação ao andrógeno (Rajender *et al.*, 2007).

O exon 1 é composto ainda por dois motivos de repetição polimórficos (CAG e GGN), codificando extensões variáveis de trechos de poliglutamina e poliglicina, respectivamente, no TAD da proteína RA. As duas regiões de repetição são separadas por 248 resíduos de aminoácidos de seqüências não polimórficas. A CAG, uma simples repetição, varia de comprimento de 8 a 35 repetições, aproximadamente, enquanto a GGN, repetição complexa representada pelo $(GGT)_3GGG(GGT)_2(GGC)_n$, varia de comprimento de 10-30 repetições, aproximadamente. Diversos estudos sugerem que a mudança no tamanho das repetições de glutamina/glicina altera a função do RA devido às alterações em sua afinidade obrigatória ao seu ligante, andrógeno, na interação com co-reguladores, na resposta a fosforilação, ou mudanças nas interações interdomínio do RA (Heinlein & Chang, 2002; Heinlein & Chang, 2004; Melo *et al.*, 2005; Zhu, 2005; Silva-Ramos *et al.*, 2006; Brinkmann, 2006; Rajender *et al.*, 2007).

O DBD é codificado pelos exons 2 e 3, e corresponde aos resíduos de aminoácidos 556-623. O DBD contém dois motivos dedos de zinco, que são altamente conservados dentro da família de receptores nucleares, e sua formação envolve 8 resíduos de cisteínas. Os dois dedos de zinco são responsáveis pela interação específica com o DNA cognato do gene alvo,

e interagem com o sulco maior do DNA. Sendo assim, para a interação do RA e do elemento resposta ao andrógeno, o primeiro dedo de zinco (próximo ao domínio N-terminal) é associado à sequência específica de ligação do DNA, enquanto o segundo ajuda a estabilizar o complexo receptor-DNA, quando o sítio de ligação ao DNA está invertido para o elemento resposta. O primeiro e o segundo dedo de zinco são codificados pelos exons 2 e 3, respectivamente (Melo *et al.*, 2005; Zhu, 2005; Silva-Ramos *et al.*, 2006).

A região de dobradiça, *hinge*, é codificada pela porção 5' do exon 4. Esta região contém um sinal de localização nuclear necessário para a translocação do complexo andrógeno-receptor do citoplasma para o seu sítio de ação nuclear (Melo *et al.*, 2005; Zhu, 2005; Silva-Ramos *et al.*, 2006). A região *hinge* exerce ainda a ligação dos domínios LBD e DBD. O RA, em comum com outros receptores esteróides, tem seu sinal de localização nuclear (SLN) bipartido, que depende da ligação do andrógeno, situado entre a região carboxi-terminal do domínio DBD e a região *hinge*, estando localizado entre os aminoácidos 617 e 633 (Heinlein & Chang, 2002).

O LBD é codificado pela porção 3' do exon 4 e pelos exons 5 a 8, constituídos dos resíduos 624-915, aproximadamente. Este domínio interage com o domínio TAD do RA para estabilizar a ligação aos andrógenos; e ainda, é responsável por mediar a interação entre RA com as proteínas *heat shock* (proteínas de choque térmico), o que mantém o RA inativo na ausência do ligante, o andrógeno. A interação entre andrógenos e LBD se dá através de interações hidrofóbicas, e também por pontes de hidrogênio. O LBD contém um subdomínio envolvido na ativação de dimerização e transcrição, AF-2 (Figura 6). Este domínio atua como estabilizador da estrutura do RA e pode interagir com co-reguladores, como os co-ativadores. O domínio AF-2, ao contrário do primeiro domínio de transativação no TAD, AF-1, é dependente do ligante (Heinlein & Chang, 2002; Heinlein & Chang, 2004; Melo *et al.*, 2005; Zhu, 2005; Silva-Ramos *et al.*, 2006).

Embora DBD e LBD sejam muito semelhantes entre os receptores nucleares, o domínio TAD tem pouca similaridade entre os diferentes receptores esteróides (Figura 7) (Bassas, 2001).

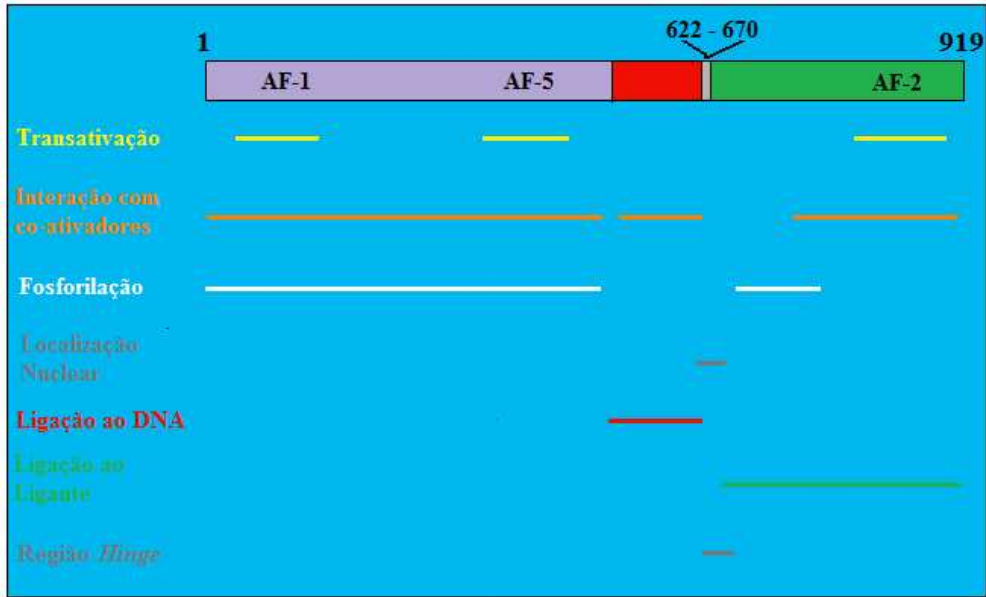


Figura 6. Domínios funcionais do gene *RA*, apresentando os domínios de transativação, interação com co-ativadores, fosforilação, ligação ao DNA, ligação ao andrógeno, e região *hinge* (Brinkmann, 2006). AF-1 – subdomínio de transativação do domínio amino-terminal; AF-5 – subdomínio de transativação do domínio amino-terminal; AF-2 – subdomínio de transativação do domínio de ligação ao andrógeno.

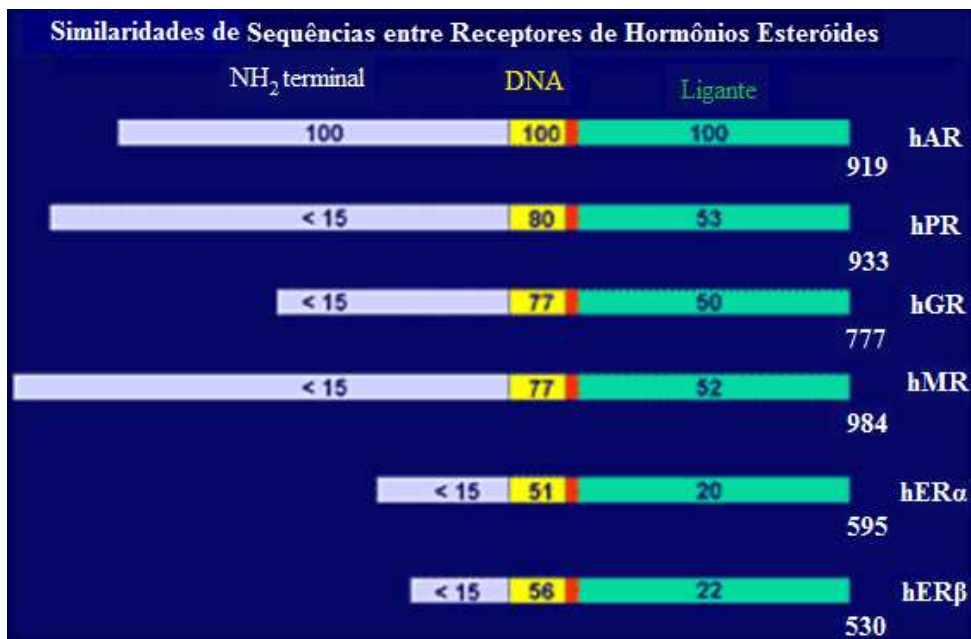


Figura 7. Esquema mostrando os diferentes receptores nucleares em comparação com o receptor de andrógeno (hAR) e as regiões de similaridades entre eles (Brinkmann, 2006). hAR – Receptor de andrógeno heterogêneo; hPR – Receptor de progesterona heterogêneo; hGR – Receptor de glicocorticóides heterogêneo; hMR – Receptor de mineralocorticóides heterogêneo; hER α – Receptor de estrógeno α heterogêneo; hER β – Receptor de estrógeno β heterogêneo.

A ação do RA inicia-se com a ligação do andrógeno ao receptor, o que resulta em uma mudança conformacional da proteína RA, que até então se encontrava inativa devido a uma associação realizada com proteínas de *heat shock*, impedindo a associação do andrógeno. A presença do andrógeno na célula faz com que as proteínas de *heat shock* se desassociem da proteína RA, permitindo que os andrógenos se associem com elevada afinidade ao domínio de ligação (Ghadessy *et al.*, 1999; Yong *et al.*, 2003; Mooney *et al.*, 2003; Melo *et al.*, 2005; Balk & Knudsen, 2008). A mudança conformacional da proteína após ligação a andrógeno promove ainda a dissociação de proteínas chaperonas e facilita a dimerização do receptor, a transporte nuclear, a fosforilação e a ligação ao DNA (Zhu, 2005).

A localização dos RA livres não é totalmente conhecida; acredita-se que esteja entre o núcleo e o citoplasma. A ligação do andrógeno ao RA faz com que a proteína seja convertida em sua forma ativa que possui uma afinidade de ligação ao DNA não-específico aumentada em 10 vezes, formando o complexo receptor-andrógeno e translocando para o núcleo. No núcleo, o complexo andrógeno-receptor na forma de um homodímero se liga a uma seqüência específica do gene regulado por RA, descrita como região regulatória. Nesta ligação este complexo adota uma conformação antiparalela, que é facilitada por uma interação de alta afinidade entre a região amino do TAD e a região carboxi do LBD nos elementos responsivos (ARE), tudo isso acontece nas regiões regulatórias dos genes alvo. O ARE está localizado em um *enhancer*, podendo estar localizado a diversos Kb a montante do promotor, e possui sítios com a seqüência consenso TGTTCT. Os sítios estão organizados em palíndromos e o espaçamento entre os sítios determina o tipo de elemento responsivo (Lewin, 2001; Yong *et al.*, 2003; Balk & Knudsen, 2008).

Quando o complexo receptor-ARE liga ao *enhancer*, ocorre associação com vários cofatores transcripcionais e recrutamento de co-ativadores e de complexos de remodelamento da cromatina (Figura 8) (Yong *et al.*, 2003; Melo *et al.*, 2005; Balk & Knudsen, 2008). Após o recrutamento de co-reguladores e fatores de transcrição em geral, a transcrição de um gene-alvo é induzida ou inibida e, em última análise, leva a alteração na expressão gênica, alterando a estrutura e a função celular e biológica (Zhu, 2005).

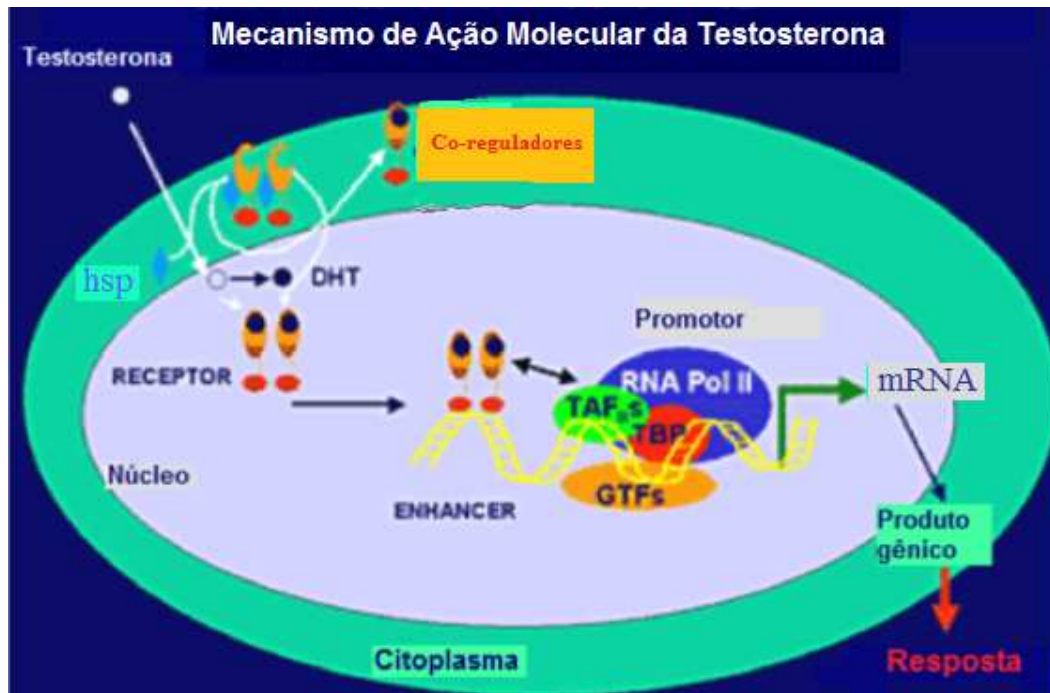


Figura 8. Mecanismo de ação dos andrógenos (Brinkmann, 2006). A testosterona, a sua forma mais ativa diidrotestosterona (DHT) entra na célula por difusão e se liga ao receptor de andrógeno, liberando a proteína *heat shock* (hsp), o complexo andrógeno-receptor transloca para o núcleo associando-se a co-reguladores e, ligando ao *enhancer*, fatores de transcrição são recrutados [TAFs (*TBP associating factors*), TBP (*TATA box binding protein*), GTFs (*general transcription factors*)], e inicia a transcrição gênica, formando o produto gênico e a expressão deste.

1.5. Mutações no gene que codifica o RA

Mutações no gene *RA* têm sido associadas a várias desordens, incluindo a síndrome da insensibilidade a andrógenos (AIS – *Androgen Insensitivity Syndrome*), completa, parcial e suave, câncer de próstata, várias doenças nervosas e câncer de mama. A maioria das mutações no gene *RA* tem sido identificada nos LBD e DBD, e poucas são encontradas no TAD (Sasagawa *et al.*, 2000), sendo estas, a grande maioria, mutações pontuais com substituições subsequentes do aminoácido, impossibilitando a função do RA e diminuindo a resposta ao andrógeno (Vogt, 2004).

No geral existe um alto grau de variações de seqüência no gene *RA*, são mais de 300 mutações descritas e apresentadas no Database para o gene *RA* (<http://androgendb.mcgill.ca/AR23C.pdf>). Estas mutações refletem a alta flexibilidade estrutural da proteína dimérica RA nos complexos funcionais, juntamente com os vários co-

ativadores e podem estar localizadas em diferentes regiões do RA (Brinkmann & Trapman, 2000; Chu *et al.*, 2002; Vogt, 2004; Li *et al.*, 2005).

A SIA está associada com mutações no gene *RA* e os fenótipos de indivíduos afetados variam consideravelmente, dependendo do tipo e da localização das mutações (Vogt, 2004). A SIA é classificada em três fenótipos clínicos: insensibilidade ao andrógeno completa (CAIS – *Complete Androgen Insensitivity Syndrome*), parcial (PAIS – *Partial Androgen Sensitivity Syndrome*) e suave (MAIS – *Mild Androgen Insensitivity Syndrome*). Mutações responsáveis pela existência de cada um destes fenótipos estão espalhadas em toda a extensão do gene *RA*, com uma maior ocorrência destas mutações no LBD, localizado na extremidade carboxi-terminal do receptor (Mooney *et al.*, 2003; Yong *et al.*, 2003).

As mutações de substituição Val866Met, em que a valina é substituída por uma metionina no codon 866 no exon 7, devido à alteração do nucleotídeo guanina por adenina (Lubahn *et al.*, 1989); a Pro817Leu, que substitui a prolina por leucina no codon 817 no exon 7, devido à mudança da citosina para timina (Turek-Plewa *et al.*, 2006); a Arg855Cys, arginina por cisteína no codon 855 no exon 7 devido à transição do nucleotídeo citosina para timina; a Arg840His, arginina para histidina no exon 7; a Arg774Cys, arginina por cisteína no exon 6; acarretam a CAIS (Elhaji *et al.*, 2004). Os pacientes portadores da CAIS exibem um genótipo masculino (46, XY) com genitálias externas femininas (Mooney *et al.*, 2003; Kang *et al.*, 2003).

As mutações Arg774His, substituição da arginina por histidina no codon 774 no exon 7; a Arg840Cys, arginina por cisteína, na posição 840 no exon 7 (Elhaji *et al.*, 2004); a His570Arg, histidina por arginina no codon 570 no exon 2; a Gly589Glu, glicina por glutamato no codon 589 no exon 3 e a Ser759Thr, serina por treonina na posição 759 no exon 5, foram associadas ao fenótipo de PAIS (Tobo *et al.*, 2003). Os pacientes portadores da PAIS exibem uma escala larga de fenótipos, frequentemente com genitálias externas ambíguas (Rajender *et al.*, 2007).

Para MAIS, dentre as mutações identificadas de substituição pode-se citar Asn233Lys, asparagina por lisina na posição 233 no exon 1, Ala871Gly, alanina por glicina na posição 871 no exon 8, Met886Val, metionina por valina na posição 886 no exon 8, a Arg855His, arginina por histidina no exon 7 (Elhaji *et al.*, 2004). Pacientes portadores da MAIS são genotipicamente 46, XY e fenotipicamente são inférteis e têm genitálias externas masculinas (Mooney *et al.*, 2003; Yong *et al.*, 2003).

Uma série de mutações no gene *RA* tem sido identificada para o câncer de próstata. A maioria das mutações são substituições predominantemente localizadas no domínio LBD, não

sendo comuns tumores contendo múltiplas mutações no gene *RA* (Mooney *et al.*, 2003; Heinlein & Chang, 2004; Rajender *et al.*, 2007). As mutações somáticas no gene *RA* foram relatadas em ambos os estágios primário e metastático do câncer de próstata, embora a porcentagem de tumores que carregam a mutação no gene *RA* aumenta com os avanços dos estágios do câncer prostático. No entanto, mutações no gene *RA* são encontradas com mais frequência (até 44%) em estado avançado ou metastático antes de terapias com andrógenos (Kang *et al.*, 2003).

Dentre as mutações já descritas para o câncer de próstata pode-se citar a Gly64Arg, substituição da glicina por arginina na posição 64 no exon 1; His874Tyr, histidina por tirosina na posição 874 no exon 8 (<http://androgendb.mcgill.ca/AR23C.pdf>).

Alterações nas extensões de repetição de poliglutamina (CAG) e poliglicina (GGN), localizadas no exon 1 do gene *RA*, no TAD, tem sido relacionadas também ao risco aumentado de desenvolvimento do câncer de próstata em homens, no entanto, ao mesmo tempo existem estudos que contradizem esta relação (Rajender *et al.*, 2007). Irvine *et al.*, (1995) identificou associação de repetições de curta extensão de CAG com o risco de câncer de próstata, em estudos feitos com americanos negros e brancos. Os estudos com populações caucasianas, hispânicas, asiáticas, taiwanesas, chinesas, japonesas e indianas também mostraram associação. Em contrapartida, a maioria dos estudos com população européia (francesa e alemã) não mostraram associação entre repetições de curta extensão de CAG e o risco aumentado para o câncer de próstata (Gsur *et al.*, 2002; Rajender *et al.*, 2007).

Similar a repetição CAG, porém com menos estudos realizados, a repetição GGN tem apresentado variação na associação para o risco aumentado de desenvolvimento de câncer prostático. Curtas repetições na extensão GGN têm sido relatadas como estando em associação com o aumento do risco de câncer de próstata, porém em alguns estudos não é observada esta associação. Outros estudos demonstram associação de longas repetições da extensão GGN com o aumento de câncer de próstata e morte decorrente (Rajender *et al.*, 2007). Irvine *et al.*, (1995) em seu estudo, não encontrou associação entre a extensão das repetições GGN e o câncer de próstata, mas seus resultados possibilitaram ao autor propor que o gene *RA* pode ser determinante no risco de câncer de próstata devido à influência direta do número de repetições CAG e/ou GGN na função do receptor.

Já o aumento anormal da extensão de repetições CAG foi descrito como a causa da doença de Kennedy, atrofia muscular espinhal e bulbar (SBMA – *Spinal and Bulbar Muscular Atrophy*). A SBMA é uma doença hereditária do neurônio motor que afeta células nervosas especializadas (neurônios motor, as quais controlam os movimentos musculares). A

expansão anormal das repetições CAG interrompe a função normal dos neurônios motores no cérebro e do cordão espinhal. Essas células nervosas morrem gradualmente, levando a fraqueza muscular e este definha. As manifestações da doença iniciam na idade adulta e progridem com o avanço da idade (Igarashi *et al.*, 1992; Sulek *et al.*, 2005; Banno *et al.*, 2006; Rajender *et al.*, 2007). A extensão da repetição CAG em todos pacientes com SBMA tem tido uma variação entre 38-95 repetições (Rajender *et al.*, 2007). Sulek *et al.*, (2005) encontrou em seus pacientes (n = 21/200), população de poloneses, extensão variando entre 44-51 repetições CAG para homens e 44 – 47 para mulheres.

Estudo realizado por Igarashi *et al.*, (1992) o qual investigou o aumento do número de repetições CAG do gene que codifica para o receptor de andrógeno em 19 pacientes com SBMA, constatou a expressiva correlação da repetição CAG com a idade de aparecimento da fraqueza muscular, principal sintoma de SBMA. Segundo o autor, SBMA é a primeira doença genética na qual uma forte correlação entre o grau de anormalidade genética (número de repetições CAG *tandem*) e clínica expressão fenotípica é demonstrável. Os resultados encontrados em sua pesquisa indicam também que mutação genética no gene *RA* está diretamente envolvida na degeneração dos neurônios motores.

A curta extensão da repetição CAG foi associada à doença de Alzheimer em homens, todavia não foi encontrado associação com a doença em mulheres. Lehmann *et al.*, (2003) analisou a repetição do polimorfismo CAG no exon 1 do gene *RA*. Este estudo foi realizado em Oxford e contou com 150 casos, sendo 101 homens, com diagnóstico definitivo ou provável de doença de Alzheimer e 190 idosos controles. Foi observado que os encurtamentos dos alelos (≤ 20 repetições CAG) estavam associados com a doença de Alzheimer em homens, mas não em mulheres, reafirmando que o polimorfismo no gene *RA* (repetição CAG) tem potencial relevância para o risco da doença de Alzheimer em homens. Em outro estudo, Lehmann *et al.*, (2004), com 79 pacientes com provável ou confirmada doença de Alzheimer encontrou uma redução no quadro de repetições de CAG (≤ 20 repetições) confirmando os achados anteriores, e permitindo-o sugerir que a combinação de alelos curtos do receptor de andrógeno com menores níveis séricos de testosterona pode aumentar os riscos da doença de Alzheimer para os homens.

Para o câncer de mama, mutações de substituição em homens foram relatadas, como a Arg608Lys, substituição da arginina por lisina, no codon 608, no exon 3, na região do segundo dedo de zinco (Loboccaro *et al.*, 1993). E o polimorfismo CAG, quanto ao comprimento das repetições tem sido estudado como um fator de risco para o câncer de mama e/ou como um fator de risco para mutações no gene *BRCA* (*breast cancer*) já descrita para o

câncer de mama. Mas os resultados dos estudos têm apresentado contradições. Estudos com mulheres americanas com câncer de mama demonstraram associação entre o aumento da repetição CAG com o risco para o câncer de mama de menor ou maior grau, independente da mutação no gene *BRCA*, e em estudo com mulheres asiáticas não foi encontrada nenhuma relação. Já estudos realizados com homens australianos relataram aumento na repetição CAG entre os doentes, porém não foi relatada a relação em outros estudos feitos com mulheres australianas, com ou sem mutação no gene *BRCA*. Contudo, são poucos os estudos que relacionam o câncer de mama com mutações no gene *RA* (Rajender *et al.*, 2007).

1.6. Mutação no gene *RA* que afeta a espermatogênese causando a infertilidade masculina

Mutações específicas associadas com infertilidade masculina foram identificadas principalmente nos domínios TAD (exon 1) e LBD (exons 4-8) do gene *RA* (Vogt, 2004). Estudos estimam que as substituições *missense* (sem sentido) do gene *RA*, substituições pontuais de nucleotídeos, contribuam em aproximadamente 2% para o fenótipo de infertilidade masculina (Yong *et al.*, 2003) e a expansão da repetição CAG em torno de 35% (Tut *et al.*, 1997; Yoshida *et al.*, 1999; Mifsud *et al.*, 2001).

No exon 1, Hiort *et al.*, (2000) identificou a mutação Pro390Ser, na qual a prolina é substituída por uma serina no códon 390 devido à transição do nucleotídeo citosina pela timina, em dois homens que apresentavam queda no número de espermatozoides, oligozoospermia; a mutação Gly58Leu, substituição no codon 58 de uma glicina por uma leucina, foi identificada por Lund *et al.*, (2003) em pacientes azoospermicos e oligoastenoteratozoospermicos.

Ainda no exon 1, a Asn233Lys foi identificada também em pacientes azoospermicos e oligozoospermicos severo. Asn233Lys é uma mutação de substituição, na qual a lisina substitui a asparagina, na codon 233, na extensão da região que codifica o TAD. A Asn756Ser no exon 5 foi identificada, no mesmo estudo, em pacientes com os mesmos fenótipos descritos pelo autor, corresponde a uma mutação por substituição, alterando o aminoácido asparagina para serina, no codon 756 na região que junto com os exons 4, 6-8 codificam para o LBD (Giwerzman *et al.*, 2001). Giwerzman *et al.*, (2001) verificou também que a transativação foi anormal para ambos os mutantes, sendo que Asn233Lys apresentou 46% e

Asn756Ser apresentou 38% do potencial de transativação em comparação ao tipo selvagem, visto que os domínios atingidos possuem os subdomínios de transativação (AF-1 e AF-2).

As mutações Met866Val e Met886Val, descritas por Ghadessy *et al.*, (1999), são substituições do aminoácido metionina por uma valina, nos codons 866 e 886, nos exons 7 e 8, respectivamente. Essas mutações foram encontradas em homens oligozoospermicos, e apresentaram redução na atividade de transativação, visto que o segundo domínio de transativação (AF-2) encontra-se no domínio de ligação ao andrógeno.

A mutação no exon 6 Gln798Glu, glutamina por ácido glutâmico foi identificada por Hiort *et al.*, (2000) em pacientes oligoteratozoospermicos causando defeitos na transativação. Esta mesma mutação foi descrita anteriormente para pacientes azoospermicos por Wang *et al.*, (1998a) não afetando a afinidade da proteína para o andrógeno, mas apresentando redução significativa na transativação.

Estudo realizado por Ferlin *et al.*, (2006) com 1517 pacientes, que apresentavam concentração espermática $<10 \times 10^6$ espermatozoides/mL foi feito para verificar mutação no gene *RA*, encontrando 20 mutações em 26 pacientes, como: Gly506Asp, glicina por aspartato codon 506 exon 1; Ala474Val, alanina por valina no codon 474 exon 1, Tyr571His, tirosina por histidina no codon 571 exon 2; Leu547Phe, leucina por fenilalanina condon 547 exon 2; Arg615His, arginina por histidina no codon 615 do exon 3; Arg607Gln, arginina por glicina no codon 607 do exon 3; Ala645Asp, alanina por aspartato, no codon 645 do exon 4; Met780Ile, metionina por isoleucina codon 780 exon 6; Leu821Val, leucina por valina no exon 7 codon 821; Arg855His, arginina por histidina no codon 821 exon 7 (<http://androgendb.mcgill.ca/AR23C.pdf>).

Além das mutações pontuais, intervalos mais longos de poliglutamina (CAG) dentro da escala normal foram relatados como causa de aumento do risco de defeitos na espermatogênese em homens considerados normais, indicando uma relação direta entre o comprimento desta região polimórfica específica do RA e o defeito na maturação do esperma causado pela diminuição da capacidade funcional do RA (Hiort *et al.*, 2000). Aproximadamente 20% dos homens inférteis têm androgenicidade reduzida causada por um intervalo mais longo de CAG do gene *RA* no exon 1 (Thangaraj *et al.*, 2002).

Ruhayel *et al.*, (2004) demonstraram a associação da longa extensão da repetição CAG com pacientes que apresentavam fenótipo azoospermicos e oligozoospermicos severo, em comparação com o grupo controle de pacientes férteis, verificando a associação quando foram analisadas as extensões CAG e GGN combinadas. Ferlin *et al.*, (2004) também não encontrou associação entre as repetições CAG e GGC, quando analisadas separadamente, porém quando

analisadas em conjunto, verificou que homens inférteis apresentavam a combinação de CAG = 21/GGC = 18 (21 repetições CAG e 18 repetições GGC) e raramente $CAG \geq 23/ GGC \leq 16$. Por outro lado, *Saare et al.*, (2008) estudou as repetições CAG e GGN, em pacientes também azoospermicos e oligozoospermicos, não demonstrando correlação das repetições com defeitos espermatogênicos, nem combinação destas. *Thangaraj et al.*, (2002) e *Wallerand et al.*, (2001) também não encontraram correlação.

Contudo, a repetição CAG não está relacionada apenas com o fenótipo azoospermico e oligozoospermico. Estudo realizado com pacientes árabes e judeus, em Jerusalém, demonstrou associação da repetição CAG para o fenótipo teratozoospermico (*Milatiner et al.*, 2004).

Estudos indicam que os intervalos de repetições de CAG são polimórficos entre homens inférteis em várias populações étnicas, levando a conclusões contraditórias sobre a associação ou não desse polimorfismo com risco de infertilidade masculina (*Thangaraj et al.*, 2002). Segundo *Rajender et al.*, (2007), que estudou a relação entre as pesquisas já realizadas para CAG na infertilidade masculina com diferentes etnias, as populações de Singapura, China, França, Austrália, Estados Unidos, Espanha, Israel apresentaram resultados que foram significantes, propondo que repetições longas de CAG estejam relacionadas ao fenótipo de infertilidade masculina. Em contrapartida, pesquisas com populações da Dinamarca, Alemanha, Suécia, Finlândia, Irã, Turquia, Itália não foram significantes (*Rajender et al.*, 2007).

Mifsud et al., (2001) analisou pacientes azoospermicos de diferentes etnias, grupos de pacientes de Singapura e pacientes do Texas, USA, encontrando significância, em ambas as populações, para repetição CAG (≥ 26 repetições) com o fenótipo azoospermico, portanto indicando que as diferenças demonstradas em outros estudos, quanto à associação ou não da repetição com defeitos na espermatogênese, são independentes da etnicidade.

Há mutações que levam a uma alteração de função da proteína RA, resultando na completa feminização de indivíduos 46, XY e mutações que não alteram por completo sua atividade, podendo causar um amplo espectro de fenótipos, desde a ambigüidade das genitálias em recém-nascidos, a infertilidade masculina idiopática (*Yong et al.*, 2003).

A infertilidade masculina idiopática é responsável por 40% dos casos de infertilidade masculina, e é postulado ter uma base genética (*Gottlieb et al.*, 2005). Sendo assim, as substituições *missense* de aminoácido no domínio de ligação ao andrógeno resultam em infertilidade por meio de um mecanismo que impede a interação adequada do andrógeno ao RA, bem como a interação entre os domínios contidos no RA, ou entre estes domínios e seus co-ativadores. Independente de existir ou não mutações *missense*, estudos envolvendo as

repetições trinucleotídicas no domínio TAD do RA, podem estar associados também com risco aumentado de defeitos na espermatogênese (Yong *et al.*, 2003; Gottlieb *et al.*, 2005).

2. JUSTIFICATIVA

A fertilidade humana é dependente de diversos fatores. Os defeitos anatômicos, patológicos, endócrinos, imunológicos, genéticos e a exposição a fatores ambientais são causas significativas para a infertilidade. A infertilidade masculina não consiste em uma doença, mas em uma síndrome que resulta de desordens adquiridas ou congênitas. O fator masculino na infertilidade tem se tornado cada vez mais importante na investigação dos casais inférteis, o que tem levado, nos últimos anos, a uma queda considerável na qualidade do sêmen entre indivíduos saudáveis e jovens (Mori *et al.*, 2002).

No entanto, não restam dúvidas de que os andrógenos contribuem para o início e manutenção da formação de espermatozoides e que o gene *RA* está envolvido no controle genético de vias regulatórias da espermatogênese (Vogt, 2004). Relatos da literatura descrevem que mudanças estruturais no gene *RA* podem ser uma das causas de defeito na espermatogênese e conseqüentemente da infertilidade masculina (Yong *et al.*, 2003; Elhaji *et al.* 2004; Ferlin *et al.*, 2006; Davis-Dao *et al.*, 2007).

Os estudos avaliando a presença ou não de mutações no gene *RA* que levam a infertilidade masculina, no Brasil, são raros (Melo *et al.*, 2005). A maioria dos estudos com *RA* está relacionada ao câncer de próstata e a AIS (Barbaro *et al.*, 2007; Balk & Knudsen, 2008). Pesquisas que verificam mutações presentes nesse receptor, que possam estar associadas à infertilidade masculina, são comuns em países europeus, asiáticos e norte-americanos (Peterlin *et al.*, 2007; Ferlin *et al.*, 2004; Milatiner *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2006). No Brasil e, mais especificamente, na região Centro-Oeste não existe estudo relacionando mutações no gene *RA* com infertilidade, o que justifica a importância de se investigar. Segundo Ruiz (2008), no Brasil, existem cerca de 2,1 milhões de casais com problemas de fertilidade constatada, ou seja, que tenham procurado algum tipo de tratamento. A infertilidade masculina acomete de 15 a 20% da população masculina em geral (Pasqualotto *et al.*, 2006).

Homens com diagnóstico de alterações no espermograma, correlacionado com infertilidade, deveriam passar por um estudo de possíveis causas, instituindo-se como protocolo a ser realizado pré-tratamento de infertilidade. Este estudo de definição de causas da infertilidade é muito importante para posterior encaminhamento destes pacientes à reprodução assistida. Todavia a maioria da população brasileira não tem acesso aos serviços

de reprodução humana ou condições financeiras para arcar com os altos custos de medicação e procedimentos em reprodução assistida. O SUS nem os planos privados de saúde cobrem despesas com reprodução assistida, tais como inseminação intra-uterina e fertilização *in vitro* (FIV), dentre outras, e os serviços públicos de reprodução humana, que estão disponíveis atualmente, estão vinculados às Secretarias Estaduais de Saúde ou aos Hospitais Universitários, porém o acesso é limitado (Antunes Júnior, *et al.*, 2003; Ruiz, 2008).

Aproximadamente 90% dos centros de reprodução humana da América Latina são instituições particulares e cobram, por tentativa, valores que variam de US\$ 3000,00 a US\$ 11000,00. De acordo com publicação da Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2002, em uma instituição pública do interior de São Paulo, por exemplo, o casal arcava com valores entre US\$ 750,00 e US\$ 2000,00 por ciclo sem criopreservação de gametas ou embriões (Luna, 2002). O custo com medicação para realizar um ciclo de FIV, análogo de GnRH (Hormônio Liberador de Gonadotrofina), FSH (hormônio folículo estimulante) recombinante e hCG (gonadotrofina coriônica) chega a aproximadamente R\$ 3700,00 (Luna, 2002; Antunes Junior *et al.*, 2003).

Além de promover o encaminhamento para a reprodução assistida, os estudos com o gene *RA* devem ser realizados para verificar a existência de possibilidade da mutação que acomete o genitor ser herdado por seus filhos (do sexo feminino). O gene *RA* está localizado no cromossomo X, no qual uma cópia deste será transferida para a prole (46, XX), assim a mutação presente no gene *RA* consequentemente será transferida, e a filha passará a ser portadora do alelo mutante, podendo não desenvolver fenótipo algum, ou desenvolver um fenótipo diferente, como o câncer de mama, visto que, no database para mutações no gene *RA* é possível verificar mutações semelhantes para diferentes fenótipos. A filha portadora da mutação poderá ainda transferi-la para seus futuros filhos, e estes sendo do sexo masculino, poderão apresentar o fenótipo de infertilidade masculina (<http://androgendb.mcgill.ca/AR23C.pdf>; Davis-Dao *et al.*, 2007).

A análise molecular das possíveis causas de infertilidade masculina é importante, uma vez que, algumas alterações na estrutura do gene *RA* podem estar relacionadas com a ocorrência de infertilidade masculina e ainda podem ser transferidas para gerações futuras. O conhecimento dos tipos de mutações presentes no gene *RA* e de como a proteína codificada por este gene irá se comportar contribuirá para melhor delineamento de terapias e ao aconselhamento genético, de tal forma que estas terapias sejam mais eficazes para reprodução. Nesta situação, o casal que estiver se submetendo ao tratamento de reprodução humana estará ciente de todo o processo e da possibilidade de o filho herdar a mutação

advinda do pai, permitindo que o casal decida conscientemente, avaliando os prós e contras e se quer prosseguir no tratamento, mas sem a interferência do especialista.

3. OBJETIVO GERAL

Verificar a ocorrência de mutação no gene que codifica o receptor de andrógeno em pacientes com infertilidade idiopática do Centro de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Universidade Federal de Goiás (HC-UFG).

3.1. Objetivos Específicos

- Delinear o perfil populacional dos pacientes inférteis com alterações no gene que codifica para o Receptor de Andrógeno;
- Detectar mutações nos exons 1, 4, 6, 7 e 8, no gene *RA*, em pacientes inférteis atendidos no Hospital das Clínicas de Goiás;
- Associar as mutações presentes no gene *RA* que codifica para o receptor de andrógeno com o laudo do espermograma;
- Associar mutações no gene *RA* que codifica o receptor de andrógeno com os hábitos sociais dos pacientes.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Grupo de Estudo

Foram coletadas 206 amostras de sangue periférico (10 mL) ou sêmen de pacientes encaminhados ao Laboratório de Reprodução Humana do HC-UFG, com queixa primária de infertilidade idiopática. O sangue periférico ou sêmen foram coletados, aliquotados e armazenados a -20°C para posterior extração de DNA.

No Laboratório de Reprodução Humana do HC-UFG, foi realizado o espermograma, no qual o sêmen foi analisado seguindo à técnica estabelecida como padrão pela OMS (1994). Após a obtenção dos laudos, os resultados do espermograma foram agrupados, apenas para fins da análise molecular em cinco categorias: 1 – normais (pacientes com espermograma normal); 2 – oligozoospermicos (pacientes com oligozoospermia, oligozoospermia severa, oligoastenoteratozoospermia); 3 – astenozoospermicos (pacientes com astenozoospermia, astenoteratozoospermia, oligoastenozoospermia), 4 – teratozoospermicos (pacientes com teratozoospermia e oligoteratozoospermia) e 5 – azoospermicos (pacientes com azoospermia) [Tabela 1].

Tabela 2. Distribuição dos resultados do espermograma dos pacientes com infertilidade idiopática do Laboratório de Reprodução Humana do HC-UFG, nas categorias: normais, oligozoospermicos, astenozoospermicos, teratozoospermicos e azoospermicos.

Espermograma	Categoria
Normal	1 - Normais
Oligozoospermia, oligozoospermia severa e oligoastenoteratozoospermia	2 - Oligozoospermicos
Astenozoospermia, astenoteratozoospermia e oligoastenozoospermia	3 - Astenozoospermicos
Teratozoospermia e oligoteratozoospermia	4 - Teratozoospermicos
Azoospermia	5 - Azoospermicos

Dados dos pacientes como nome, idade, e hábitos sociais, como tabagismo, etilismo, contato com agentes químicos (agrotóxico, produtos de mineração, fotocópias e combustível), doenças adquiridas (caxumba), foram colhidos a partir de um questionário (Anexo A) e tabulados em planilha Excel.

O estudo foi aprovado pelo comitê de ética do Conselho Nacional de Saúde, Comissão Nacional de Ética em Pesquisas – CONEP, parecer de número 1640/2005, registro CONEP 11979 (Anexo B). Todos pacientes assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo C).

4.2. Extração de DNA

As amostras de sangue ou sêmen coletadas foram submetidas à extração do DNA, utilizando o Kit de extração, *Illustra Blood GenomicPrep* (GE HealthCare, USA), seguindo as instruções do protocolo (Lote: 362027). A integridade do DNA foi certificada por meio de eletroforese em gel de agarose a 1,5%. O gel foi corado por brometo de etídeo (0,5 mg/mL) e visualizado no Sistema de Vídeo Documentação VDS® (*Amersham Biosciences Biotech*, USA).

4.3. Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

Após a extração do DNA, as amostras foram submetidas à amplificação de DNA para diferentes regiões do gene *RA*. Foi realizada PCR do tipo simplex para cada região estudada. Para cada amostra de DNA foram analisados os exons 1, 4, 6, 7 e 8 do gene *RA* [Tabela 2] (NCBI, 2006; Singh *et al.*, 2006).

Tabela 2. Seqüência dos *primer* utilizados para amplificação dos exons do gene *RA* por PCR

<i>Primer</i>	Seqüência (5' - 3')	Fragmento (pb)
Exon 1	S – CGGGTTCTCCAGCTTGATGCG	528 pb
	A – GCTCCCACCTTCTCCAAGGACAATTAC	
Exon 4	S – ACACTACACCTGGCTCAATGG	172 pb
	A – CGGAAGCTGAAGAACTTGG	
Exon 6	S – CCAGCAGGAGAAACAGCAAGC	378 pb
	A – GGGGAATGAAGAAGGGAAATGTC	
Exon 7	S – AGGCCCAAGCACACAGACT	516 pb
	A – CCTCCACCCCTTTCACAATATC	
Exon 8	S – GCCACCTCCTTGTC AACCT	289 pb
	A – AGAGGAGTAGTGCAGAGTTA	

(NCBI 2006; Singh *et al.*, 2006)

Legenda: S – *sense* (sentido à frente); A – *antisense* (sentido contrário ao *antisense*); pb – pares de bases

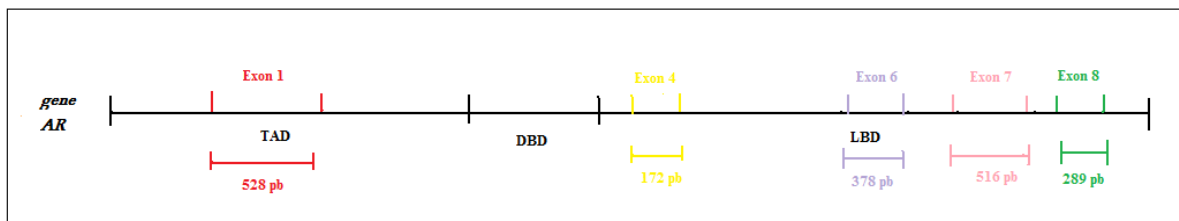


Figura 9. Representação esquemática da localização dos oligonucleotídeos Exon 1, Exon 4, Exon 6, Exon 7 e Exon 8 no cromossomo X que compreende o gene *RA*, que codifica três domínios principais: Domínio amino-terminal (TAD), Domínio de ligação ao DNA (DBD) e domínio de Ligação ao andrógênio (LBD).

As reações de PCR foram realizadas segundo o protocolo proposto por Sambrook *et al.*, (2001), porém as condições para a PCR foram padronizadas para cada *primer* separadamente para um volume final de 25 μ L. Os reagentes para cada *primer* (tampão 10X, cloreto de magnésio ($MgCl_2$), deoxinucleotídeos trifosfato (dNTPs), Taq DNA polimerase, *primer sense e antisense*, água (H_2O) Mili Q, amostra de DNA) estão especificados na tabela 3. A ciclagem, temperatura, tempo e ciclos, para os processos de desnaturação, anelamento e renaturação das fitas de DNA utilizada para cada exon analisado, 1, 4, 6, 7 e 8, estão especificadas na tabela 4.

Tabela 3. Reagentes utilizados para amplificação do DNA para os diferentes exons analisados, exon 1 e 4 e exon 6, 7 e 8 do gene *RA*

Reagentes	Exons 1 e 4	Exons 6, 7 e 8
Tampão 10X	2,5 μ L	4 μ L
$MgCl_2$ (50 nM)	1,5 μ L	3 μ L
dNTPs (1,25 mM cada)	2 μ L	2 μ L
Taq DNA polimerase 5 U/ μ L	0,3 μ L	0,3 μ L
<i>Primer sense</i> (20 pmoles)	0,8 μ L	1 μ L
<i>Primer antisense</i> (20 pmoles)	0,8 μ L	1 μ L
H_2O Mili Q	14,1 μ L	10,7 μ L
DNA amostra	3 μ L	3 μ L
Volume Final	25 μ L	25 μ L

Legenda: $MgCl_2$ – cloreto de magnésio; dNTPs – deoxinucleotídeos trifosfato; Taq DNA polimerase – enzima de amplificação do DNA; *primer sense* – *primer* sentido 5'3'; *primer antisense* – *primer* sentido contrário ao sense; H_2O MiliQ – água ultrapura, destilada e deionizada; nM – nanomolar; U/ μ L – unidades por microlitros; pmoles – picomoles; μ L – volume em microlitros

Tabela 4. Descrição das ciclagens utilizadas para amplificação das amostras para o exon 1 e 4, exon 6 e exon 7 e 8 do gene *RA*

	Exon 1 e 4			Exon 6			Exon 7 e 8		
	Temp. (°C)	Tempo (min)	Ciclo	Temp. (°C)	Tempo (min)	ciclo	Temp. (°C)	Tempo (min)	ciclo
Desnaturação	95°C	3	1	94°C	5	1	94°C	5	1
Amplificação cíclica	95°C	1		94°C	1		94°C	1	
	56°C	1	35	58°C	1	35	58°C	1	37
	72°C	1		70°C	1		72°C	1	
Extensão final	72°C	5	1	70°C	5	1	72°C	5	1
Armazenamento	4°C	∞		4°C	∞		4°C	∞	

Legenda: Temp. – temperatura; min – minutos

A análise molecular do gene *RA* baseou-se na verificação da presença da banda de amplificação, para amostras normais, ou ausência da banda, para amostras com alteração. Estas alterações podem ser consideradas como prováveis deleções, substituições ou inserções, contudo não sendo possível identificar quais delas poderiam estar presentes por meio da técnica de PCR apenas.

Os produtos obtidos foram submetidos à eletroforese em gel de agarose 2% e corado por brometo de etídio (5 µg/mL) sendo visualizado e fotografado no VDS®.

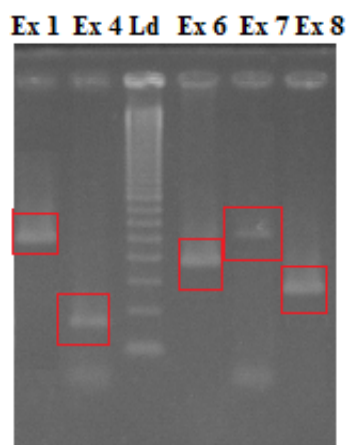


Figura 10. Gel de agarose 2% dos produtos de amplificação por PCR dos exons 1, 4, 6, 7 e 8 do gene *RA*. Este gel demonstra como foi realizada a padronização dos *primers*, no qual utilizou-se uma amostra controle de DNA que apresentava o gene *RA* íntegro, sem mutações. O lader (Ld) de 100 pb foi utilizado para verificar os padrões de bandas para os exons analisados (exon 1, 4, 6, 7 e 8). As análises foram feitas com base neste perfil de amplificação, a não visualização de amplificação após eletroforese era indicativo de que a amostra apresentava alteração no exon, não permitindo a amplificação do DNA.

4.4. Análise Estatística

Os dados obtidos por meio de questionário, do espermograma e da análise molecular dos exons 1, 4, 6,7 e 8 do gene *RA*, foram tabulados em planilha Excel para análise estatística.

Foram aplicados os testes U de Mann Whitney, qui-quadrado (χ^2) de independência e de regressão logística.

O Teste U de Mann Whitney é um teste não paramétrico destinado a comparar duas amostras independentes que sejam de mesmo tamanho ou não (Monteiro Filho, 2004; Ayres *et al.*, 2007). O teste foi aplicado, neste estudo, para verificar a existência de similaridade entre as idades dos pacientes normais e alterados para espermograma.

O qui-quadrado de independência é um teste não paramétrico que se destina a comprovar se duas variáveis independentes estão ou não relacionadas uma à outra por uma relação de dependência (Monteiro Filho, 2004; Ayres *et al.*, 2007). Neste estudo, o teste foi utilizado de forma a verificar se os dados relativos aos pacientes, obtidos por questionário, têm influência sobre os resultados encontrados na análise molecular dos exons 1, 4, 6, 7 e 8, do gene *RA* e verificar se existe associação entre análise molecular do gene *RA*, exons 1, 4, 6, 7 e 8, e o espermograma.

O teste de regressão logística simples testa uma variável dependente de Y e uma variável independente, sendo a variável Y binária, ou seja, assume valores 1 (sucessos) e valores 0 (insucessos) (Monteiro Filho, 2004; Ayres *et al.*, 2007). Neste estudo, este teste foi aplicado para verificar se existe alguma associação entre os resultados do espermograma, cada categoria, e os da análise molecular dos exons 1,4, 6, 7 e 8 do gene *RA*.

Para a análise estatística foi utilizado o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS – pacote estatístico para as ciências sociais) (versão 15.0), sendo o nível de decisão (α) para análise dos resultados estatísticos menores que 0,05 ($\alpha < 0,05$).

5. RESULTADOS

A média de idade dos pacientes alterados segundo laudo de espermograma foi de 34,58 (DP±10,29), próxima da média observada para os pacientes normais de 34,47 (DP±7,74). A utilização do teste de normalidade de variáveis permitiu a comprovação da homogeneidade entre os grupos de pacientes normais e de pacientes alterados ($P = 0,614$) [Tabela 5].

Tabela 5. Comparação entre as médias de idade dos pacientes normais e pacientes alterados

Pacientes	Média	Desvio Padrão	Erro Padrão	Variância	P
Normais	34,37	7,74	0,73	59,92	
Alterados	34,58	10,29	1,05	105,96	0,614

Teste U Mann Whitney

Do total de 206 pacientes, apenas 70,4% (145) responderam o questionário por inteiro, entre estes, foi verificado que 20,7% (30) dos pacientes relataram que fumavam, 58% (84) que bebiam, 36,6% (39) que tiveram algum tipo de contato com agrotóxicos ou outro tipo de material tóxico (fotocópias, gasolina, mineração) e 58% (84) tiveram caxumba [Tabela 6].

Tabela 6. Tabulação dos dados sobre os hábitos sociais dos pacientes, colhidos por meio de questionário

Hábitos Sociais	Tabagismo		Etilismo		Agrotóxico		Caxumba	
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)
Sim	30	20,7	84	58	53	36,6	84	58
Não	115	79,3	61	42	92	63,4	61	42
Total	145	100	145	100	145	100	145	100

Legenda: n – número de pacientes; % – porcentagem, sim – possuem os hábitos sociais estudados, não – não possuem os hábitos sociais estudados

Quando foram analisados os resultados do espermograma fornecidos pelo Laboratório de Reprodução Humana do HC-UFG, observou-se que 111 pacientes apresentaram espermograma alterado, o que representa 54% dos pacientes e 46% (95) apresentaram espermograma normal.

Após categorização dos resultados dos espermogramas, estes se apresentaram como sendo 46% (95) da categoria dos normais, 54% (111) dos alterados, 15% (31) da categoria dos

oligozoospermicos, 11% (23) da categoria dos astenozoospermicos, 16% (33) da categoria dos teratozoospermicos e 12% (24) da categoria dos azoospermicos [Gráfico 1].

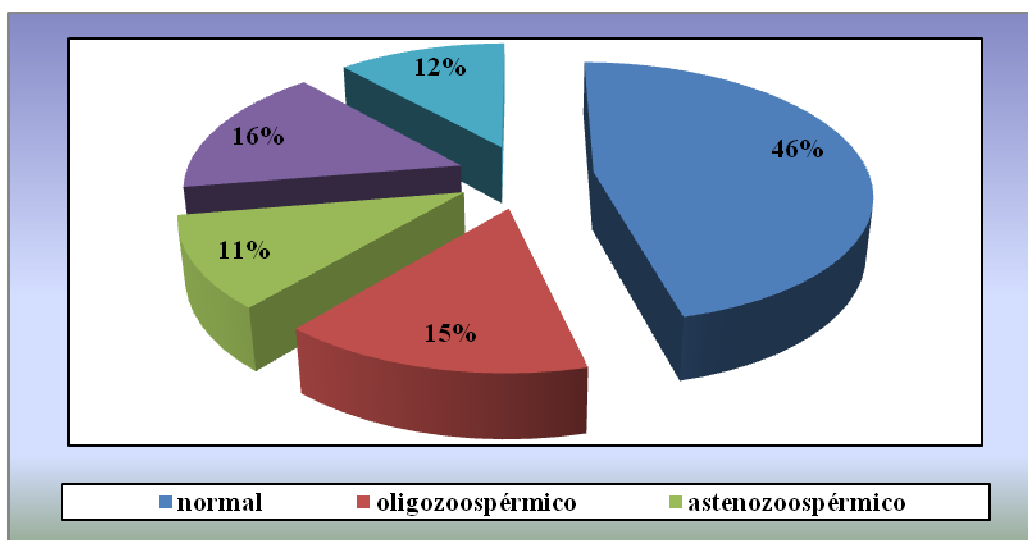


Gráfico 1. Frequência dos resultados categorizados dos espermogramas dos pacientes estudados que se submeteram ao espermograma no Laboratório de Reprodução Humana do HC-UFG no período de 2006-2007.

Com relação à análise molecular dos exons 1, 4, 6, 7 e 8 do gene *RA* foi verificado que 51,5% (106) dos pacientes apresentavam alteração (mutação) em pelo menos um dos exons e 48,5% (100) dos pacientes não apresentavam alteração. Dos pacientes identificados com alteração molecular nos exons 1, 4, 6, 7 e 8 do gene *RA*, 39% (41) representavam o grupo de pacientes com espermograma normal; 16% (17) o grupo dos oligozoospermicos, 10% (11) o grupo dos astenozoospermicos, 21% (22) o grupo dos teratozoospermicos e 14% (15) o grupo dos azoospermicos, conforme pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7. Distribuição da frequência das análises moleculares dos exons 1, 4, 6, 7 e 8 do gene *RA*, para espermograma categorizado

Espermograma	Resultado da Análise Molecular	
	(n)	(%)
Normais	41	39%
Oligozoospermia	17	16%
Astenozoospermia	11	10%
Teratozoospermia	22	21%
Azoospermia	15	14%
Total	106	100%

Legenda: n – número de pacientes; % – porcentagem

Quanto à avaliação do genótipo exon 1, os resultados obtidos foram os seguintes: 32,7% (18) dos pacientes com alteração no exon 1 pertenciam ao grupo de pacientes normais e 31,5% (29) ao grupo de pacientes alterados para espermograma. A frequência de alterações genótípicas para o exon 4 foi de 3,6% (2) no grupo de pacientes normais e 13% (12) no grupo de pacientes com alteração no espermograma. Para o genótipo exon 6, em 29,1% (16) dos pacientes normais este genótipo demonstrou presença de mutação e em 13% (12) nos pacientes alterados para espermograma. Em 18,2% (10) dos pacientes normais para o espermograma foi verificado presença de mutação no exon 7 e em 30,5% (28) dos pacientes alterados. O resultado de presença de mutação no exon 8 foi de 16,4% (9) no grupo de pacientes normais e 12% (11) no grupo de pacientes alterados para espermograma. Quando analisadas a frequência genotípica dentro de cada um dos grupos de pacientes estudados, normais e alterados para espermograma, verificou-se relação estatística significativa da presença de mutações no gene *RA*, exons 1, 4, 6, 7 e 8, em paciente com defeitos na espermatogênese destes pacientes ($P = 0,034$) [Tabela 8].

Tabela 8. Distribuição da frequência genotípica das amostras dos pacientes dos grupos normais e alterados para o espermograma

Análise Molecular	Espermograma normal		Espermograma Alterado		<i>P</i>
	(n)	(%)	(n)	(%)	
Exon 1	18	32,7	29	31,5	
Exon 4	2	3,6	12	13,0	
Exon 6	16	29,1	12	13,0	
Exon 7	10	18,2	28	30,5	
Exon 8	9	16,4	11	12	
Total	55	100	92	100	0,034

Legenda: n – número de pacientes, % – porcentagem

Teste qui-quadrado

Quando foi avaliada a idade dos pacientes alterados para o espermograma e a análise molecular do exon 1 verificou-se que 14,3% (4) dos pacientes que apresentavam mutação para o exon 1 estavam na faixa etária de 0 a 29 anos, 31,2% (25) na faixa etária de 30 a 48 anos, e 0% (nenhum paciente) na faixa etária de 50 a 69 anos. Pode ser verificado, ainda, que

não houve significância para a relação idade e presença de mutação no exon 1 ($P = 0,123$). Por meio da avaliação realizada da idade dos pacientes alterados para o espermograma e a análise molecular do exon 4, verificou-se que dos pacientes com mutação no exon 4, 17,8% (5) dos pacientes estavam na faixa etária de 0 a 29 anos, 7,5% (6) na faixa etária de 30 a 49 anos e 33,4% (1) na faixa etária de 50 a 69 anos, e também não foi encontrada significância para a relação idade e mutação no exon 4 ($P = 0,140$). Na análise feita da idade e mutação no exon 6, verificou-se que 7,2% (2) dos pacientes com mutação no exon 6 estavam na faixa etária de 0 a 29 anos, 12,5% (10) na faixa etária de 30 a 49 anos e 0% (nenhum paciente) na faixa etária de 50 a 69 anos, e não foi encontrada significância para a relação investigada ($P = 0,609$). A relação estabelecida entre a idade e presença de mutação no exon 7, demonstrou que 25% (7) dos pacientes apresentavam mutação para o exon 7 e correspondia a faixa etária de 0 a 29 anos, 25% (20) a faixa etária de 30 a 49 anos e 33,3% (1) a faixa etária de 50 a 69 anos, e também não foi encontrada significância para a relação idade e mutação no exon 7 ($P = 0,947$). E por fim, esta mesma análise foi realizada para o exon 8, onde, observou-se que 10,7% (3) dos pacientes com mutação no exon 8 estavam na faixa etária de 0 a 29 anos, 10% (8) na faixa etária de 30 a 49 anos e não foi verificada a ocorrência de mutação no exon 8 em pacientes na faixa etária de 50 a 69 anos no grupo de alterados para o espermograma, não tendo sido encontrada relação estatística significativa entre idade e presença de mutação no exon 8 ($P = 0,839$). A distribuição das respectivas frequências encontra-se na Tabela 9.

Tabela 9: Distribuição da frequência das idades dos pacientes que apresentaram alterados para o espermograma associando as análises moleculares dos exons 1, 4, 6, 7 e 8 do gene RA

AM/ Idade	0-29		30-49		50-69		<i>P</i>
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	
Exon 1							
Presença	24	85,7	55	68,8	3	100	
Ausência	4	14,3	25	31,2	0	0	
Total	24	100,0	80	100,0	3	100,0	0,123
Exon 4							
Presença	23	82,2	74	92,5	2	66,7	
Ausência	5	17,8	6	7,5	1	33,4	
Total	2	100,0	80	100,0	3	100,0	0,140

Tabela 9: Continuação

Exon 6							
Presença	26	92,8	70	87,5	3	100	
Ausência	2	7,2	10	12,5	0	0	
Total	28	100,0	80	100,0	3	100,0	<i>0,609</i>
Exon 7							
Presença	21	75	60	75	2	66,7	
Ausência	7	25	20	25	1	33,3	
Total	28	100,0	80	100,0	3	100,0	<i>0,947</i>
Exon 8							
Presença	25	89,3	72	90	3	100,0	
Ausência	3	10,7	8	10	0	0,0	
Total	28	100,0	80	100,0	3	100,0	<i>0,839</i>

Legenda: AM – análise molecular dos exons 1, 4, 6, 7 e 8 do gene *RA* verificando presença ou não nas amostras; 0-29- idade entre 0 e 29 anos; 30-49 – idade entre 30 e 49 anos, 50-60 – idade entre 50 e 69 anos; n – número de pacientes; % – porcentagem; presença – apresentou exon normal; ausência – não apresentou o exon

Teste qui-quadrado

O exon 1 ao ser analisado, quanto à categorização do espermograma, apresentou-se mutado em 18,9% (18) dos pacientes normais; em 9,7% (3) dos pacientes oligozoospermicos; em 13% (3) dos pacientes astenoospermicos; em 51,5% (17) dos pacientes teratoospermicos e em 25% (6) dos pacientes azoospermicos. Quando foi relacionado à análise molecular do exon 1 com as categorias do espermograma, verificou-se relação estatística significativa ($P = 0,015$) [Tabela 10].

Na avaliação do exon 4, quanto à categorização do espermograma, verificou-se a mutação deste em 2,1% (2) dos pacientes normais; em 19,4 % (6) dos pacientes oligozoospermicos; em 13% (3) dos pacientes astenoospermicos; em 3% (1) dos pacientes teratoospermicos e em 8,3% (2) dos pacientes azoospermicos, não foi constatada significância estatística para esta relação ($P = 0,398$) [Tabela 10].

Os estudos da frequência da análise molecular do exon 6 do gene *RA* no espermograma categorizado, indicou que este exon apresentou-se mutado em 16,8% (16) dos pacientes normais; em 9,7% (3) dos pacientes oligozoospermicos; em 8,7% (2) dos pacientes astenoospermicos; em 15,2% (5) dos pacientes teratoospermicos e em 8,3% (2) dos

pacientes azoospermicos, não tendo sido verificada relação estatística significativa ($P = 0,337$) [Tabela 10].

A análise molecular do exon 7, quanto à categorização do espermograma, indicou que este apresentava mutação em 10,5% (10) dos pacientes normais; em 22,6% (7) dos pacientes oligozoospermicos; em 34,8% (8) dos pacientes astenoospermicos; em 12,1% (4) dos pacientes teratoospermicos e em 37,5% (9) dos pacientes azoospermicos, tendo sido significativa para relação ($P = 0,012$) [Tabela 10].

Os resultados obtidos referentes à avaliação molecular do exon 8, quanto à categorização do espermograma, são os seguintes: presença de mutação deste em 9,5% (9) dos pacientes normais; em 9,7% (3) dos pacientes oligozoospermicos; em 4,3% (1) dos pacientes astenoospermicos; em 12,1% (4) dos pacientes teratoospermicos e em 12,5% (3) dos pacientes azoospermicos, não foi encontrada relação estatisticamente significativa para análise molecular do exon 8 do gene *RA* no espermograma categorizado ($P = 0,678$) [Tabela10].

Tabela 10: Distribuição da frequência das análises moleculares dos exons 1, 4, 6, 7 e 8 do gene *RA* no espermograma categorizado

AM/ Espermograma	Normal		Oligo		Asteno		Terato		Azoo		<i>P</i>
	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	(n)	(%)	
Exon1											
Presença	77	81,1	28	90,3	20	87,0	16	48,5	18	75,0	
Ausência	18	18,9	3	9,7	3	13,0	17	51,5	6	25,0	
Total	95	100,0	31	100,0	23	100,0	33	100,0	24	100,0	<i>0,015</i>
Exon 4											
Presença	93	97,9	25	80,6	20	87,0	32	97,0	22	91,7	
Ausência	2	2,1	6	19,4	3	13,0	1	3,0	2	8,3	
Total	95	100,0	31	100,0	23	100,0	33	100,0	24	100,0	<i>0,398</i>
Exon 6											
Presença	79	83,2	28	90,3	21	91,3	28	84,8	22	91,7	
Ausência	16	16,8	3	9,7	2	8,7	5	15,2	2	8,3	
Total	95	100,0	31	100,0	23	100,0	33	100,0	24	100,0	<i>0,337</i>

Tabela 10: Continuação

Exon 7											
Presença	85	89,5	24	77,4	15	65,2	29	87,9	15	62,5	
Ausência	10	10,5	7	22,6	8	34,8	4	12,1	9	37,5	
Total	95	100,0	31	100,0	23	100,0	33	100,0	24	100,0	0,012
Exon 8											
Presença	86	90,5	28	90,3	22	95,7	29	87,9	21	87,5	
Ausência	9	9,5	3	9,7	1	4,3	4	12,1	3	12,5	
Total	95	100,0	31	100,0	23	100,0	33	100,0	24	100,0	0,678

Legenda: AM – análise molecular do exons 1, 4, 6, 7 e 8 do gene RA; oligo – oligozoospermico; asteno – astenozoospermicos; terato – teratozoospermicos; azoo – azoospermicos; n – número de pacientes; % – porcentagem; presença – presença do exon normal; ausência – ausência do exon

Teste de Regressão Logística

Os resultados obtidos por meio do estudo comparativo dos hábitos sociais dos pacientes com a análise molecular dos cinco exons estudados (1, 4, 6, 7 e 8) do gene RA, quando analisados os pacientes que tinham hábito tabagista, 10% (3) apresentaram mutação no exon 1, não tendo sido significativa ($P = 0,061$). Com relação ao exon 4, não foi identificado nenhum paciente tabagista que apresentasse mutação neste exon, portanto não tendo sido encontrando relação estatística significativa entre tabagismo e mutação no exon 4 ($P = 0,548$). Ainda, analisando os pacientes tabagistas foi verificado que 16,7% (5) destes apresentaram mutação no exon 6, contudo não houve significância entre tabagismo e mutação no exon 6 ($P = 0,884$); 16,7% (5) apresentaram alteração (mutação) no exon 7, valor de P não significativo ($P = 0,579$); e 3,3% (1) apresentaram mutação no exon 8, e assim como para os demais, não foi verificada relação estatística entre tabagismo e mutação no exon 8 ($P = 0,332$) [Tabela 11].

Quanto ao hábito etilista, 26,2% (22) apresentaram mutação no exon 1, sem significância estatística ($P = 0,801$); 3,6% (2) apresentaram mutação no exon 4, com valor de $P = 0,714$ não significativo; 20,2% (17) apresentaram mutação no exon 6, não encontrando significância para a relação ($P = 0,143$); 28,6% (24) apresentaram mutação no exon 7, que diferentemente dos demais apresentou relação estatisticamente significativa ($P = 0,044$); e 9,5% (8) apresentaram mutação no exon 8, valor de P não significativo ($P = 0,824$) [Tabela 11].

Por meio do estudo comparativo dos pacientes que tiveram contato com agrotóxicos, verificou-se que destes 17% (9) apresentaram mutação no exon 1, com valores de $P = 0,144$,

não tendo sido significativa; 3,8% (3) apresentaram mutação no exon 4, não tendo sido encontrado relação estatisticamente significativa ($P = 0,756$); 11,3% (17) apresentaram mutação no exon 6, $P = 0,368$ (sem significância estatística); 20,8% (11) apresentaram mutação no exon 7, P não significativa ($P = 0,934$); e 11,3% (6) apresentaram mutação no exon 8, sem significância estatística ($P = 0,823$) [Tabela 11].

Quanto aos pacientes que tiveram caxumba, os resultados demonstraram que destes 25% (21) apresentaram mutação no exon 1, sem significância estatística ($P = 0,890$); 2,4% (2) apresentaram mutação no exon 4, valor de P que indica relação estatística não significativa ($P = 0,714$); 16,7% (24) apresentaram mutação no exon 6, não tendo sido significativa ($P = 0,935$); 16,7% (14) apresentaram mutação no exon 7, estatisticamente não significativo ($P = 0,101$); e 7,1% (6) apresentaram mutação no exon 8, não tendo sido verificada relação estatística significativa ($P = 0,359$) [Tabela 11].

Tabela 11: Tabulação comparativa dos hábitos sociais dos pacientes com as análises moleculares dos exons 1, 4, 6, 7 e 8 do gene RA

AM/HS	Tabagismo		Etilismo		Agrotóxico		Caxumba									
	Sim (n) (%)	Não (n) (%)	Sim (n) (%)	Não (n) (%)	Sim (n) (%)	Não (n) (%)	Sim (n) (%)	Não (n) (%)								
Exon 1																
Presença	27	90,0	82	71,3	62	73,8	47	77,0	44	83,0	65	70,7	63	75,0	46	75,4
Ausência	3	10,0	33	28,7	22	26,2	14	23,0	9	17,0	27	29,3	21	25,0	15	24,6
Total	30	100,0	115	100,0	84	100,0	61	100,0	53	100,0	92	100,0	84	100,0	61	100,0
P	<i>0,061</i>		<i>0,801</i>		<i>0,144</i>		<i>0,890</i>									
Exon 4																
Presença	30	100,0	110	95,7	81	96,4	59	96,7	51	96,2	89	96,7	82	97,6	58	95,1
Ausência	0	0,0	5	4,3	3	3,6	2	3,3	2	3,8	3	3,3	2	2,4	3	4,9
Total	30	100,0	115	100,0	84	100,0	61	100,0	53	100,0	92	100,0	84	100,0	61	100,0
P	<i>0,548</i>		<i>0,714</i>		<i>0,756</i>		<i>0,714</i>									
Exon 6																
Presença	25	83,3	97	84,3	67	79,8	55	90,2	47	88,7	75	81,5	70	83,3	52	85,2
Ausência	5	16,7	18	15,7	17	20,2	6	9,8	6	11,3	17	18,5	14	16,7	9	14,8
Total	30	100,0	115	100,0	84	100,0	61	100,0	53	100,0	92	100,0	84	100,0	61	100,0
P	<i>0,884</i>		<i>0,143</i>		<i>0,368</i>		<i>0,935</i>									

Tabela 11: Continuação

Exon 7																	
Presença	25	83,3	88	76,5	60	71,4	53	86,9	42	79,2	71	77,2	70	83,3	43	70,5	
Ausência	5	16,7	27	23,5	24	28,6	8	13,1	11	20,8	21	22,8	14	16,7	18	29,5	
Total	30	100,0	115	100,0	84	100,0	61	100,0	53	100,0	92	100,0	84	100,0	61	100,0	
P		<i>0,579</i>				<i>0,044</i>				<i>0,934</i>				<i>0,101</i>			
Exon 8																	
Presença	29	96,7	102	88,7	76	90,5	55	90,2	47	88,7	84	91,3	78	92,9	53	86,9	
Ausência	1	3,3	13	11,3	8	9,5	6	9,8	6	11,3	8	8,7	6	7,1	8	13,1	
Total	30	100,0	115	100,0	84	100,0	61	100,0	53	100,0	92	100,0	84	100,0	61	100,0	
P		<i>0,332</i>				<i>0,824</i>				<i>0,823</i>				<i>0,359</i>			

Legenda: AM – análise molecular dos exons 1, 4, 6, 7 e 8 do gene *RA* verificando a presença ou ausência destes nas amostras; n – número de pacientes; % – porcentagem; presença – presença do exon normal; ausência – ausência do exon.

Teste qui-quadrado

6. DISCUSSÃO

A infertilidade afeta aproximadamente 10 a 15% dos casais, sendo que o fator masculino isoladamente é responsável por aproximadamente 30% das causas de infertilidade conjugal e, em associação com o fator feminino, por mais de 20%. A espermatogênese é classificada como azoospermia quando não há presença de espermatozóides, oligozoospermia quando há um número reduzido de espermatozóides, astenozoospermia quando a motilidade é defeituosa, teratozoospermia quando a morfologia é anormal. As causas mais comuns de infertilidade masculina relacionam-se a defeitos na espermatogênese, e a maioria das causas é inexplicável ou idiopática, e devido a causas genéticas (Kussler & Coitinho, 2008).

A espermatogênese é um processo que depende da ação de hormônios masculinos, os andrógenos, produzidos pelas células de Leydig nos testículos (Hiort *et al.*, 2000; Vogt, 2004; Balk & Knudsen, 2008). Os andrógenos são essenciais no desenvolvimento e na função reprodutiva masculina, sendo a testosterona, juntamente com FSH, necessária para a espermatogênese normal (Dohle *et al.*, 2003).

Mas, para que os andrógenos atuem sob a espermatogênese, estes precisam se associar ao seu receptor, RA, proteína que quando associada ao andrógeno e por ação de co-fatores, são capazes de translocarem para o núcleo da célula para se ligarem ao DNA e dirigir a transcrição gênica, promovendo a progressão do ciclo celular e consequente produção dos espermatozóides (Kang *et al.*, 2003; Yong *et al.*, 2003; Melo *et al.*, 2005; Balk & Knudsen, 2008).

Alguns estudos afirmam que mutações no gene *RA* podem levar a formação de uma proteína defeituosa, que terá sua função normal afetada. Em homens saudáveis, mutações no gene *RA*, que ocorrem por deleções, inserções ou substituições, podem causar infertilidade masculina, em função do efeito exercido na espermatogênese (Dohle *et al.*, 2003; Vogt, 2004).

No entanto, existem estudos que não encontraram relação entre defeitos no gene *RA* e alteração nos parâmetros seminais. Singh *et al.*, (2006) sequenciou toda a extensão do gene *RA*, todos os exons, 1 a 8, e as extensões CAG e GGN das amostras de homens inférteis, azoospermicos (n = 277), oligozoospermicos (n = 100) e oligoteratozoospermico (n = 22) comparada a uma sequência referência, não encontrando nenhuma mutação no gene *RA* e para as repetições CAG e GGN, encontrou uma variação, mas segundo o autor dentro do padrão

normal. Sugerindo o autor, que mutações no gene *RA* são improváveis causa de oligozoospermia e azoospermia, e devido ao tamanho da amostra de oligoteratozoospermia não ter sido suficientemente grande, não obteve conclusões sobre o papel do gene *RA* em oligoteratozoospermia.

No presente estudo, foram analisadas amostras de homens normais e alterados para o espermograma, oligozoospermicos, astenozoospermicos, teratozoospermicos e azoospermicos. Inicialmente, foi verificada a homogeneidade das idades dos pacientes normais e alterados do laudo do espermograma, que foi em média de 34,37 anos e 34,58 anos, respectivamente, visto que na literatura existem relatos de que o avanço da idade pode ser uma das causas da baixa qualidade seminal (Eskenazi *et al.*, 2003).

O aumento da idade, exposição ao fumo e outros agentes químicos, sendo proporcional ao tempo de exposição, promove a piora na qualidade seminal de forma progressiva nos homens (Pasquolotto *et al.*, 2006). Em relação ao fator idade, estudos demonstram que a qualidade seminal tende a piorar após os 40 anos de idade. A idade paterna avançada foi associada com uma variedade de anomalias, tais como a diminuição na qualidade seminal, numéricos e estruturais, e anormalidades cromossômicas, que podem diminuir a capacidade reprodutiva e a fertilidade, e aumentar a frequência de abortos espontâneos (Eskenazi *et al.*, 2003; Pasquolotto *et al.*, 2006; Angelopoulou *et al.*, 2007).

Isto ocorre devido à redução progressiva do número das células de Sertoli, espermatogônias, espermátocitos, e espermatozóides com o avanço da idade, apesar da espermatogênese não cessar completamente em homens muito idosos (95 anos). A viabilidade e a morfologia espermática são diminuídas com a idade. Além disso, com o envelhecimento os níveis de testosterona na corrente sanguínea, incluindo a testosterona associada a albumina e a testosterona livre, são diminuídos, com uma considerável variabilidade entre indivíduos. Ao contrário, no sangue os níveis de hormônios sexuais ligadas a globulina aumentam com a idade, o que resulta em uma diminuição nos níveis de testosterona livres que são biologicamente ativos (Dakouane-Giudicelli *et al.*, 2006).

Os resultados apresentados neste trabalho indicam não haver diferença entre as idades dos pacientes normais e dos pacientes alterados para o laudo do espermograma, apresentando homogeneidade, ou seja, as médias das idades foram muito próximas, e estatisticamente não apresentaram diferenças.

Entretanto, foi verificado por meio deste estudo se os pacientes alterados tanto para o espermograma quanto para a análise molecular apresentavam entre si diferenças quanto à idade, para tanto foi feita a categorização das idades em três grupos: um grupo mais jovem (0-

29 anos), um grupo intermediário (30-49 anos) e um grupo mais velho (50-69 anos). Os resultados demonstram que quando estabelecida está comparação não foi verificada relação entre idade e mutação no gene *RA*. Porém, é necessário ressaltar que o grupo mais velho (50-69 anos) apresentava apenas 3 pacientes, com espermograma alterado e mutado para o gene *RA*, correspondendo a um número pequeno de pacientes estudados, o que pode ter resultado em valores estatísticos negativos para a relação. Estes achados podem ser corroborados pelo estudo feito por Dakouane-Giudicelli *et al.*, (2006), que pesquisou a extensão da poliglutamina (CAG) em pacientes idosos, na tentativa de justificar a queda da qualidade seminal com o avanço da idade, no entanto não foi encontrada relação entre a extensão das repetições CAG com a queda da qualidade seminal em homens idosos, mas verificou que havia uma diminuição no número de células de Sertoli. Os andrógenos controlam a espermatogênese, mas o RA funcional não está expresso nas células germinativas, e sim nas células de Sertoli, sugerindo que um número adequado destas células seja necessário para concluir o processo normal de espermatogênese, o que é coerente com o papel crucial atribuído as células de Sertoli em mitose, meiose e diferenciação das células germinais (Dakouane-Giudicelli *et al.*, 2006).

As amostras dos pacientes normais e alterados para o espermograma foram analisadas molecularmente para os exons 1, 4, 6, 7 e 8 do gene *RA*. Estes exons codificam para duas regiões importantes do receptor de andrógeno: o exon 1 codifica para TAD, e os exons 4, 6, 7 e 8 para o LBD, juntamente com o exon 5 (não analisado neste trabalho) (Zhu, 2005; Silva-Ramos *et al.*, 2006, Brinkmann, 2006; Rajender *et al.*, 2007). A literatura revela que estes dois domínios, TAD e LBD, são as regiões do gene *RA* onde mais se tem relatos de mutações que causam o fenótipo de infertilidade masculina (Vogt, 2004).

Os dados da análise molecular revelaram que 51,5% dos pacientes estudados, incluindo normais e alterados para espermograma, apresentaram mutação em pelo menos em um dos exons, sendo que dos 51,5% com presença de mutação no gene *RA*, 39% são normais e 61% são alterados para espermograma. Os resultados obtidos nas análises moleculares mostraram que existe relação entre o espermograma e mutações no gene *RA*. O qual pode ser corroborado pelos resultados descritos na literatura, onde é notório o fato de que as mutações no gene *RA* podem afetar a síntese de RA funcionais, acarretando defeitos na espermatogênese, através da disfunção dos interdomínios do RA e das interações com coativadores, levando ao fenótipo de infertilidade masculina (Mifsud *et al.*, 2001; Lund *et al.*, 2003; Vogt, 2004; Gottlieb *et al.*, 2005; Ferlin *et al.*, 2004; Ferlin *et al.*, 2006; Rajender *et al.*, 2007).

Os pacientes com alterações numéricas no espermograma apresentaram uma frequência maior de mutação para o exon 7, sendo que os oligozoospermicos corresponderam a 22,6% dos pacientes e os azoospermicos a 37,5% dos pacientes mutados para o exon 7. Estes dados podem ser corroborados com os achados de Ferlin *et al.*, (2006) que analisou homens com concentração espermática $<10 \times 10^6$ de espermatozoides/mL, em comparação ao controle, constituído por homens normozoospermicos, encontrando vinte mutações em 26 pacientes do total de pacientes estudados (n = 1517), e um elevado número destas mutações se encontravam no exon 1, no entanto ele identificou três mutações pontuais de substituição no exon 7, Val866Met, na qual a valina é substituída por metionina no codon 866, Arg855His, na qual a arginina no codon 855 é substituída por uma histidina, Leu821Val em que a leucina é substituída por uma valina no codon 821. Não foi definido neste estudo, o tipo de alteração encontrada no exon 7, mas foi detectada relação da alteração quanto ao número de espermatozoides.

Entretanto, estudos revelam uma frequência maior de mutações no exon 1 do gene *RA* para pacientes com alterações numéricas, azoospermia e oligozoospermia (Giwerzman *et al.*, 2001; Lund *et al.*, 2003), devido a maioria das pesquisas com pacientes inférteis, serem provenientes de estudos com amostras de pacientes com alterações quanto ao número, sendo poucas pesquisas com pacientes alterados quanto a motilidade e morfologia dos espermatozoides (Erasmuson *et al.*, 2003; Milatiner *et al.*, 2004). Mutações pontuais, de substituição, na qual o aminoácido é substituído por outro aminoácido, devido à transição de nucleotídios, alterando o quadro de leitura, foram identificadas em pacientes oligozoospermicos: Pro390Ser (Hiort *et al.*, 2000), Gly214Arg (Wang *et al.*, 1998b), Met866Val (Ghadessy *et al.*, 1999); e azoospermicos: Asn233Lys (Giwerzman *et al.*, 2001).

Resultados de algumas pesquisas concluem que longas repetições CAG e GGN estejam relacionadas à baixa concentração de espermatozoides no ejaculado (Mifsud *et al.*, 2001; Ruhayel *et al.*, 2004; Ferlin *et al.*, 2004). Todavia, essa relação é ainda contraditória, ao mesmo tempo em que existe uma série de pesquisas que confirmam a relação entre a extensão da repetição em tandem de CAG e GGN com infertilidade masculina, existe uma série de outras pesquisas que não encontraram tal associação (Thangaraj *et al.*, 2002; Wallerand *et al.*, 2001; Peterlin *et al.*, 2007; Saare *et al.*, 2008). Ruhayel *et al.*, (2004) encontrou associação da longa extensão da repetição CAG com defeitos na espermatogênese, azoospermia e oligozoospermia severa, em homens de origem sueca, em comparação com o grupo controle de pacientes férteis, verificando a associação quando foram analisadas as extensões CAG e GGN combinadas. Ferlin *et al.*, (2004) também encontrou associação entre

as repetições CAG e GGN quando analisadas em conjunto, verificando que homens inférteis (de população caucasiana) apresentavam a combinação de CAG =21/GGC =18 (21 repetições CAG e 18 repetições GGC) e raramente CAG \geq 23/ GGC \leq 16. Já Westerveld *et al.*, (2008) não encontrou associação entre a extensão das repetições CAG em nenhum dos parâmetros seminais estudados por ele (volume, concentração, motilidade, morfologia, número total e número total de espermatozoides móveis), no qual analisou homens de origem holandesa, asiática, norte e centro africanos.

Rajender *et al.*, (2007) discute que estas contradições possam estar relacionadas a etnia dos grupos estudados, visto que pesquisas desenvolvidas com população asiática e oriental, China, Singapura, Israel, entre outros, apresentaram associação, e pesquisas realizadas com população europeia e alguns asiáticos, Alemanha, Itália, Suécia, Irã, Turquia, entre outros, não encontraram associação. Contudo, Mifsud *et al.*, (2001) mostrou que associação ou não da repetição com fenótipo de infertilidade, são independentes da etnicidade, encontrando a associação da extensão das repetições CAG (\geq 26 repetições) em pesquisa com homens azoospermicos de etnias diferentes, Singapura e Texas, USA.

Nos pacientes com alterações morfológicas dos espermatozoides foi verificado, neste estudo, que 51,5% apresentaram mutado para o exon 1, o que é sugestivo de que o exon 1 pode levar a alterações no espermograma quanto à morfologia, não apenas a alterações numéricas. Os dados apresentados podem ser corroborados com os achados de Milatiner *et al.*, (2004) o qual estudou o exon 1, para o polimorfismo CAG (repetições em tandem CAG), em pacientes de origem árabe e judaica de Jerusalém, com defeitos na concentração (número de espermatozoides/mL), na motilidade e na morfologia, encontrando relação apenas para os pacientes teratozoospermicos, afirmando que extensões mais longas das repetições do polimorfismo CAG pode levar a defeitos quanto a morfologia nos espermatozoides.

A mutação de substituição Gln58Leu, glutamina por uma leucina, no codon 58 no exon 1 identificada em um paciente oligoastenoteratozoospermicos por Lund *et al.*, (2003), sustentam que mutações no exon 1 podem estar relacionadas a morfologia dos espermatozoides, corroborando assim com os dados obtidos neste estudo, visto que a mutação no gene *RA* ocorreu no exon 1 e afetou a morfologia espermática do indivíduo (Lund *et al.*, 2003; Rajender *et al.*, 2007).

Quanto à motilidade, observou-se neste trabalho que 34,8% dos pacientes astenozoospermicos apresentaram mutação para o exon 7. No entanto, até o momento não foi encontrado dados na literatura que afirmem que pacientes astenozoospermicos apresentam algum tipo de mutação no gene *RA*, sejam elas mutações de substituições ou de alterações na

extensão das repetições CAG e/ou GGN. Milatiner *et al.*, (2004) e Westerveld *et al.*, (2008) analisaram a extensão da repetição CAG para os parâmetros quanto a motilidade, não encontrado associação. Já Pertelin *et al.*, (2007) verificou a associação do número de repetição CAG em homens oligoastenoteratozoospermicos, que são pacientes alterados quanto ao número, a motilidade e a morfologia, e também não encontrou correlação.

O grupo normal para o espermograma, neste estudo, apresentou mutações no gene *RA*, porém com uma frequência menor. No entanto, existem relatos de mutações encontradas em homens inférteis que foram encontradas também em homens férteis. Assim, a especificidade dessas mutações e o papel que exercem, ou deixam de exercer, levando a infertilidade ainda não estão claros, já que algumas das mutações como a Gln58Leu têm sido relatadas por existirem também em populações em condições normais; ou ainda identificadas para fenótipos mais graves como o câncer de próstata, CAIS ou PAIS (Ranjender *et al.*, 2007).

No database para mutações no gene *RA* é possível identificar algumas mutações que foram encontradas para diferentes fenótipos, como a Pro340Leu no exon 1 do gene *RA*, identificada primeiro, na década de 90, para o câncer de próstata, e posteriormente em 2006, em pacientes inférteis com concentração espermática baixa; a Met780Ile, identificada primeiramente para CAIS, mais tarde para PAIS e mais recentemente para infertilidade masculina (Ferlin *et al.*, 2006) (<http://androgendb.mcgill.ca/AR23C.pdf>).

Podem ocorrer ainda, mutações pontuais que não alteram o quadro de leitura, ou seja, não ocorre substituição de um aminoácido por outro diferente, devido a alguns aminoácidos apresentarem mais de um codon de leitura. Hiort *et al.*, (2000) verificou em sua pesquisa com homens inférteis (oligoteratozoospermia, teratozoospermia e azoospermia) em comparação com controle (homens férteis), a mutação de substituição no codon 211, em 33 dos 180 pacientes estudados e 11 dos 53 controles férteis, devido a transição de uma guanina por uma adenina, porém não alterando o aminoácido codificado, glutamato. Esta mesma alteração foi identificada em pesquisas anteriores, como a de Wang *et al.*, (1998b) (<http://androgendb.mcgill.ca/AR23C.pdf>).

Por meio das análises dos exons 1, 4, 6, 7 e 8 para as categorias estabelecidas do resultado do espermograma, neste estudo, observou-se que os únicos exons que se mostraram significativos para esta análise foram o 1 e o 7.

As análises dos exons 4, 6 e 8 não apresentaram significância para a relação destes com defeitos na espermatogênese, no entanto alguns pacientes apresentaram mutação nestes exons. No database (<http://androgendb.mcgill.ca/AR23C.pdf>) para mutações indentificadas no gene *RA*, existem mutações nestes exons que estão relacionadas com o fenótipo de

infertilidade masculina. No exon 4 podemos citar a mutação Ala645Asp, substituição da alanina por aspartato, no codon 645 identificado por Ferlin *et al.*, (2006) em homens com baixa concentração espermática ou ainda a deleção do exon 4 em pacientes azoospermicos (<http://androgendb.mcgill.ca/AR23C.pdf>); no exon 6 a mutação Gln798Glu, no qual o aminoácido glutamina é substituído por um ácido glutâmico, no codon 798 (Hiort *et al.*, 2000) em homens oligoteratozoospermicos; exon 8 a mutação Met886Val, onde há a substituição do aminoácido metionina por uma valina em pacientes oligozoospermicos (Ghadessy *et al.*, 1999). Embora este estudo não tenha apresentado resultados significativos para mutações nos exons 4, 6 e 8, é fato que estas mutações sejam causa de infertilidade masculina por afetarem a espermatogênese, o que já está bem estabelecido em outros estudos.

A maioria das mutações em homens inférteis resulta na redução do potencial de transativação da proteína, isso por que a grande maioria das mutações relacionadas a defeitos na espermatogênese se encontra no TAD e no LBD (Vogt, 2004; Rajender *et al.*, 2007). A mutação Gly214Arg no exon 1, conferiu a proteína uma capacidade de transativação reduzida em 20% comparado ao tipo selvagem, não mutado (Wang *et al.*, 1998b), já Met886Val no exon 8 causou uma redução de 50% do potencial de transativação da proteína (Ghadessy *et al.*, 1999).

Existem dados que evidenciam que mutação no TAD, no exon 1, e no domínio LBD, exons 4 a 8, devido aos subdomínios de transativação presentes nestes, AF-1 e AF-5 (TAD) e AF-2 (LBD), conferem além de redução na atividade de transativação da proteína, diminuição da afinidade de ligação ao andrógeno, e de interação dos domínios TAD e LBD, e/ou ainda diminuição da interação com co-reguladores, acarretando uma proteína defeituosa e podendo comprometer o desenvolvimento normal de formação dos espermatozoides, a espermatogênese (Hiort *et al.*, 2000; Gottlieb *et al.*, 2005; Rajender *et al.*, 2007). A mutação N727K, substituição da asparagina por lisina no exon 5, localizada dentro do LBD, não alterou a ligação ao andrógeno, mas apresentou uma redução em 50% da capacidade de transativação da proteína e interrompeu as interações interdomínio (interação entre os LBD e TAD) e com co-ativadores, fator intermediário de transcrição 2 (TIF2 – *Transcription Intermediary Factor 2*) (Lim *et al.*, 2000).

Como já discutido anteriormente, a exposição a agentes químicos, como cigarro e bebidas alcóolicas pode ser prejudicial à qualidade seminal, sendo proporcional ao tempo de exposição (Eskenazi *et al.*, 2003). Estudos demonstram que o cigarro pode causar danos a reprodução, como a diminuição no volume seminal até a fragmentação no DNA dos espermatozoides. Além do cigarro, uma série de substâncias de exposição ocupacional tem

sido considerada deletéria para o sistema reprodutivo masculino, como pesticidas e agrotóxicos (Pasquolotto *et al.*, 2006).

Algumas dessas substâncias químicas têm a capacidade de interferir no funcionamento do sistema endócrino, no mecanismo de ação dos hormônios, os chamados desreguladores endócrinos (DE) (Queiroz & Waissmann, 2006; Dib *et al.*, 2007). Os DE são substâncias químicas, exógenos ao organismo humano ou animal, que exercem ação hormonal e podem assim, alterar a homeostase do sistema endócrino. Muitos destes compostos interferem no desenvolvimento do sistema endócrino e afetam o funcionamento dos órgãos que respondem aos sinais hormonais. Os efeitos endócrinos e reprodutivos dos DE podem ser uma consequência da capacidade deles, em: mimetizar os hormônios naturais, antagonizar a sua ação, alterar o seu padrão de síntese e metabolismo, ou modificar as expressões específicas de receptores (Koiffman & Paumgarten, 2002; Olea-Serrano *et al.*, 2002).

Essa interferência pode ser temporária ou permanente. Os principais efeitos da exposição a agentes químicos sobre a fertilidade masculina são reduções temporais na concentração espermática e qualidade, e até hipospádia (Queiroz & Waissmann, 2006).

No presente estudo, foram relacionados os hábitos sociais dos pacientes analisados, normais e alterados, com a análise molecular do gene *RA*, com intuito de verificar se existia relação entre eles, no entanto, o tabagismo, agrotóxico e a caxumba não foram significantes, indicando que não há relação com alterações moleculares para os exons estudados, 1, 4, 6, 7 e 8. Contudo, o etilismo apresentou significativo para a relação etilismo e mutação no exon 7 do gene *RA*, mas não foi encontrado, até o momento, dados na literatura que tenham analisado a relação entre as mutações no gene *RA* e agentes químicos, de exposição ocupacional ou não, e a caxumba.

Estudos sobre os efeitos do álcool revelam, que dentre os efeitos da utilização crônica de álcool, a longo prazo, incluem a disfunção erétil, redução da libido, e ginecomastia, devido à redução da testosterona no soro que é causada por diminuição da produção testicular e aumento metabólico no fígado. Acredita-se que o alcoolismo e a cirrose hepática causam alterações no eixo hipotálamo-hipófise-gônada (HPG), que resulta em disfunção testicular. Além disso, a oxidação de álcool compete com produção de testosterona testicular. Estes mecanismos conduzem subsequente diminuição do volume seminal e densidade espermática. Ocorre ainda uma elevação de estrogênio no soro causada pela conversão periférica de testosterona em estrógeno por aumento na atividade da enzima aromatase, que está presente tanto no fígado quanto nas células adiposas. No entanto, a ingestão de álcool socialmente, parece não interferir na qualidade do sêmen. Já o excesso de álcool pode causar diminuição

das concentrações séricas de testosterona, redução da sensibilidade e da inervação do pênis e, portanto, também pode contribuir para a disfunção erétil (Pasquolotto *et al.*, 2004).

O presente estudo teve como principal objetivo verificar se alterações no gene *RA*, exons 1, 4, 6, 7 e 8, poderiam estar correlacionadas a defeitos na espermatogênese, ocasionando infertilidade.

Contudo, faz-se necessário identificar as mutações, em quais regiões do gene *RA* elas ocorreram e o tipo. Para tanto, serão necessários estudos mais aprofundados, nos quais o gene *RA* seja seqüenciado, permitindo identificar que tipo de mutação está presente; e/ou ainda desenvolver modelos de expressão do gene *RA* normal ou com os diferentes tipos de mutações, já bem descritas. A expressão do gene *RA* possibilitará o estudo da proteína RA, avaliando a sua função quando normal ou alterada por mutação neste gene e sua interação com seus co-reguladores.

As modernas técnicas de reprodução permitem que pacientes com infertilidade masculina idiopática tenham filhos. A melhor técnica a ser aplicada, dependerá em primeiro lugar dos parâmetros seminais do paciente e em segundo de uma análise molecular minuciosa, para identificar a causa da infertilidade (quando analisado). Em muitos casos de azoospermia, utiliza-se a injeção intracitoplasmática (ICSI – *intracytoplasmic sperm injection*) para obter uma gestação, mas dependendo do tipo de mutação do genitor, esta pode ser herdada pela prole (filha). Uma concepção por ICSI pode resultar em um progênie afetado que poderá desenvolver um fenótipo ainda mais grave que o encontrado no genitor, por exemplo: se o genitor apresentar alteração na extensão da repetição CAG (longas) está será herdada pela progênie, que portará a longa extensão da repetição CAG, podendo desenvolver até SBMA que é causada por longas extensões de repetições da poliglutamina (CAG) (Mengual *et al.*, 2003). O aconselhamento genético, baseado nas análises moleculares do gene *RA*, poderá esclarecer o casal em tratamento quais os problemas de uma ICSI e permitir que o casal decida pelo prosseguimento ou não do tratamento.

7. CONCLUSÃO

O presente trabalho analisou homens que procuraram ajuda no Laboratório de Reprodução Humana do HC-UFG, por apresentarem dificuldades para gerarem filhos. Estes passaram por um rastreamento genético, para verificar a presença de mutação no gene *RA*, exons 1, 4, 6, 7 e 8. Sendo assim, verificou-se que mutações no exon 1 e 7 são prováveis causas de alterações no espermograma no que diz respeito a morfologia, motilidade e ao número de espermatozoides, respectivamente. Verificou-se ainda que o etilismo pode ser um fator agravante para mutações no gene *RA*.

Portanto, todos os dados obtidos por meio deste estudo são sugestivos de que mutações no gene *RA* causam alteração na função normal do RA, que resulta em espermatogênese anormal, levando a infertilidade masculina idiopática. E que o estado de infertilidade do indivíduo não depende apenas das alterações nas sequências do gene *RA*, mas também dos hábitos que ele possui, como o etilismo.

8. PERSPECTIVAS

Neste trabalho verificou-se apenas a presença e ausência dos exons 1, 4, 6, 7 e 8 do gene *RA* em pacientes com infertilidade masculina idiopática. Estes pacientes apresentavam diferentes parâmetros seminais, categorizados como normais, oligozoospermicos, astenozoospermicos, teratozoospermicos e azoospermicos.

Em estudos futuros, o grupo pretende clonar e seqüenciar os produtos da amplificação dos os exons 1, 4, 6, 7 e 8 do gene *RA*, quando possível. Amplificar as amostras com primers que permitem, por multiplex, sequenciar os produtos. O seqüenciamento possibilitará a comprovação da existência de mutação, bem como a identificação do tipo de mutação contida nos respectivos exons. Além destes exons analisados no presente trabalho, outros exons como 2, 3 e 5, assim como outras regiões do gene *RA* denominadas de extensões de polimorfismo (CAG e GGN), relacionadas aos defeitos na espermatogênese, levando a infertilidade, poderão ser estudados também.

Caso seja viável, será de grande importância realizar o estudo *in vivo* com a criação de um modelo de transfecção em ratos e verificar de que forma as mutações nas diferentes regiões do gene *RA* interferem na composição de resíduos de aminoácidos da proteína RA, na estrutura e em sua função.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AKINGBEMI, B.T. **Estrogen regulation of testicular function.** *Reproductive Biology and Endocrinology*, v.3, n. 51, p.1-13, 2005.
- ANGELOPOULOU, R.; PLASTIRA, K. e MSAOUEL, P. **Spermatozoal sensitive biomarkers to defective protaminosis and fragmented DNA.** *Reproductive Biology and Endocrinology*, v. 5, n. 36, p. 1-15, 2007.
- ANTUNES JÚNIOR, N.; BADRA, G.H.; CORDTS, E.B. *et. al.* **Fertilização *In Vitro* com Ciclos Programados de Baixo Custo – Avaliação de Resultados Iniciais de um Centro de Reprodução Humana de Hospital de Ensino.** *RBGO*, v. 25, n. 9, p. 679-686, 2003.
- AYRES, M.; AYRES JÚNIOR, M.; AYRES, D.L. *et. al.* **BioEstat – Aplicações estatísticas nas áreas das Ciências Bio-médicas.** Belém- Pará, Brasil. 2007.
- BALK, S.P.; KNUDSEN, K.E. **AR, the cell cycle, and prostate cancer.** *NRS*, v. 6, p.1-12, 2008.
- BANNO, H.; ADACHI, H.; KATSUMO, M. *et. al.* **Mutant androgen receptor acumulation in spinal and bulbar muscular atrophy scrotal skin: a pathogenic marker.** *Annals of Neurology*, v. 59, n. 3, p.520-526, 2006.
- BARBARO, M.; OSCARSON, M.; ALMSKOG, I. *et. al.* **Complete androgen insensitivity without Wolffian duct development: the AR-A form of the androgen receptor is not sufficient for male genital development.** *Clinical Endocrinology*, v. 66, n. 6, p.822–826, 2007.
- BASSAS, L. **Espermatogénesis e Infertilidad.** *Revista Iberoamericana de fertilidad*. 1º Congresso ASEBIR, v.18 n.4, p.11-17, 2001.

- BORDIN, B.M.; ARRUDA, J.T.; MIRANDA, L.C.B. *et. al.* **Alterações no espermograma e a associação com tabagismo e etilismo.** In: 32 Cong. Bras. Análises clínicas, 2005. Anais 32º Cong. Bras. Análises clínicas. Goiânia-GO, 2005.
- BRINKMANN, A.O. **Chapter 3. Androgen Physiology: Receptor and Metabolic Disorders.** 2006. Disponível em: <<http://www.endotext.org/male/male3/index.html>>. Acesso em: 22 fevereiro 2009.
- BRINKMANN, A.O.; TRAPMAN, J. **Genetic analysis of androgen receptors in development and disease.** Adv.Pharmacol, v. 47, p.317-341, 2000.
- CHU, J.; ZHANG, R.; ZHAO, Z. *et. al.* **Male fertility is compatible with an Arg(840)Cys substitution in the AR in a large Chinese family affected with divergent phenotypes of AR insensitivity syndrome.** J. Clin.Endocrinol.Metab, v. 87, n. 1, p.347-351, 2002.
- DAKOUANE-GIUDICELLI, M.; LEGRAND, B.; BERGERE, M. *et. al.* **Association between androgen receptor gene CAG trinucleotide repeat length and testicular histology in older men.** Fertility and Sterility, v. 86, n. 4, p.873-877, 2006.
- DAM, A.H.D.M.; KOSCINSKI, I.; KREMER, J.A.M. *et. al.* **Homozygous Mutation in SPATA16 is Associated with Male Infertility in Human Globozoospermia.** The American Journal of Human Genetics, v. 81, n. 4, p.813-820, 2007.
- DAVIS-DAO, C.A.; TUAZON, E.D.; SOKOL, R.Z. *et. al.* **Male infertility and variation in CAG repeat length in the androgen receptor gene: a meta-analysis.** J. Clin Endocrin Metab, v. 92, n. 11, p.4319-26, 2007.
- DIB, M.A.; ZANATTAOLIVEIRA, L.R.; DIAS, O.A. *et. al.* **Avaliação da qualidade do sêmen e do estado geral de saúde de frentistas de postos de gasolina da cidade de Goiânia.** Estudos, Goiânia – Go, v. 34, n. 11/12, p. 957-977, 2007.
- DOHLE, G.R.; SMIT, M.; WEBER, R.F.A. **Androgens and male fertility.** World J Urol, v. 21, p.341-345, 2003.

- ELHAJI, Y.A.; WU, J.H.; GOTTLIEB, B. *et. al.* **An examination of how different mutations at arginine 855 of the androgen receptor result in different androgen insensitivity phenotypes.** *Molecular Endocrinology*, v. 18, n. 8, p.1876-1886, 2004.
- ERASMUSON, T.; SIN, I.L.; SIN, F.Y.T. **Absence of association of androgen receptor trinucleotide expansion and poor semen quality.** *International Journal of Andrology*, v. 26, p.46–51, 2003.
- ESKENAZI, B.; WYROBEK, A.J.; SLOTER, E. *et. al.* **The association of age and semen quality in healthy men.** *Human Reproduction*, v. 18, n. 2, p.447-454, 2003.
- FERLIN, A.; BARTOLINI, L.; RIZZO, G. *et. al.* **Androgen receptor gene CAG and GGC repeat lengths in idiopathic male infertility.** *Molecular Human Reproduction*, v. 10, n. 6, p.417-421, 2004.
- FERLIN, A.; VINANZI, C.; GAROLLA, A. *et. al.* **Male infertility and androgen receptor gene mutations: clinical features and identification of seven novel mutations.** *Clinical Endocrinology*, v. 65, n. 5, p.606-610, 2006.
- GHADESSY, F.J.; LIOW, S.L.; YONG, E.L. **Mutations in the promoter region of the androgen receptor gene are not common in males with idiopathic infertility.** *Molecular Human Reproduction*, v. 5, n. 3, p.287-290, 1999.
- GILBERT, S.F. **Biologia do Desenvolvimento.** Tradução e Revisão: Adolfo Max Rothschild, Zuleika Rothschild, Francisco A. de Moura Duarte, Maria Helena Corrêa Marques. 5ed. Ribeirão Preto, SP: Ed. FUNPEC, 2003, p.774-804.
- GIWERCMAN, Y.L.; NIKOSHKOV, A.; BYSTRÖM, B. *et. al.* **A novel (N233K) mutation in the transactivating domain and the N756S mutation in the ligand binding domain of the androgen receptor gene associated with infertility.** *Clin Endocrinol(Oxf)*, v. 54, n. 6, p.827-34, 2001.
- GOTTLIEB, B. (Curador). **Database: The Androgen Receptor Gene Mutations Database World Wide Web Server.** The Lady Davis Institute for Medical Research. Sir Mortimer B. Davis Jewish General Hospital. Montreal, Quebec, Canada. Atualizado

em setembro, 2008. Disponível em: <<http://androgendb.mcgill.ca/AR23C.pdf>>. Acessado em: 10 fevereiro 2009.

GOTTLIEB, B.; LOMBROSO, R.; BEITEL, L.K. *et. al.* **Symposium: Genetic aspects of male (in)fertility. Molecular pathology of the androgen receptor in male (in)fertility.** *Reprod Biomed Online*, v. 10, n. 1, p. 42-8, 2005.

GRISWOLD, M.D. **The central role of Sertoli cells in spermatogenesis.** *Seminars in Cell & Developmental Biology*, v. 9, n. 4, p.411-416, 1998.

GSUR, A.; MARTIN, P.; GERALD, H. *et. al.* **Polymorphic CAG repeats in the androgen receptor gene, prostate-specific antigen polymorphism and prostate cancer risk.** *Carcinogenesis*, v. 23, n. 10, p.1647-1651, 2002.

HEINLEIN, C.A.; CHANG, C. **Androgen Receptor (AR) Coregulators: An Overview.** *Endocrine Reviews*, v. 23, n. 2, p.175–200, 2002.

HEINLEIN, C.A.; CHANG, C. **Androgen Receptor in Prostate Cancer.** *Endocrine Reviews*, v. 25, n. 2, p.276–308, 2004.

HIORT, O.; HOLTERHUS, P.M.; HORTER, T. *et. al.* **Significance of Mutations in the Androgen Receptor Gene in Males with Idiopathic Infertility.** *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, v. 85, n. 8, p.2810-2815, 2000.

IGARASHI, S.; TANNO, Y.; ONODERA, O. *et. al.* **Strong correlation between the number of CAG repeats in androgen receptor genes and the clinical onset of features of spinal and bulbar muscular atrophy.** *Neurology*, v. 42, n. 12, p.2300-2, 1992.

IRVINE, R.A.; YU, M.C.; ROSS, R.K. *et. al.* **The CAG and GGC Microsatellites of the Androgen Receptor are in linkage disequilibrium in Men with Prostate Cancer.** *Cancer Research*, v. 55, n. 9, p.1937-1940, 1995.

JACOB, S.W.; FRANCONI, C.A.; LOSSOW, W.J. **Anatomia e Fisiologia Humana.** 5ª ED. Ed. Guanabara Koogan, 1990.

- KANG, H.Y.; TSAI, M.Y.; CHANG, C. *et. al.* **Mechanisms and Clinical Relevance of Androgens and Androgen Receptor Actions.** Chang Gung Med J, v. 26, n. 6, p.388-402, 2003.
- KIM, S.; BARDWELL, V.J.; ZARKOWER, D. **Cell type-autonomous and non-autonomous requirements for Dmrt1 in postnatal testis differentiation.** Dev Biol. v. 307, n. 2, p.314–327, 2007.
- KOIFMAN, S.; PAUMGARTTEN, F.J.R. **Impact of environmental endocrine-active substances on Public Health.** Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 18, n. 2, p.354-355, 2002.
- KUSSLER, A.P.; COITINHO, A.S. **Técnicas de reprodução assistida no tratamento da infertilidade.** RBAC, v. 40, n. 4, p.313-315, 2008.
- LARRIBA, S.; BONACHE, S.; SARQUELLA, J. *et. al.* **Molecular evaluation of CFTR sequence variants in male infertility of testicular origin.** International Journal of Andrology, v. 28, n. 5, p.284-290, 2005.
- LEHMANN, D.J.; BUTHER, H.T.; WARDEN, D.R. *et. al.* **Association of the androgen receptor CAG repeat polymorphism with Alzheimer's disease in men.** Neuroscience Letters, v. 340, n. 2, p.87-90, 2003.
- LEHMANN, D.J.; HOGERVORST, E.; WARDEN, D.R. *et. al.* **The androgen receptor CAG repeat and serum testosterone in the risk of Alzheimer's disease in men.** J Neurol Neurosurg Psychiatry, v. 75, n. 1, p.163-164, 2004.
- LEWIN, B. **Genes VII.** Tradução Henrique Ferreira. Porto Alegre: Artmed Editora, 2001. p. 627-629.
- Li, Z. X, Tang WH, Wang ZH *et. al.* **(CAG)n polymorphism of androgen receptor gene in idiopathic azoospermic and oligozoospermic Chinese men.** Zhonghua Nan Ke Xue, v. 11, n. 5, p.335-8, 342, 2005.
- LIM, J.; GHADESSY, F.J.; ABDULLAH, A.A.R. *et. al.* **Human Androgen Receptor mutation disrupts ternary interactions between ligand, receptor domain, and the**

coactivator TIF2 (Transcription Intermediary Fator 2). Mol Endocrinol, v. 14, n. 8, p.1187- 97, 2000.

LOBOCCARO, J.M.; LUMBROSO, S.; BILON, C. *et. al.* **Androgen receptor gene mutation in male breast cancer.** Hum Mol Genet, v. 2, n. 11, p.1799-802, 1993.

LUBAHN, D.B.; BROWN, T.R.; SIMENTAL, J.A. *et. al.* **Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identification for a point mutation in a family with complete androgen insentivity.** Medical Sciences, v. 86, n. 23, p.9534-9538, 1989.

LUNA F. **Assisted reproductive technology in Latin America. Some ethical and sociocultural issues.** In: Vayena E, Rowe PJ, Griffin PD, editors. Current practices and controversies in assisted reproduction. 1st ed. Geneva: WHO Library; 2002. p.31-40.

LUND, A.; JUVONEN, V.; LÄHDETIE, J. *et. al.* **A novel sequence variation in the transactivation regulating domain of the androgen receptor in two infertile Finnish men.** Fertility and Sterility, v. 79, n. 3, p.1647-1648, 2003.

MELO, K.F.S.; MENDONÇA, B.B.; BILLIBECK, A.E.C. *et. al.* **Síndrome de Insensibilidade aos Andrógenos: Análise Clínica, Hormonal e Molecular de 33 Casos.** Arq Bras Endocrinol Metab, v. 49, n. 1, p.87-97, 2005.

MENGUAL, L.; ORIOLA, J.; ASCASO, C. *et. al.* **An Increased CAG repeat length in the Androgen Receptor gene in Azoospermic ICSI Candidates.** Journal of Andrology, v. 24, p.279-284, 2003

MIFSUD, A.; CHOON, A.T.; FANG, D. *et. al.* **Prostate-specific antigen, testosterone, sex-hormone binding globulin and androgen receptor CAG repeat polymorphisms in subfertile and normal men.** Molecular Human Reproduction, v. 7, n. 11, p.1007-1013, 2001.

MILATINER, D.; HALLE, D.; HUERTA, M. *et. al.* **Associations between androgen receptor CAG repeat length and sperm morphology.** Human Reproduction, v. 19, n. 6, p.1426-1430, 2004.

MONTEIRO FILHO, G. **Segredos da estatística em pesquisa científica**. 1ª Ed. Gráfica e Ed. Vieira. Goiânia – Go, 2004.

MOONEY, S.D.; KLEIN, T.E.; ALTMAN, R.B. *et. al.* **A functional analysis of disease-associated mutations in the androgen receptor gene**. *Nucleic Acids Research*, v. 31, n. 8, p.1-5, 2003.

MOORE, K.L.; PERSAUD, T.V.N. **Embriologia Básica**. Traduzido por Fernando Simão Vugman. 4ª ed. Ed. Guanabara Koogan. 1995, p.179-186.

MORI, M.M.; CEDENHO, A.P.; KOIFMAN, S. *et. al.* **Sperm characteristics in a sample of healthy adolescents in Sao Paulo, Brazil**. *Cad. Saúde Pública*, v. 18, n. 2, p.525-530, 2002.

National Center for Biotechnology Information – NCBI. Nucleotide. Disponível em: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide&cmd=search&term=<=>](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=nucleotide&cmd=search&term=). Acesso em: 23 fev. 2006.

O'DONNELL, L.; ROBERTSON, K.M.; JONES, M.E. *et. al.* **Estrogen and Spermatogenesis**. *Endocrine Reviews*, v. 22, n. 3, p.289–318, 2001.

OLEA-SERRANO, N.; FERNÁNDEZ-CABRERA, M.F.; PULGAR-ENCINAS, R. *et. al.* **Endocrine disrupting chemicals. Harmful substances and how to test them**. *Cad. Saúde Pública*, Rio de Janeiro, v. 18, n. 2, p.489-494, 2002.

OMBELET, W.; COOKE, I.; DYER, S. *et. al.* **Infertility and the provision of infertility medical services in developing countries**. *Human Reproduction Update*, v. 14, n. 6, p.605-621, 2008.

Organização Mundial da Saúde - OMS. **Manual de Laboratório para o Exame do Sêmen Humano e Interação Esperma-Muco Cervical**. São Paulo, SP: Editora Santos, 1994.

PASQUALOTTO, E.B.; FERREIRA, R.V.; FONSECA, G.P. *et. al.* **A análise seminal deve ser requisitada para homens com historico de fertilidade prévia?** *Rev Bras Ginecol Obstet*, v. 28, n. 11, p.652-7, 2006.

- PASQUALOTTO, F.F.; LUCON, A.M.; Sobreiro, B.P. *et. al.* **Effects of medical therapy, alcohol, smoking, and endocrine disruptors on male infertility.** REV. HOSP. CLÍN. FAC. MED, S. PAULO, v. 59, n. 6, p.375-382, 2004.
- PETERLIN, B.; ZORN, B.; TERAM, N. *et. al.* **Analysis of the CAG repeat number in exon 1 of the androgen receptor gene in Slovene men with idiopathic azoospermia and oligoasthenoteratozoospermia.** Asian Journal of Andrology, v. 9, n. 2, p.280-282, 2007.
- POIROT, C.; CHERRUAU, B. **Infertilidad masculina: Aspectos clínicos e investigaciones biológicas.** Acta Bioquím Clín Latinoam, v. 39, n. 2, p.225-41, 2005.
- QUEIROZ, E.K.R.; WAISSMANN, W. **Occupational exposure and effects on the male reproductive system.** Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 22, n. 3, p.485-493, 2006.
- RAJENDER, S.; SINGH, L.; THANGARAJ, K. **Phenotypic heterogeneity of mutations in androgen receptor gene.** Asian J Androl, v. 9, n. 2, p.147-179, 2007.
- RUHAYEL, Y.; LUNDIN, K.; GIWERCMAN, Y. *et. al.* **Androgen receptor gene GGN and CAG polymorphisms among severely oligozoospermic and azoospermic Swedish men.** Human Reproduction, v. 19, n. 9, p.2076-2083, 2004.
- RUIZ, E.C.R. **Avaliação da inseminação artificial de baixo custo como alternativa de acesso de populações carentes às tecnologias reprodutivas.** Dissertação de Mestrado. Aracaju - Sergipe, Fevereiro de 2008.
- SAARE, M.; BELOUSOVA, A.; PUNAB, M. *et. al.* **Androgen receptor gene haplotype is associated with male infertility.** International journal of andrology, v. 31, n. 4, p.395-402, 2008.
- SAMBROOK, J.; RUSSELL, D.W. **Molecular Cloning: A Laboratory Manual.** 3ªEd. New York, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2001.
- SASAGAWA, I.; SUZUKI, Y.; TATENO, T. *et. al.* **CAG repeat length of the androgen receptor gene in Japanese males with cryptorchidism.** Molecular Human Reproduction. V. 6, n. 11, p.973-975, 2000.

- SILVA-RAMOS, M.; OLIVEIRA, J.M.; CABEDA, J.M. *et. al.* **The CAG Repeat within the Androgen Receptor Gene and Its Relationship to Cryptorchidism.** International Braz J Urol, v. 32, n. 3, p.330-335, 2006.
- SINGH, R.; DEEPA, S.R.; MADHAVI, S. *et. al.* **Male Infertility: No Evidence of Involvement of Androgen Receptor Gene Among Indian Men.** Journal of Andrology, v. 27, n. 1, p.102-105, 2006.
- SULEK, A.; HOFFMAN-ZACHARSKA, D.; KRYSA, W. *et. al.* **CAG repeat polymorphism in the androgen receptor (AR) gene of SBMA patients and a control group.** J Appl Genet, v. 46, n. 2, p.237-239, 2005.
- SUN, F.; KO, E.; MARTIN, R.H. **Is there a relationship between sperm chromosome abnormalities and sperm morphology?** Reproductive Biology and Endocrinology, v. 4, n. 1, p.1-15, 2006.
- TELÖKEN, C.; BADALOTTI, M.; PALKA, M.T.F. **Infertilidade Masculina – Guia Prático de Urologia.** Capítulo 52. 2005, p.305-312. Disponível em: <<http://www.sbu-mg.org.br>>. Acesso em: agosto de 2008.
- THANGARAJ, K.; JOSHI, M.B.; REDDY, A.G. *et. al.* **CAG repeat expansion in the Androgen Receptor Gene is not associated with Male Infertility in Indian Populations.** Journal of Andrology, v. 23, n. 6, p.815-818, 2002.
- THIENSEN, K.; FILLIPINI, A.F.; SILVA, A.S. *et. al.* **Infertilidade Feminina.** Revista LAES e HAES, v. 138, n. 23, p.164-208, 2002.
- TOBO, P.R.; BARBOSA, A.S.; BARBOSA, L.G. *et. al.* **Three novel mutations in the androgen receptor gene associated with partial androgen insensitivity syndrome: H570R, G589E and S759T.** Einstein, v. 1, n. 1, p.1-3, 2003.
- TUREK-PLEWA, J.; ECKERSDORF-MASTALERZ, A.; KALUZEWSKI, B. *et. al.* **A mutation c.C2812T in the androgen receptor gene resulting in Pro817Leu substitution may affect dimerization of the androgen receptor and result in androgen insensitivity syndrome.** Fertility and Sterility, v. 85, n. 6, p.1822.e1-4, 2006.

- TUT, T.G.; GHADESSY, F.J.; TRIFIRO, M.A. *et. al.* **Long Polyglutamine Tracts in the Androgen Receptor are Associated with Reduced Trans-Activation, Impaired Sperm Production, and Male Infertility.** J Clin Endocrinol Metab, v. 82, n. 11, p.3777–82, 1997.
- VOGT, P.H. **Molecular Genetic of Human Male Infertility: From Genes to New Therapeutic Perspectives.** Current Pharmaceutical Design, v. 10, n. 1, p.1381-6128, 2004.
- WALLERAND, H.; RÉMY-MARTIN, A.; CHABANNES, E. *et. al.* **Relationship between expansion of the CAG repeat in exon 1 of the androgen receptor gene and idiopathic male infertility.** Fertil Steril, v. 76, n. 4, p.769-774, 2001.
- WANG, Q.; GHADESSY, F.J.; YONG, E.L. **Analysis of the transactivation domain of the androgen receptor in patients with male infertility.** Clin Genet, v. 54, n. 3, p.185-92, 1998a.
- WANG, Q.T.; GHADESSY, F.J.; TROUNSON, A. *et. al.* **Azoospermic associated with a mutation in the ligand binding domain of an androgen receptor displaying normal ligand binding , but defective trans-activation.** J. Clin Endocrinol Metab, v. 83, n. 12, p.4303-4309, 1998b.
- WESTERVELD, H.; VISSER, L.; TANCK, M. *et. al.* **CAG repeat length variation in the Androgen Receptor gene is not associated with spermatogenic failure.** Fertil Steril, v. 89, n. 1, p.253-9, 2008.
- YONG, E.L.; LOY, C.J.; SIM, K.S. **Androgen receptor gene and male infertility.** Human Reproduction Update, v. 9, n. 1, p.1-7, 2003.
- YOSHIDA, K.I.; YANO, M.; CHIBA, K. *et. al.* **CAG repeat length in the androgen receptor gene is enhanced in patients with idiopathic azoospermia.** Urology, v. 54, n. 6, p.1078-1081, 1999.
- ZHU, Y.S. **Molecular Basis of Steroid action in the Prostate.** Cellscience, v. 1, n. 4, p.27-55, 2005.

ANEXOS

ANEXO A

CONSENTIMENTO ESCLARECIDO PARA ESTUDO MOLECULAR DA CAUSA DE INFERTILIDADE MASCULINA

NOME: _____

IDADE: _____

FILHOS: () SIM () NÃO

QUANTOS: MENINOS (____) MENINAS (____)

DESTE CASAMENTO: () SIM () NÃO

TELEFONE: _____ **TEL. CONTATO:** _____

Nº PRONTUÁRIO: _____

Nº PRONT. ESPOSA: _____

1. FUMA: () SIM () NÃO

QUANTO TEMPO: () MAIS 10 ANOS () MENOS 10 ANOS

QUANTOS CIGARROS: 5-10/DIA () 10-20/DIA() 20 OU MAIS ()

2. BEBE () SIM () NÃO

TUDO DIA () **DE VEZ EM QUANDO** ()

VINHO () **CERVEJA** () **CACHAÇA**() **OUTROS** _____

1 COPO() **2-3 COPOS**() **3 OU + COPOS** ()

3. JÁ TRABALHOU COM:

AGRICULTURA: () SIM () NÃO **TEMPO:** _____

RAIO X: () SIM () NÃO **TEMPO:** _____

XEROX: () SIM () NÃO **TEMPO:** _____

MINERAÇÃO: () SIM () NÃO **TEMPO:** _____

OUTROS PRODUTOS PERIGOSOS: _____

4. DOENÇAS:

CAXUMBA: () SIM () NÃO _____

DIABETES: () SIM () NÃO

5. ACIDENTES EM ESPORTES: () SIM () NÃO

6. QUEDA DE CAVALO: () SIM () NÃO

HOUVE FERIMENTO NA ÁREA GENITAL: () SIM () NÃO

DADOS DO PRONTUÁRIO

7. PACIENTE TEM OU TEVE:

VARICOCELE: () SIM () NÃO **CRIPTORQUIDIA:** () SIM () NÃO

8. OPEROU: () SIM () NÃO

9. ESPOSA FEZ:

LAQUEADURA: SIM () NÃO ()

TESTE PÓS-COITO: SIM () NÃO ()

10. INDICAÇÃO CLÍNICA: ICSI () FIV ()

ESPERMOGRAMA

NÚMERO SPTZ: _____ x 10⁶/mL

MOTILIDADE: _____

MORFOLOGIA: _____

PH: _____

LAUDO: <hr/>	Oligospermia: < 20x10⁶/ml Oligosp. Severa: < 5x10⁶/ml Azoospermia: zero SPTZ Astenospermia: < 50% a + b Teratospermia: < 30% ovais
------------------------	---

COLETA DAS AMOSTRAS

INICIAIS: _____ **Nº:** _____ **DATA:** _____

SANGUE: _____ **mL:** _____ **ANTICOAGULANTE:** _____

TUBOS: _____

SÊMEN: _____ **TUBOS:** _____

PROCESSAMENTO AMOSTRA: _____

RESPONSÁVEL COLETA: _____

OBS.: _____

ANEXO B



MINISTÉRIO DA SAÚDE
Conselho Nacional de Saúde
Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP

PARECER Nº 1640/2005

Registro CONEP: 11070 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – 0046.0.188.000-05

Processo nº 25000.077833/2005-11

Projeto de Pesquisa: "Análise da infertilidade masculina idlopática sob aspectos genético-moleculares".

Pesquisador Responsável: Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura

Instituição: Universidade Católica de Goiás /GO

Área Temática Especial: Genética humana.

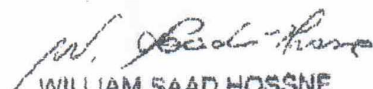
Ao se proceder à análise do projeto de pesquisa em questão, em resposta ao Parecer CONEP nº 1372/2005, cabem as seguintes considerações:

- a) Foi garantida a informação adequada dos resultados ao sujeito da pesquisa, incluindo previsão de aconselhamento genético.
- b) Diretrizes éticas relativas ao armazenamento da amostra foram apresentadas contemplando a Res. CNS 347/2005.
- c) Formas de contato e adequações solicitadas no Termo de Consentimento Livre e Esclarecido foram acrescentadas.
- d) As informações enviadas atendem aos aspectos fundamentais da Res. CNS 196/96 sobre diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos.
- e) O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP da instituição supracitada.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

Brasília, 29 de setembro de 2005.


WILLIAM SAAD HOSSNE
Coordenador da CONEP/CNS/MS

ANEXO C

PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO (MODELO SUGERIDO)

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Em caso de dúvida você poder procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica de Goiás pelos telefones 3946-1071.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: ANÁLISE MOLECULAR DO GENE RECEPTOR DE ANDRÓGENO EM HOMENS COM INFERTILIDADE IDIOPÁTICA

Pesquisador Responsável: Dra. Kátia Karina Verolli de O. Moura. Telefone para contato: 3946-1385

Eu abaixo qualificado, após ter sido esclarecido verbalmente e depois de ler o resumo do projeto intitulado: ANÁLISE MOLECULAR DO GENE RECEPTOR DE ANDRÓGENO EM HOMENS COM INFERTILIDADE IDIOPÁTICA, realizado pelo Núcleo de Pesquisa Replicon da Universidade Católica de Goiás, DECLARO assumir, por espontânea vontade, livre de qualquer coação, a responsabilidade pela participação voluntária e gratuita, no grupo de pacientes integrantes da pesquisa. Estou ciente que o trabalho consiste na análise molecular e citogenética de amostras de sangue periférico e de sêmen.

DECLARO que compreendi que a obtenção das amostras citadas acontecerá sob minha total ciência, e sob os procedimentos adequados pela equipe responsável pela

pesquisa, sem qualquer prejuízo a minha pessoa e que será mantido o total sigilo dos resultados, que serão entregues apenas a mim ou responsável.

Outrossim, tenho pleno conhecimento de que o material será utilizado apenas e tão somente para fins de pesquisa, além de autorizar, pelo presente, que os testes e os resultados sejam utilizados em estudos científicos, ressaltando o sigilo quanto ao meu nome, reservando-me o direito de conhecer ou não os resultados da referida pesquisa.

- Nome do pesquisador: _____
- Assinatura do pesquisador: _____
- Data: _____

**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG nº _____ CPF
nº _____ nº de prontuário _____ nº de matrícula
_____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo
_____, como
sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo
pesquisador _____ sobre a pesquisa, os
procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de
minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer
momento, sem e que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu
acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data _____

Nome do sujeito ou responsável: _____

Assinatura do sujeito ou responsável: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e aceite do sujeito em participar

Testemunhas (não ligada à equipe de pesquisadores):

Nome: _____ Assinatura: _____

Nome: _____ Assinatura: _____

Observações complementares:

ANEXO D

Tabela 3: Dados dos pacientes quanto aa idade, espermograma, análise molecular, amostras e ábitos sociais

Pacientes	idade (Espermograma)	Análise molecular					Amostra	Hábitos Sociais				
		EX1	EX4	EX6	EX7	EX8		fuma	bebe	caxumba	agricultura	
5	1	4	2	2	2	2	2	1				
12	1	1	2	2	1	2	1	1				
13	2	4	2	2	2	2	1	1				
15	2	5	2	2	2	2	2	2				
21	1	2	2	2	2	2	2	2				
23	1	1	2	2	2	2	2	1				
27	2	4	1	2	2	2	2	1				
30	1	1	2	2	2	2	2	2				
33	2	5	2	2	2	2	2	2				
36	1	5	1	2	2	2	1	1				
38	2	5	2	1	2	2	2	2				
39	1	3	2	2	2	2	2	1				
41	2	1	2	2	2	2	2	1				
42	2	1	2	2	2	2	2	2				
45	2	3	1	2	2	2	2	1				
49	1	2	2	1	2	1	2	1				
51	2	1	1	2	2	2	2	1				
52	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2
53	2	5	2	2	2	1	2	1				
57	2	1	2	2	2	2	2	1				
59	2	3	2	2	2	2	2	1				
61	2	2	2	2	2	2	2	1				
63	2	4	1	2	2	2	2	1				
64	2	4	2	2	2	2	2	1				
66	1	2	2	1	2	2	2	1				
70	2	4	1	2	2	2	2	1				
75	3	2	2	1	2	2	2	2				
76	1	1	2	2	2	2	2	1				
79	2	2	2	2	2	2	2	1				
81	2	5	2	1	2	1	2	2				
83	3	5	2	2	2	2	2	1				
85	2	2	2	1	2	2	2	2				
86	2	4	2	2	2	2	2	1				
88	2	1	2	2	2	2	2	1				
91	1	1	2	2	2	2	2	1				
92	3	1	1	2	2	2	2	1				
93	2	4	1	2	2	2	2	1				
94	1	2	2	1	2	2	2	1				
96	3	1	2	2	2	2	2	2				
97	1	1	2	2	2	2	2	1				
98	2	1	2	2	2	2	2	2				
99	3	1	2	2	2	2	2	2				
100	1	2	1	2	2	1	2	1				
105	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2

106	1	1	1	2	2	1	2	1	2	2	1	2
107	2	2	2	2	2	2	2	4	1	1	1	1
108	3	3	2	2	2	1	2	4	2	1	1	2
109	2	4	2	2	2	2	2	4				
110	2	4	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1
111	2	5	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2
112	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2
114	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2
115	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1
116	1	1	1	2	2	2	2	1	2	2	2	1
118	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1	2	1
119	2	1	2	2	2	2	2	2				
120	2	3	2	2	2	1	1	1	2	2	1	1
121	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1
123	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1
124	2	4	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1
125	1	4	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2
127	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2
128	2	4	1	2	2	1	2	1	2	1	1	2
129	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1	2	2
130	2	4	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2
131	1	1	2	2	2	1	2	1	2	2	2	1
134	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1
135	1	5	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2
136	3	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1
138	2	5	1	2	2	1	2	1	2	1	2	2
140	2	1	2	2	2	2	2	4				
141	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2	1	1
142	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1
143	2	1	1	2	2	2	2	1	2	2	1	2
145	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2
146	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2
147	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2
148	1	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	2
149	1	1	1	2	2	1	2	1	2	2	2	1
150	2	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2	1
151	1	1	2	2	2	1	2	1	2	1	1	1
152	2	4	1	2	1	2	2	2	2	1	1	2
153	2	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2	2
154	1	4	2	1	2	2	1	1	2	2	2	1
155	1	4	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2
156	2	1	2	2	1	2	1	2	2	1	1	2
157	2	5	1	2	2	1	1	4	2	1	1	1
158	1	4	1	2	2	2	2	1	2	1	1	2
159	2	3	2	2	2	2	2	2				
160	1	2	2	2	2	1	2	1	2	1	2	1
161	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	2
162	2	4	1	2	2	2	1	1	2	1	2	2
163	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1
164	2	2	2	2	2	2	2	1	2	2	2	1
165	2	4	2	2	1	2	2	2	1	1	2	2
167	2	1	2	2	2	2	1	1				
168	1	4	2	2	2	1	2	1	2	1	1	2
170	2	3	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1

171	2	2	2	2	2	2	2	4	2	2	1	1
172	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2
173	2	3	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2
174	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2
175	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2
176	2	2	2	2	2	2	2	1				
178	1	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2
179	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	1	2
181	2	4	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2
182	2	1	2	1	2	2	2	1	2	1	1	2
184	1	1	2	2	2	2	1	1				
185	1	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2	1
186	3	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1
187	2	1	2	2	2	2	1	1	2	2	1	2
189	2	4	1	2	2	2	1	1	2	1	2	2
190	2	3	2	1	2	2	2	1	2	2	2	2
191	2	3	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1
194	2	4	1	2	2	2	2	1	1	2	2	2
195	1	3	2	2	2	2	2	4				
196	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1
198	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	1	2
199	1	1	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2
201	2	1	2	2	2	2	2	4	2	1	1	1
202	1	1	2	2	1	2	2	4				
203	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	2	1
204	2	3	2	2	2	2	2	4	2	1	1	1
205	1	1	1	2	2	1	2	1	2	1	2	2
206	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1
207	2	5	1	2	2	2	2	2				
209	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2
210	2	4	1	2	2	2	2	1	2	1	1	2
211	2	4	2	2	2	1	2	1	1	1	2	2
212	1	1	2	2	1	1	2	2	2	1	2	2
213	2	1	2	2	1	2	1	2	2	1	1	1
215	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2	2
217	2	5	1	2	2	2	1	1	2	1	2	2
219	2	3	2	1	2	1	2	1	2	1	1	2
220	1	4	1	2	2	2	2	1				
221	2	3	2	2	2	1	2	2	1	1	1	1
226	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2
227	2	1	2	2	2	2	2	1	1	1	2	2
230	1	4	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1
233	2	4	2	2	2	2	2	1	2	2	2	2
234	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1	2	2
235	1	2	2	2	1	1	2	1	1	1	2	1
239	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1	1
241	2	3	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2
242	1	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2
245	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
247	2	5	2	2	2	1	2	2	2	1	2	1
248	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2	2
249	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2
253	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2
255	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1

258	2	4	1	2	2	1	2	1	1	1	1	2
261	2	1	1	2	2	2	2	1	2	1	2	1
262	1	1	1	2	2	2	2	2	1	2	1	2
263	2	1	2	2	2	2	2	2	1	2	1	2
264	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2
265	2	1	2	2	1	2	2	1	1	1	2	2
267	1	1	2	2	2	1	1	2	2	2	2	2
269	1	1	1	2	1	2	2	1	2	2	1	2
272	2	1	2	2	2	2	2	1				
273	1	1	1	2	1	2	2	1	2	1	1	2
275	2	2	1	2	2	1	2	1	2	1	1	2
276	2	1	1	2	2	1	2	1	2	2	1	1
277	2	4	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2
278	2	1	2	2	1	2	2	1	2	1	1	1
279	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	1	1
280	2	4	1	2	1	2	2	2	2	1	1	1
281	2	1	2	2	2	2	2	1	2	2	1	2
283	1	2	2	1	2	2	2	4				
284	2	1	2	2	1	2	2	2	1	1	1	2
285	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	1	2
287	2	1	2	2	2	2	2	1	1	2	2	2
288	2	4	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2
289	1	3	2	2	2	2	2	1				
290	2	1	2	2	2	2	1	1				
291	2	1	1	2	2	2	1	1	2	1	2	2
292	2	3	2	2	2	2	2	1	2	1	1	1
293	1	1	2	2	1	2	2	1	2	1	1	2
294	2	5	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2
299	3	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
300	2	5	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1
302	2	5	2	2	2	2	2	2	1	1	2	2
304	2	5	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2
305	2	5	2	2	2	2	2	2	2	2	1	1
306	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
307	2	1	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
308	3	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1
311	2	5	2	2	2	2	2	2				
312	2	3	2	2	2	2	2	2	2	2	1	2
313	2	3	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2
314	2	3	1	2	2	1	2	2	2	1	1	2
316	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	1	2
317	1	1	2	2	1	2	2	2	2	1	1	2
318	3	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	1
319	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	2	1
321	3	1	2	2	1	1	2	3	2	1	2	1
322	1	5	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2
327	2	3	2	2	2	1	2	1	2	2	2	2
329	2	1	2	2	1	2	2	2	2	2	1	2
331	2	5	2	2	2	1	2	2	2	1	2	2
332	2	5	2	2	1	1	2	2	2	1	2	2
334	2	3	2	1	1	1	2	2				
337	1	2	2	2	1	1	2	2				
339	2	3	2	2	1	2	2	2	2	1	1	1
340	2	5	2	2	1	2	2	2				

Legendas:

Exame Espermograma	
norma e normal a=0	1
oligo, oligosevero e oligoastenoterato	2
asteno e astenoterato e oligoasteno	3
terato e oligoterato	4
azoo	5

Idade	
0 - 29	1
30 - 49	2
50 - 69	3

Análise Molecular (Ex1, Ex4, Ex6, Ex7, Ex8)	
sim	1
não	2

Hábitos Sociais	
sim	1
não	2

Amostras	
semen	1
sangue	2
MO	3
semen/sangue	4

