UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL CENTRO DE CIÊNCIAS AGRÁRIAS E BIOLÓGICAS INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO POLIMORFISMO CAG E DE MUTAÇÕES DO GENE DO RECEPTOR DE ANDRÓGENO EM HOMENS FÉRTEIS E INFÉRTEIS NA REGIÃO DA SERRA GAÚCHA

RAFAELE FRASSINI

CAXIAS DO SUL

2010

RAFAELE FRASSINI

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO POLIMORFISMO CAG E DE MUTAÇÕES DO GENE DO RECEPTOR DE ANDRÓGENO EM HOMENS FÉRTEIS E INFÉRTEIS NA REGIÃO DA SERRA GAÚCHA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul visando à obtenção de Grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto Co-rientadora: Prof^a Dr^a Jovana Mandelli

CAXIAS DO SUL

2010

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP) Universidade de Caxias do Sul UCS - BICE - Processamento Técnico

F843c Frassini, Rafaele

Caracterização molecular do polimorfismo CAG e de mutações do gene do receptor de andrógeno em homens férteis e inférteis na região da Serra Gaúcha / Rafaele Frassini. 2010.

88 f.: il.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) — Universidade de Caxias do Sul, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2010.

"Orientação: Prof. Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto e Prof^a. Dr^a. Jovana Mandelli"

1. Infertilidade masculina. 2. Mutação genética. 3. Determinação genética do sexo. 4. Polimorfismo (Genética). I. Título.

CDU: 616.697

Índice para catálogo sistemático:

1.	Infertilidade masculina	616.697
2.	Mutação genética	575.224.2
3.	Determinação genética do sexo	575.18
4.	Polimorfismo (Genética)	575.2

Catalogação na fonte elaborada pela bibliotecária Kátia Stefani – CRB 10/1683

RAFAELE FRASSINI

CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO POLIMORFISMO CAG E DE MUTAÇÕES DO GENE DO RECEPTOR DE ANDRÓGENO EM PACIENTES FÉRTEIS E INFÉRTEIS NA REGIÃO DA SERRA GAÚCHA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade de Caxias do Sul visando a obtenção de Grau de Mestre em Biotecnologia

Orientador: Prof. Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto

Corientadora: Profa Dra Jovana Mandelli

DISSERTAÇÃO APROVADA EM. 04 DE OUTUBRO DE 2010

Prof. Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto (Orientador)

Prof ^a Dra Jovana Mandelli (Corientadora) Dr. Edson Borges Junior

Profa. Dra. Eleonora Bedin Pasqualotto

Profa. Dra Maria Luiza Saraiva Pereira

UNIVERSIDADE DE CAXIAS DO SUL Biblioteca Central



AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pela minha vida e oportunidades constantes de crescimento e aprendizado e a todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, especialmente:

Ao Prof. Dr. Fábio Firmbach Pasqualotto, pela orientação, apoio, confiança e exemplo profissional.

À Prof^a. Dr^a Jovana Mandelli, pela corientação, apoio e conhecimentos fornecidos.

À Dr^a Eleonora Bedin Pasqualotto e ao Prof. Dr. Diego Bonatto, pela colaboração.

Ao Prof. Dr. Sérgio Laguna Echeverrigaray, pelo entusiasmo e colaboração.

À Prof^a. Dr^a Sílvia Reni Uliana, pela oportunidade de estágio e auxílio no seqüenciamento das amostras.

Ao Márcio Yamammoto, pela dedicação e auxílio no sequenciamento das amostras.

Aos pacientes, pela colaboração, essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos professores, funcionários e colegas do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela cooperação e disponibilidade em ajudar sempre.

A Universidade de Caxias do Sul e a CAPES pelo auxílio financeiro e pela bolsa.

Às minhas colegas de laboratório: Nilza, Silvana, Marina e Nicole pela convivência e carinho demonstrados ao longo deste trabalho.

Aos meus amigos: Rosângela, Marielsa, Claire, Kamille, Janete, Débora, Alessandra, Nicole, Leandra, Marcelo, Alessandro, Renan e Roberta, pelo carinho, amizade incondicional, apoio e motivação constantes.

À minha avó, Glória, aos meus pais, Carlos e Maria Angélica, ao meu tio, Moisés, pela confiança, apoio, amor, dedicação e, principalmente, por acreditarem em mim sempre.

A toda minha família pelo amor incondicional!

ÍNDICE

LIST	A DE TABELAS	VIII
LIST	A DE FIGURAS	IX
RESU	JMO	X
ABST	TRACT	XI
1.	INTRODUÇÃO	1
2.	OBJETIVOS	4
2.1.	Objetivo Geral	4
2.2.	Objetivos Específicos	4
3.	REVISÃO DE LITERATURA	5
3.1.	Infertilidade Masculina	5
3.2.	Andrógenos	7
3.3.	Gene do Receptor de Andrógenos	11
3.4.	Polimorfismo CAG do éxon 1 do Gene do Receptor de Andrógenos	13
3.5.	Mutações no gene do receptor de andrógenos	17
4.	METODOLOGIA	21
4.1.	Pacientes e Aspectos Éticos	21
4.1.	1. Aspectos Éticos	21
4.1.	2. Pacientes	21
4.1.	3. Grupo Controle	22
4.2.	Análise Seminal	23
4.3.	Extração de DNA	23
4.4.	Extração de DNA de Células de Mucosa Oral	23
4.5.	Extração de DNA a partir de Linfócitos	24
4.6.	Determinação da Concentração de DNA	25
4.7.	Amplificação dos segmentos CAG e dos Éxons 5 e 7	25
4.8.	Análise Eletroforética	26
4.9.	Coloração com Nitrato de Prata	27
4.10). Sequenciamento do DNA	28
4.1	I. Análise Estatísitca	29
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
5 1	Análise Seminal	30

	5.2. Análise do Polimorfismo CAG do éxon 1 do Gene do Receptor de Andrógenos3	1
	5.3. Análise de Mutações dos Éxons 5 e 7 do Gene do Receptor de Andrógenos35	5
	5.4. Correlação da Análise Seminal com o Polimorfismo CAG	9
5	CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS	9
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	1
Δ	NEXOS65	5
	ANEXO 01	6
	ANEXO 0268	8
	ANEXO 03	9
	ANEXO 04	0
	ANEXO 05	1
	ANEXO 06	2
	ANEXO 0773	3
	ANEXO 0874	4
	ANEXO 0975	5
	ANEXO 10	6
	ANEXO 11	7
	ANEXO 12	8
	ANEXO 13	9
	ANEXO 1480	0
	ANEXO 158	1
	ANEXO 1682	
	ANEXO 1783	3
	ANEXO 18	
	ANEXO 1985	
	ANEXO 20	
	ANEXO 21	
	ANEXO 22	
	ALILAO 22	O

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Lista de primers utilizados para amplificação do polimorf	ismo CAG e dos éxons 5
e 7 do Gene do Receptor de Andrógenos	26
Tabela 2. Média das repetições CAG do grupo de pacientes e do gru	upo controle do éxon1 do
Gene do Receptor de Andrógenos	33

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Regulação hormonal da espermatogênese	9
Figura 2. Mecanismo de ação dos andrógenos	11
Figura 3. Organização estrutural do gene do Receptor de Andrógenos e a proteína	12
Figura 4. Análise computacional comparando-se a região polimófica CAG depositada no)
Gene Bank com a do paciente 1167	32
Figura 5. Box Plot com a distribuição dos alelos do Polimorfismo CAG do éxon 1 do Ge	ne do
Receptor de Andrógenos no Grupo Controle (A) e no Grupo de Pacientes (B)	33
Figura 6. Análise computacional comparando-se a região codificadora do éxon 5 do Ger	ne do
RA depositada no banco de dados com a do paciente 791	35
Figura 7. Nucleotídeos não identificados no sequenciamento do éxon 5 do paciente 791	36
Figura 8. Análise computacional comparando-se a região codificadora do éxon 7 do Ger	ne do
RA depositada no banco de dados com a do paciente 791	36

RESUMO

A espermatogênese é andrógeno-dependente, porém muitos homens com problemas na espermatogênese têm níveis hormonais androgênicos normais. O mau funcionamento do receptor de andrógenos (Androgen Receptor - AR) é a possível causa deste problema. O AR é membro da família dos receptores nucleares e é codificado pelo Gene do Receptor de Andrógenos, que é de cópia única, localizado no cromossomo X e possui oito éxons. O éxon 1 contém um segmento com repetições CAG, que codifica poliglutamina. O trato glutamínico é polimórfico e varia de 10 a 35 repetições na população normal. Alterações no segmento CAG estão envolvidas na etiologia de doenças neurodegenerativas (repetições CAG > 40) e câncer de próstata (< a 16 repetições). Mutações no Gene do AR estão correlacionadas com a síndrome de insensibilidade aos andrógenos, que varia desde a completa feminilização até homens inférteis com fenótipo normal. O objetivo do presente estudo constituiu em investigar a correlação entre o polimorfismo CAG e a prevalência de mutações nos éxons 5 e 7 e a alteração dos parâmetros seminais na população da Serra Gaúcha. O segmento CAG e a região codificadora dos éxons 5 e 7 foram amplificadas pela técnica de reação da polimerase em cadeia (PCR) e analisadas pela técnica de sequenciamento automatizado. A média das repetições CAG do grupo de pacientes (n = 45) foi de 20,04±3,94 e a média do grupo controle (n = 45) foi 20,64±3,71. Não há significância estatística entre elas (p = 0, 459). Verificamos correlação entre as repetições CAG e a morfologia seminal (Organização Mundial da Saúde) (p = 0, 032; r = 0, 349). Porém não se verificou associação com os demais parâmetros seminais: concentração (p = 0, 134; r = 0, 227), motilidade (p = 0.184; r = 0.202), morfologia (Kruger) (p = 0,213; r = 0,210). Não foram detectadas mutações nos éxons 5 e 7 nos dois grupos de estudo. Nosso estudo sugere que polimorfismo CAG e a presença de mutações nos éxons 5 e 7 não estão correlacionados com alterações seminais no grupo de estudo.

PALAVRAS-CHAVE: infertilidade masculina, polimorfismo genético e mutações.

ABSTRACT

Spermatogenesis is androgen-dependent, but most men with impaired spermatogenisis have normal serum androgens levels. Malfunction of androgen receptor (AR) may be a possible cause of this problem. AR is a member of the nuclear receptor family. It encodes a single copy gene in the X chromosome. The AR Gene is composed by eight exons. The exon 1 contains a segment of CAG repeats, translated to polyglutamine. This glutamine repeat tract is polymorphic and its size varies from 10 to 35 in normal population. These changes have clinical implications for human diseases: neurodegenerative disorders (CAG repeat > 40) and prostate cancer (CAG repeat < 16). Mutations in AR Gene cause a variety of defects related to androgen insensitivity, ranging from complete feminization to phenotypic males with infertilty. The aim of this study was to investigate the relationship between CAG repeat length and the prevalence of mutations in the exons 5 and 7 and impaired spermatogenesis in a Serra Gaucha population. The CAG repeat length and the coding region of exons 5 and 7 was amplified by polymerase chain reaction (PCR) and analyzed by direct DNA sequencing. The mean CAG repeat length in the experimental group (n = 45) was 20.04±3.94 and in the control group (n = 45) was 20.64±3.71. No difference was found between patientes and controls in the mean values (p = 0.459). We found relationship between CAG repeat and morphology (World Health Organization) (p = 0.032; r = 0.349). However, the correlation was not found between CAG repeat and others seminals parameters: concentration (p = 0.134; r = 0.227), morphology (Kruger) (p = 0.213; r = 0.210) and motility (p = 0.184; r = 0.202). No mutations were detected in the coding regions of exons 5 and 7 in both groups. Our study suggests that CAG polymorphism and mutations in the exons 5 and 7 are not likely to cause of spermatogenesis abnnormalities in our population.

KEYWORDS: male infertility, genetic polymorphism and mutation.

1. INTRODUÇÃO

A infertilidade é definida como a inabilidade de um casal sexualmente ativo, sem a utilização de métodos contraceptivos, estabelecer gravidez dentro de um ano ou mais. A infertilidade consiste em uma doença, que resulta de anormalidades adquiridas ou congênitas.

O fator masculino tem se tornado cada vez mais importante na investigação de casais inférteis. Cerca de 50% dos casais que consultam por infertilidade apresentam fator masculino. Em 30% dos casos a causa é o fator masculino isolado e em outros 20% há associação com o fator feminino. Cerca de 6% dos homens em idade fértil apresentam infertilidade. Não há um fator causal bem definido em 90% dos casos de oligozoospermia (redução no número de espermatozóides inferior a $20x10^6$ espermatozóides/mL) e azoospermia (ausência de espermatozóides no ejaculado). Estas causas da infertilidade estão relacionadas com a produção de espermatozóides em 90% dos casos e com o transporte em 10%.

O desenvolvimento do fenótipo masculino e o início da espermatogênese, culminando com a formação dos gametas, estão intrinsecamente ligados a eventos celulares que respondem a andrógenos. Os dois andrógenos mais importantes são a testosterona e 5 α-dihidrotestosterona (DHT). A ação destes hormônios é mediada pelo receptor de andrógenos (*Androgen Receptor* - AR). O AR é um fator de transcrição nuclear codificado pelo Gene do Receptor de Andrógenos.

A testosterona é crucial para o desenvolvimento do Ducto de Wolf e sua subsequente diferenciação em epidídimo, vasos deferentes e vesícula seminal. A DHT está envolvida no desenvolvimento do pênis e do escroto. Na puberdade, os andrógenos dirigem o início da espermatogênese e o desenvolvimento dos órgãos sexuais. Todos esses processos são

andrógeno-dependentes e culminam na espermatogênese. Porém, qualquer anormalidade em um destes passos resulta em falha na espermatogênese.

Algumas mutações podem ocorrer no Gene do Receptor de Andrógenos, levando a uma produção deficiente de espermatozóides, feminilização, câncer e infertilidade, assim como, resultar na Síndrome da Insensibilidade aos andrógenos (AIS – Androgen Insensitivity Syndrome), entre outras doenças relacionadas. A AIS é uma alteração com herança ligada ao cromossomo X e provoca prejuízo total ou parcial no processo de virilização intra-útero devido a alterações funcionais no AR. Estudos demonstraram que mutações envolvidas na etiologia da AIS localizam-se preferencialmente entre os éxons 5 e 7 do gene do RA.

O Gene do Receptor de Andrógenos possui duas regiões polimórficas localizadas no éxon 1 e caracterizadas por diferentes números de repetições CAG e GGC. Estudos têm demonstrado correlação entre a expansão de repetições CAG e a patologia de algumas doenças neurodegenerativas, atrofia testicular, redução da produção de espermatozóides, infertilidade e câncer de próstata.

Alguns investigadores observaram que pacientes com oligozoospermia ou azoospermia idiopática apresentavam alterações genéticas que só podem ser detectadas por técnicas de Biologia Molecular, como a Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Nos últimos anos, o conhecimento sobre a etiologia genética da infertilidade tem se ampliado graças aos avanços neste campo, pois diferentes anormalidades genéticas têm sido identificadas, sendo que atualmente representam uma parte considerável na etiologia deste problema.

Há alguns anos, indivíduos com infertilidade idiopática não podiam conceber e, atualmente, com as técnicas de injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI) isto é possível, elevando o risco de transmissão de anormalidades genéticas. Isto faz com que exames de detecção de cromossomopatias, mutações e outras alterações se tornem fundamentais na investigação ou redução deste problema.

A caracterização molecular de mutações e do polimorfismo CAG presentes em pacientes na região da Serra Gaúcha é importante, pois pode aumentar as chances de se encontrar a causa da infertilidade em uma parcela da população masculina onde esta é desconhecida – idiopática (30%). Para conhecimento e aplicação na Ciência, é de grande importância estabelecer o número de repetições dos trinucleotídeos e de mutações, podendo servir como banco de dados e também auxiliar no diagnóstico de doenças relacionadas com o número de repetições CAG do Gene do Receptor de Andrógenos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Caracterização da região polimórfica CAG e de mutações no Gene do Receptor de Andrógeno que possam estar associadas com o diagnóstico de infertilidade idiopática masculina na população da Serra Gaúcha.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Estabelecer os parâmetros seminais (concentração, motilidade e morfologia) do grupo de pacientes e do grupo controle;
- ✓ Estabelecer o número de repetições do polimorfismo CAG do éxon 1 do Gene do Receptor de Andrógenos no grupo de pacientes e no grupo controle;
- ✓ Identificar a presença de mutações nos éxons 5 e 7 do Gene do Receptor de Andrógenos no grupo de pacientes e no grupo controle;
- ✓ Relacionar os parâmetros seminais com os padrões de repetições CAG de cada grupo, bem como a presença de mutações nos éxons 5 e 7.

3. REVISÃO DE LITERATURA

3.1. Infertilidade Masculina

Infertilidade é definida como a inabilidade de um casal sexualmente ativo, sem a utilização de métodos contraceptivos, estabelecer gravidez dentro de um ano ou mais. A infertilidade consiste em uma doença e atinge aproximadamente 15 a 20% dos casais no mundo, independente de fatores socioeconômicos ou culturais, sendo, que em 30% dos casos, as causas não são identificadas (idiopática) (Gallarneau, 1999; WHO, 1999; Zeger - Hochschild *et al.*, 2009).

A maioria dos indivíduos inférteis é saudável, idiopática e possui poucas alterações ao exame físico. Porém, a infertilidade pode ser a manifestação inicial de uma doença sistêmica, já que a maioria dos homens inférteis apresenta oligozoospermia e azoospermia (Seibel, 1996).

Na última década, tem sido dada muita atenção a alterações genéticas que causam infertilidade masculina com defeitos na espermatogênese. Alguns trabalhos descreveram defeitos na espermatogênese em homens subférteis, mas a causa definitiva em muitos pacientes ainda não é conhecida. Entretanto, está tornando-se mais evidente que uma proporção significativa da infertilidade masculina está associada com uma variedade de anormalidades genéticas. Estima-se que o fator genético possa estar envolvido em 15% dos casos de infertilidade em homens e em 10% dos casos em mulheres (Yong *et al.*, 2003; Ferlin *et al.*, 2006).

A prevalência de anormalidades cromossômicasem homens inférteis varia de 2 a 8% (Ferlin *et al.*, 2006). Kjessler (1996) observou que a freqüência de anormalidades cromossômicas aumentava à medida que a redução do número de espermatozóides se

acentuava. Em pacientes azoospérmicos, a taxa de aberrações cromossômicas varia de 10 a 15%, sendo mais frequentes nos cromossomos sexuais. Já em pacientes oligozoospérmicos, as aberrações cromossômicas são menos frequentes, variando de 3 a 8%, tendo maior incidência nos cromossomos autossômicos. A síndrome de *Klinefelter* e suas variantes são o tipo mais comum de anormalidade cariotípica, representando cerca de 4% dos indivíduos inférteis e 11% dos azoospérmicos. Esta síndrome ocorre com uma frequência 50 vezes maior em homens azoospérmicos em relação aos normozoospérmicos. Microdeleções no braço longo do cromossomo Y estão associados a 10 - 15% dos casos, caracterizando-se por ser a forma mais comum de anormalidade não cromossômica detectada em homens inférteis (Assche *et al.* 1996; Prauer *et al.*, 1997; Foresta *et al.*, 2002).

O desenvolvimento do fenótipo masculino e o início da espermatogênese, culminando com a formação dos gametas, estão intrinsecamente ligados a eventos celulares que respondem a andrógenos. Os dois andrógenos mais importantes são a testosterona e DHT. A ação destes andrógenos é mediada pelo AR, um fator de transcrição nuclear. O Gene do AR está localizado no Cromossomo X e possui oito éxons. O éxon 1 possui duas regiões polimórficas caracterizadas por diferentes repetições CAG e GGC que resultam em inserções com número de repetições variáveis de glutamina e glicina, respectivamente, na região N-terminal da proteína, modulando a atividade da mesma. O número de repetições CAG varia de 10 a 35 (média de 21 – 24) em indivíduos normais. Estudos (La Spada *et al.*, 1991; Irvine *et al.*, 1994; Tut *et al.*, 1997; Melo *et al.*, 2005) têm demonstrado a possibilidade de ligação entre o polimorfismo CAG e a etiologia de uma série de doenças e alterações, dentre elas, a infertilidade. Expansões com mais de 40 repetições estariam associadas a doenças neurodegenerativas, atrofia testicular, redução do número de espermatozóides e infertilidade.

desenvolvimento do carcinoma de próstata (Chamberlain *et al.*, 1994; Quigley *et al.*, 1995; Asatiani *et al.*, 2003; Ferlin *et al.*, 2006).

Mutações no Gene do AR estão relacionadas a AIS, a qual é caracterizada clinicamente por apresentar um espectro de fenótipos que variam desde genitália ambígua até infertilidade, na forma mais tênue de apresentação da síndrome (Yong *et al.*, 2003).

Há alguns anos, a maioria dos indivíduos inférteis não podia conceber e, atualmente, com o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida, como a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ISCI), isto já é possível, aumentando o risco de transmissão de alterações genéticas. Devido a este fato, há muitas discussões em relação à adoção ou não destes meios terapêuticos em defeitos espermatogênicos idiopáticos. Pode-se decidir por não utilizá-los em determinados casais, pois a saúde e o bem estar da futura criança é que deverão orientar esse impasse, apesar da constante pressão por grande parte dos casais. Este problema poderá ser solucionado com o advento de novas e revolucionárias técnicas de diagnóstico molecular pré-implantacional e com a identificação de genes envolvidos em uma série de doenças. Isto faz com que exames de detecção de cromossopatias e anormalidades genéticas se tornem fundamentais na investigação e redução deste problema (Maegawa & Centra, 2000).

3.2. Andrógenos

Andrógenos são hormônios esteróides que determinam a expressão das características masculinas. Eles são necessários para a formação muscular, composição corpórea, mineralização óssea, metabolismo dos lipídeos e funções cognitivas, além de serem essenciais no processo de reprodução e desenvolvimento sexual (Dohle *et al.*, 2003).

A testosterona e seu metabólito DHT são os tipos mais importantes de andrógenos. A testosterona é o principal andrógeno circulante no sexo masculino e o testículo é a sua principal fonte de produção. A adrenal produz uma pequena quantidade de testosterona, diretamente ou após a conversão periférica dos hormônios androstenediona e dehidroepiandrosterona, por ação das enzimas esteroidais (Hipakka & Liao, 1998).

A diferenciação sexual masculina normal depende da progressão de estágios distintos do desenvolvimento: estabelecimento do sexo cromossômico (46, XY) no momento da fertilização; ativação de genes indutores que promovem a diferenciação da gônoda primitiva em testículo; diferenciação da genitália interna e externa (Kupfer *et al.*, 1992; Grumbach *et al.*, 2002).

A diferenciação gonodal embrionária em testículo ocorre entre a 6ª e 7ª semanas de gestação e é dirigida pelo gene SRY (região determinante do sexo no Cromossomo Y), localizado no braço curto do Cromossomo Y, em consenso com outros fatores codificados por genes localizados nos autossomos e no cromossomo X (Kupfer *et al.*, 1992).

A testosterona é secretada pelas Células de Leydig fetais, estimulada pela Gonadotrofina Coriônica Humana (HCG), e induz a diferenciação dos Ductos de Wolf em epidídimo, ducto deferente e vesículas seminais. A diferenciação da genitália externa em pênis, escroto e uretra peniana ocorrem entre a 9^a e 13^a semanas de gestação e requer adequada concentração de testosterona e a conversão desta para a DHT, através da ação da enzima 5-α-redutase em tecidos-alvos. Na ausência de concentrações adequadas de testosterona e DHT ocorre falha no processo de masculinização. Assim, qualquer anormalidade na produção de andrógenos entre a 9^a e 13^a semanas de gestação causará masculinização incompleta, resultando em pseudo-hermafroditismo (Kupfer *et al.*, 1992; Quigley *et al.*, 1995).

A puberdade inicia-se a partir da secreção de gonadotrofinas (Hormônio Luteinizante – LH e Hormônio Folículo Estimulante – FSH). O hipotálamo produz GnRH (*Gonadotropin-Releasing Hormone* – Hormônio Liberador de Gonadotrofina) que estimula a hipófise a secretar FSH e LH. O início da espermatogênese ocorre sob estímulo do FSH, que atua nas Células de Sertoli, as quais são responsáveis pela nutrição e início da diferenciação das células germinativas em espermatozóides. As células germinativas não expressam receptores androgênicos, mas são indiretamente dependentes destes para sua diferenciação. O LH estimula as Células de Leydig a produzirem testosterona. A síntese de testosterona inibe a produção de gonadotrofinas e GnRH. Após a maturação espermática, as Células de Sertoli diminuem a resposta ao FSH e passam a responder a andrógenos (Figura 1). A testosterona é necessária para a manutenção da espermatogênese e inibição da apoptose das células germinativas. A supressão dos níveis de gonadotrofinas resulta em redução do número de espermatozóides. Já a completa inibição dos níveis intratesticulares de testosterona inibe o processo de meiose (Dohle *et al.*, 2003; Madhukar & Rajender, 2008).

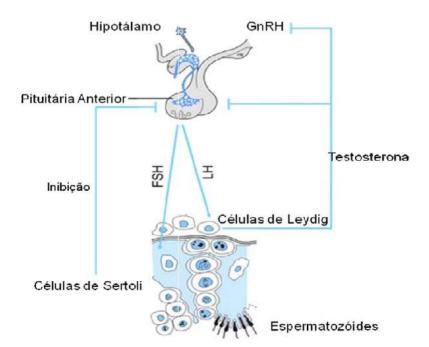


Figura 1. Regulação hormonal da espermatogênese (Madhukar & Rajender, 2008)

A espermatogênese é andrógeno-dependente, porém muitos homens com problemas na espermatogênese têm nível hormonal normal de andrógenos. O mau funcionamento do receptor de andrógenos é a possível causa deste problema (Quigley *et al.*, 1995).

As ações da testosterona e DHT são mediadas pela ligação destes com seu receptor, o AR, ativando a transcrição de genes específicos em tecidos-alvos. O AR é um fator de transcrição nuclear e apresenta estrutura semelhante aos demais receptores de esteróides (receptores de estrógeno, hormônio tireoideano, de vitamina D, ácido retinóico, glicocorticóide, mineralocorticóide e progesterona) (Quigley *et al.*, 1995).

A testosterona e a DHT estão presentes no sangue em concentrações 10 a 100 vezes acima do nível necessário para a saturação do AR. Porém, 95% destes andrógenos circulam ligados a proteínas, tais como albumina ou globulina ligadora de hormônios sexuais (SHBG) que limitam sua disponibilidade. Algumas células responsivas a andrógenos possuem receptores de membrana para SHBG. A ligação do complexo esteróide/SHBG a estas células inicia eventos que aumentam o AMPc intra-celular (Hipakka & Liao, 1998).

Os andrógenos circulantes atravessam a membrana celular das células-alvo por difusão e se ligam ao AR intracelular, o qual possui sítios de ligação específicos para os andrógenos. Esta ligação induz a dissociação de proteínas inibitórias que estão associadas ao receptor (heat-shock proteins), ativando o complexo, que será transportado para dentro do núcleo. Ocorre, então, a dimerização do receptor, a ligação com os elementos de resposta hormonal e a associação com vários co-fatores transcricionais, estimulando a transcrição de genes ligados aos elementos de resposta. A ligação do andrógeno ao AR resulta em mudanças conformacionais no receptor, o que permitirá sua interação com outras proteínas celulares e início dos efeitos biológicos (Figura 2) (Brinkmann, 2001; Gelman, 2002; McGinnis et al., 2002).

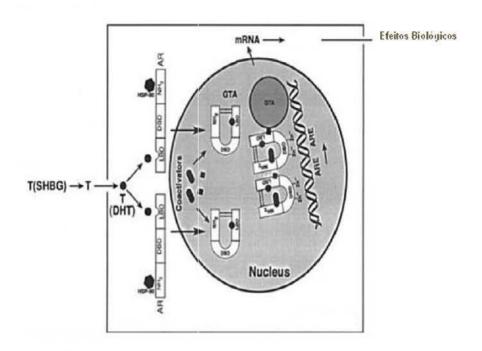


Figura 2. Mecanismo de ação dos andrógenos (McGinnis et al., 2002)

3.3. Gene do Receptor de Andrógenos

O Gene do Receptor de Andrógenos é de cópia única e está localizado no braço longo do cromossomo X (Figura 3), na região pericêntrica entre os fragmentos Xq11-12 e consiste de 8 éxons que codificam uma proteína de 919 aminoácidos. A proteína possui quatro domínios funcionais: o domínio de ativação transcricional amino-terminal (TAD), domínio de ligação ao DNA (DBD), a região *hinge* (de dobradiça) e o domínio de ligação esteróide carboxi-terminal (LBD) (Yong *et al.*, 2003).

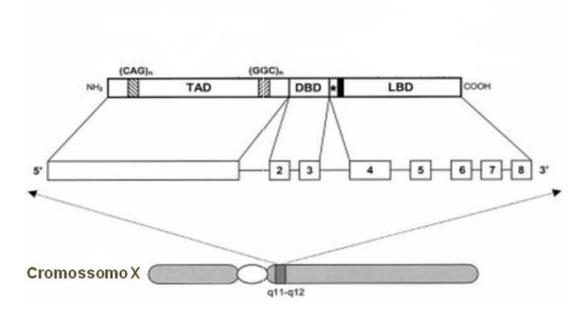


Figura 3. Organização estrutural do Gene do Receptor de Andrógenos e a proteína (Young et al., 2003)

O éxon 1 codifica o domínio de ativação trasnericional (TAD), é constituído por 555 aminoácidos e possui extensão correspondente a mais da metade da proteína. Os éxons 2 e 3 codificam o domínio de ligação ao DNA (DBD), que consiste de aproximadamente 70 aminoácidos, o qual é similar (identidade 56 – 79%) com os diferentes receptores de esteróides. O domínio DBD possui dois dedos de zinco ligados ao enxofre com quatro cisteínas, produzindo uma estrutura de hélice-alça-hélice que interage com os elementos de resposta hormonal (HRE). Três aminoácidos na base do primeiro dedo de zinco são conservados entre os receptores de andrógenos, progesterona, glicocorticóides e mineralóides e ligam-se aos HRE localizados em regiões próximas ou na seqüência de genes alvo. O segundo dedo de zinco possui aminoácidos que estabilizam a ligação do DNA ao receptor, participam na dimerização do AR e, juntamente com a região *hinge*, atuam no transporte do complexo do citoplasma para o núcleo (Hipakka & Liao, 1998).

O éxon 4 codifica a região *hinge*, que contém um sinal de localização nuclear necessário para a translocação do complexo andrógeno/receptor do citoplasma para o seu sítio de ação nuclear (Quigley *et al.*, 1995; Grumbach *et al.*, 2002).

Os éxons 5, 6, 7 e 8 codificam o domínio de ligação aos andrógenos (LBD), o qual possui cerca de 290 aminoácidos e representa 30% do tamanho da proteína. A sequência de aminoácidos do LBD humano é idêntica a do rato e a semelhança entre as sequencias de outros receptores esteróides varia de 15 a 54%. Além de ser responsável pela ligação aos andrógenos, este domínio também participa da ativação transcricional, da dimerização do receptor e interage com proteínas inibitórias (Hipakka & Liao, 1998).

O RNAm do Gene do AR foi identificado em vários tecidos humanos, incluindo testículos, próstata, fibroblastos de tecido genital, fígado e linhagens celulares de câncer de próstata e de mama (Quigley *et al.*, 1995).

3.4. Polimorfismo CAG do éxon 1 do Gene do Receptor de Andrógenos

O gene do AR possui duas regiões polimórficas localizadas no éxon 1 que são caracterizadas por diferentes números de repetições (CAG)nCAA e (GGT)₃GGG(GGT)₂(GGC)_n na região N-terminal da proteína do RA, no domínio TAD. O número de repetições CAG e GGC varia respectivamente de 10 a 35 (média 21 – 23) e de 4 a 24 (média 16 – 17) em homens férteis com fenótipo normal (Chamberlain *et al.*, 1994; Choong *et al.*, 1996).

Expansões com mais de 40 repetições CAG estão relacionadas à síndrome de Kennedy, a desordens motoras neurológicas associadas ao pseudo-hermafroditismo, atrofia testicular, redução da produção de espermatozóides e infertilidade. Por outro lado, um número reduzido de repetições estaria possivelmente associado à pré-disposição ao desenvolvimento do carcinoma de próstata (Giovanucci *et al.*, 1997; Garolla *et al.*, 2005).

A expansão do polimorfismo CAG foi detectada primeiramente em pacientes com a doença de Kennedy (Spinal and Bulbar Muscular Atrophy – SBMA). A SBMA é uma doença rara, ligada ao cromossomo X, afeta somente homens e manifesta-se tardiamente (entre 30 e 50 anos de idade). Esta doença causa a degeneração dos neurônios motores espinhais e bulbares, resultando em fasciculações e fraqueza, principalmente nos ombros e nas pernas, de forma lenta e progressiva, além de alterações seminais. Estudos demonstraram que indivíduos portadores desta doença possuíam entre 40 a 62 repetições CAG ou inserções maiores do que 347 pb no éxon 1 do Gene do AR. Além disso, parece haver relação direta entre a gravidade clínica da doença e o maior número de repetições (Fischbeck, 1997). O mecanismo de ação da SBMA não está completamente elucidado, mas provavelmente envolve a toxicidade do segmento poliglutamínico expandido na proteína do receptor androgênico. A expansão do trinucleotídeo na região codificadora leva à síntese de poliglutamina na proteína do receptor e possivelmente a um ganho tóxico da função da proteína em homens. Dessa maneira, na SBMA o aumento do trato poliglutamínico pode impedir o receptor de realizar uma importante atividade regulatória nos motoneurônios, conduzindo à degeneração dessas células (Brinkmann et al., 2001).

Entretanto, há exceções na relação genótipo-fenótipo, sugerindo que juntamente com as repetições CAG, outros fatores possam determinar a progressão da doença. A SBMA, em muitos pacientes, pode estar associada à ginecomastia, atrofia testicular e azoo/oligozoospermia, devido à perda parcial da sensibilidade aos andrógenos. Enquanto os sintomas hormonais são associados à perda da função do receptor, os sintomas neurológicos estão associados ao ganho de função tóxica da proteína. Em pacientes com diagnóstico de

CAIS (a forma completa de insensibilidade aos andrógenos), não há sinais de disfunção motora-neural (Brinkmann *et al.*, 2001; Poletti, 2004).

O estudo de La Spada *et al.* (1991) foi o primeiro a demonstrar a associação da expansão do polimorfismo CAG com a SMBA. Após este trabalho, outras alterações neurológicas foram associadas a expansões CAG. Atualmente, as repetições CAG associadas a patologias neurodegenerativas são classificadas em duas classes, com base na localização da expansão no gene mutante e nos mecanismos patológicos. A primeira classe destas doenças inclui alterações caracterizadas por expansões de repetições localizadas em regiões não traduzidas do gene envolvido: Síndrome do X-frágil; distrofia miotônica; ataxia de *Friedreich*; ataxia espinocerebelar (*Spinal-cerebellar ataxia* – SCA) 8 e 12. O tamanho da expansão é mais variável: de 100 até 3000 inserções de glutamina. A segunda classe inclui doenças em que as expansões estão localizadas em regiões codificantes: Doença de *Huntington*, SCA 1, 2, 3 ou Doença de Machado-*Joseph*, SCA 6, 7 e 17 e dentatorubropalidolusiana. O tamanho destas expansões é considerado pequeno e geralmente consiste de menos de 100 repetições (Fischbeck, 1997; Poletti, 2004; Poletti *et al.*, 2005).

A semelhança das mutações encontradas nestas doenças sugere a existência de um mecanismo comum causado por uma neurotoxicidade intrínseca ao trato poliglutamínco expandido. Esta observação é embasada em estudos que mostram que camundongos *knock out* para o Gene do Receptor de Andrógenos apresentam funções motoneurais normais, enquanto diversos modelos usando tratos poliglutamínicos expandidos demonstraram que estes animais apresentaram disfunções neurológicas e morte das células neurais (Ono *et al.*,1974; Abel *et al.*, 1998; McManammy *et al.*, 2002; Sato *et al.*, 2003).

A expansão do trato CAG leva a mudança da estrutura protéica e induz a formação de agregados intracelulares. No nível estrutural, estes agregados apresentam aspecto granular e fibroso e não possuem membranas, mas ainda não está claro se estas inclusões são a causa ou

o efeito das expansões CAG (Klement et al., 1998; Stenoien et al., 1999; Arrasate et al., 2004).

A associação do polimorfimo CAG com a doença de *Kennedy* e outras doenças neurodegenerativas criou precedentes para o estudo deste polimorfismo em pacientes com infertilidade idiopática, uma vez que pacientes portadores desta doença apresentam parâmetros seminais alterados (Westerveld *et al.*, 2008).

Em 1997, foi publicado o primeiro estudo em que se associou a variação do trato poliglutamínico CAG com infertilidade. Este trabalho, realizado na China, analisou a região CAG do éxon 1 do Gene do AR em 153 pacientes inférteis e em 73 homens com fertilidade comprovada e verificou que indivíduos com 28 repetições CAG ou mais apresentavam um risco maior de infertilidade e, quanto mais grave a anormalidade espermatogênica, maior a proporção de pacientes com repetições longas (Tut *et al.*, 1997).

Em contrapartida, surgiu uma série de estudos com o objetivo de avaliar o grau de associação entre as repetições CAG e o diagnóstico de infertilidade idiopática: Dowsing et al., 1999, Patrizio et al., 2001; Madgar et al. 2001; Mifsud et al. 2001; Mengual et al., 2003; Radpour et al., 2008 verificaram associação entre expansões do polimorfismo CAG com o diagnóstico de infertilidade idiopática, porém as repetições estavam dentro dos padrões considerados normais. Já os trabalhos de: Dadze et al., 2000; Sasagawa et al., 2001; von Eckardstein et al., 2001; Tse et al., 2003; Ferlin et al., 2004; Ruhayel et al., 2004; Tufan et al., 2005; Rajender et al., 2006; Martínez-Garza et al., 2008; Weterveld et al., 2008; Badran et al., 2009 não verificaram correlação entre o polimorfismo CAG e os parâmetros seminais.

Estes resultados conflitantes sugerem que o número de repetições CAG possa estar associado com a origem étnica dos grupos estudados. Estudos envolvendo indivíduos da Ásia, Singapura, Austrália, Estados Unidos e Japão indicam que o aumento na extensão das repetições de trinucleotídeos CAG está associado com a infertilidade masculina. Esta

associação, entretanto, não foi observada em países europeus, sugerindo que a carga genética talvez desempenhe um papel significante na expressão dos defeitos do AR. A distribuição do número de repetições CAG encontradas em afro-americanos foi considerada baixa, intermediária em pacientes brancos e alta em asiáticos (Tut et al., 1997; Lundin et al., 2003). Além disso, outros fatores podem contribuir para este impasse: o número de pacientes analisados tanto no grupo com infertilidade idiopática como no grupo controle e os diferentes critérios de inclusão de pacientes variam muito entre os estudos e também podem interferir nos resultados, dificultando assim, a comparação entre os mesmos (Ferlin et al., 2004).

Estudos *in vitro* utilizando AR com construções de 15, 20 e 31 repetições CAG mostraram uma correlação inversa entre comprimento da região CAG e a capacidade trasnericional do receptor. Ou seja, quanto maior o número de repetições, menor é a atividade do receptor (Tut *et al.*, 1997).

As expansões CAG e o seu mecanismo de ação modulando a atividade protéica ainda não foram completamente elucidados e o envolvimento destas repetições na espermatogênese ainda é pouco claro. A ação combinada do polimorfismo CAG com o polimorfismo GGC é completamente desconhecida. Nesse sentido, há a necessidade de um maior número de estudos que contribuam para esclarecer o mecanismo de ação do trato poliglutamínico (Ferlin et al., 2006).

3.5. Mutações no gene do receptor de andrógenos

A Síndrome de Insensibilidade aos Andrógenos (*Androgen Insensitivity Syndrome* – AIS) é uma alteração rara com herança ligada ao cromossomo X e afeta indivíduos com o cariótipo 46, XY, nos quais há prejuízo total ou parcial no processo de virilização intra-útero devido a alterações funcionais no AR (Quigley *et al.*, 1995).

A AIS caracteriza-se por apresentar um espectro de fenótipos. Na forma completa de apresentação da síndrome (CAIS - Complete Androgen Insensitivity), os pacientes têm genitália externa feminina, com ausência ou rarefação dos pêlos pubianos, vagina em fundocego e ausência de útero. Geralmente, os níveis de testosterona e LH são elevados na puberdade, indicando resistência hormonal a nível hipotálamo-pituitário. Níveis elevados de testosterona são também substratos para atividade da aromatase, resultando em uma quantidade substancial de estrógenos, que é responsável pela posterior feminilização dos indivíduos portadores de CAIS. Na forma parcial (PAIS – Partial Androgen Insensitivity) da síndrome, o fenótipo dos indivíduos é altamente variável: a maior parte dos autores considera a forma mais grave a apresentação de fenótipo feminino, com discreta clitoromegalia e fusão parcial dos pequenos lábios. Outros pacientes têm importante ambigüidade genital ao nascimento. Em alguns casos, o fenótipo é masculino, porém com micropênis, hipospadia perineal e criptorquidia. Há relatos de casos em que a forma parcial da AIS é manifestada apenas por ginecomastia em homens férteis. As estruturas derivadas dos Ductos de Wolff podem desenvolver-se em grau variável, na dependência do nível de sensibilidade aos andrógenos. Durante a puberdade pode ocorrer virilização ou feminilização. Do mesmo modo que na forma completa da AIS, o desenvolvimento das mamas e a feminilização podem ocorrer devido aos níveis relativamente altos de estrógeno. Em alguns casos, mutações que resultam em pequena disfunção do AR estão relacionadas a MAIS (Minimal Androgen Insensitivity Syndrome), que resulta em infertilidade, porém com ausência de anormalidades nas características sexuais masculinas (Quigley et al., 1995; Young et al., 2000; Loy & Young, 2001).

No Gene do AR, quatro tipos de mutações foram correlacionadas com o diagnóstico de AIS e infertilidade: deleções gênicas completas ou parciais; deleção ou inserção de 1 a 4 pares de bases; mutações pontuais; mutações nas regiões intrônicas que alteram o processo de

splicing do Gene do AR (Quigley et al., 1995). Atualmente, mais de 400 mutações são conhecidas (Gottlieb et al., 2004). A freqüência de deleções ou inserções no Gene do AR varia de 5 a 10%. Estas mutações possuem tamanhos variáveis, desde a deleção de um ou múltiplos nucleotídeos até a deleção de todo o gene. A substituição de um único nucleotídeo é muito mais freqüente, quando comparada à freqüência de deleções e inserções. Quando estas mutações resultam em alteração no splicing do RNAm e códon de parada, ocasionam grandes alterações na estrutura do receptor. A presença destas mutações está relacionada com a forma completa de AIS – CAIS (MacPhaul et al., 2002).

As substituições de aminoácidos no domínio DBD originam RAs mutantes que se ligam normalmente aos andrógenos, mas apresentam capacidade diminuída de ligação às sequências gênicas dos genes responsivos a andrógenos. As substituições de aminoácidos no domínio LBD resultam em uma variedade de alterações na capacidade de ligação dos ARs aos andrógenos e representam cerca de 60% das mutações identificadas (*hot spot* mutacional) em pacientes com defeitos clínicos decorrentes da ação de insensibilidade aos andrógenos. Os estudos de MacPhaul (1998) e Ahmed e cols (2000) demonstraram que estas mutações localizam-se preferencialmente entre os éxons 5 e 7 do Gene do Receptor de Andrógenos.

Em alguns casos, o AR mutante pode tornar-se incapaz de se ligar aos andrógenos, provavelmente por alterações na estrutura da proteína. Estudos *in vitro* destes ARs mutantes demonstraram que o uso de doses elevadas de testosterona ou DHT ou potentes agonistas podem compensar o efeito de alguns ARs mutados (MacPhaul *et al.*, 2002).

A maioria das mutações relacionadas à infertilidade masculina resulta em redução do potencial de transcrição da proteína mutante. Entretanto, não há correlação entre o tipo de mutação e o subtipo de infertilidade: azoospermia, oligozoopermia ou teratozoospermia (espermatozóides com alterações morfológicas). A especificidade destas mutações e a sua

relação com infertilidade permanecem obscuras, porque muitas delas também foram relatadas em indivíduos normais (Gottlieb *et al.*; 2004).

4. METODOLOGIA

4.1. Pacientes e Aspectos Éticos

4.1.1. Aspectos Éticos

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Caxias do Sul. Os estudos foram realizados de acordo com os aspectos éticos que preservam a privacidade de cada indivíduo, tanto do grupo controle, como do grupo de pacientes. Além disso, estes indivíduos concordaram verbalmente e por escrito, assinando o termo de consentimento livre e esclarecido (Anexo 01), com a coleta de material para fins de pesquisa.

4.1.2. Pacientes

Primeiramente, realizou-se a seleção de casais que há um ano tentavam estabelecer gravidez sem o uso de métodos contraceptivos. Para o estudo, foram selecionados homens parceiros de mulheres que já possuíam pelo menos um filho por meio de concepção natural proveniente de relacionamento anterior. Estes casais não apresentaram alterações no exame físico e nem nos parâmetros hormonais (homens: FSH, LH, tesotosterona e SHBG; mulheres: FSH, LH e estradiol).

O grupo de pacientes constituiu-se de 45 homens com infertilidade idiopática, provenientes da Clínica Fertilização Humana *Conception*, em Caxias do Sul – Rio Grande do Sul, onde foram realizados o exame físico e a análise seminal. Foi coletada uma amostra de

sangue periférico de cada paciente para análise molecular (5 mL), que se procedeu no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade de Caxias do Sul (UCS).

Pacientes que se submeteram a procedimentos cirúrgicos (reversão de vasectomia, vasoepididimostomia), expostos à radiação ou quimioterápicos, com doenças sistêmicas com tratamento que pode causar alterações na espermatogênese, que estavam fazendo uso de antioxidantes e com infecção do trato urogenital foram excluídos deste estudo.

Os pacientes com concentração espermática inferior ou igual a 2 milhões espermatozóides/mL foram submetidos a exames para investigação de alterações genéticas (cariótipo, microdeleções do cromossomo Y, gene CFTR – fibrose cística). Pacientes com ausência de canal deferente também foram submetidos a exame para análise do gene CFTR.

Os exames referentes aos parâmetros hormonais e de investigação de alterações genéticas, descritos acima, foram realizados em laboratórios terceirizados. Assim, estes dados não foram incluídos no presente estudo.

4.1.3. Grupo Controle

O grupo controle constituiu-se de 45 homens com a paternidade confirmada por teste de DNA, os quais foram atendidos no Laboratório de Biologia Molecular da UCS.

As amostras de DNA foram obtidas a partir de células da mucosa oral, através da raspagem da mucosa com o auxílio de urna espátula de plástico. A análise molecular foi realizada no Laboratório de Biologia Molecular - UCS.

Não foi possível realizar a coleta de sêmen destes indivíduos, por isso não podemos afirmar que os mesmos apresentam parâmetros seminais considerados normais, no entanto tiveram paternidade confirmada através da análise de seu DNA (Investigação de Paternidade).

Inicialmente, o grupo controle era constituído por 49 homens, porém após análise dos resultados do seqüenciamento automatizado, 04 foram excluídos: Cont. 01, Cont. 09, Cont. 14 e Cont. 17 (Anexo 02). Estas amostras apresentaram sinal de base muito alto, sendo excluídas do estudo, pois não puderam ser seqüenciadas novamente.

A seleção dos grupos de estudo e a coleta das amostras foram realizadas no período de dezembro de 2007 até julho de 2009.

4.2. Análise Seminal

Uma amostra seminal foi coletada por meio de masturbação após um período de abstinência ejaculatória de 48-72 horas. Após liquefação, a análise seminal foi realizada pelo método manual. Os parâmetros seminais foram avaliados em relação ao critério da Organização Mundial da Saúde (WHO, 1999). A morfologia também foi analisada com base no critério de Kruger (1986).

4.3. Extração de DNA

A extração de DNA foi realizada com Kit comercial (*Wizard Genomic Purification* – Promega) para as células da mucosa oral e para as amostras de sangue periférico, segundo recomendações do fabricante.

4.4. Extração de DNA de Células de Mucosa Oral

Foram coletadas três amostras de células de mucosa oral de cada indivíduo do grupo controle. Uma das amostras foi imediatamente submetida à extração de DNA, enquanto as

outras duas foram conservadas a –20°C em solução de TE (Tris, EDTA – pH=7,5). Esta técnica baseia-se nas seguintes etapas para a obtenção do DNA: foram adicionados 600μL de Solução de Lise Nuclear e 1,5μL de RNAse a um tubo tipo *Eppendorf* de 1,5mL contendo a amostra e, homogeneizou-se por 10 segundos. Em seguida, os tubos foram incubados a 37°C por 20 minutos. Depois, as amostras foram incubadas a 65°C por 20 minutos. Após este período, adicionou-se 200μL de Solução de Precipitação de Proteínas em cada tubo e agitou-se em vórtex por 10 segundos. As amostras foram submetidas a banho de gelo por 5 minutos e, depois, centrifugadas a 14000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para outro tubo contendo 600μL de isopropanol gelado e, misturou-se lentamente por inversão. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 14000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi removido com auxílio de um micropipetador e, adicionou-se 600μL de etanol 70%. Os tubos foram centrifugados novamente a 14000 rpm por 3 minutos e retirou-se o sobrenadante. Os tubos foram invertidos para secagem sob papel absorvente por 10 minutos em estufa a 60°C. Em seguida, adicionou-se 50μL de Solução de Reidratação de DNA e as amostras foram armazenadas a –20°C.

4.5. Extração de DNA a partir de Linfócitos

A extração de DNA foi realizada a partir de 5mL de sangue periférico coletado em tubo contendo anticoagulante (EDTA). As amostras de sangue foram guardadas a 4°C até, no máximo, um dia após a coleta. Esta técnica baseia-se nas seguintes etapas para a obtenção do DNA: foram adicionados 900μL de Solução de Lise de Células a 300μL de amostra em um micro tubo tipo *Eppendorf* de 1,5mL. As amostras foram homogeneizadas por inversão. Em seguida, os tubos foram incubados por 10 minutos a temperatura ambiente. Após, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 20 segundos. Descartou-se o máximo possível do

sobrenadante e os tubos foram agitados vigorosamente em vórtex até a ressuspensão total do pellet. Foram adicionados 300μL de Solução de Lise de Nuclear e 1,5μL de RNAse. Em seguida, as amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C por 20 minutos. Após este período, foram adicionados 100μL de Solução de Precipitação de Proteínas e os tubos foram agitados em vórtex por 20 segundos. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.00 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi transferido para um tubo contendo 300μL de isopropanol gelado e os tubos foram invertidos gentilmente. As amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 3 minutos. O isopropanol foi retirado com auxílio de um micropipetador. Adicionaram-se 300μL de etanol 70% e os tubos foram invertidos 10 vezes. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 3 minutos. O sobrenadante foi descartado e os tubos foram invertidos para secagem em papel absorvente em estufa a 60°C por 10 minutos. Após, foram adicionados 100μL de Solução de Reidratação e as amostras foram incubadas a 65°C por uma hora ou a 4°C *overnight* e armazenadas a-20°C.

4.6. Determinação da Concentração de DNA

A concentração de DNA foi determinada através da leitura da absorbância em espectrofotômetro nos comprimentos de onda 260nm e 280nm. Para a leitura, 10μL de DNA foram diluídos em 990μL de água Milli'Q autoclavada.

4.7. Amplificação dos segmentos CAG e dos Éxons 5 e 7

A região polimórfica CAG e os éxons 5 e 7 e as respectivas regiões de *splicing* foram amplificadas pela técnica de Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), em reações separadas, em termociclador (Tonegen Paml 7.0). As reações de PCR foram feitas a partir de 80 ng de

DNA em um volume final de reação de 25μL, contendo 20 pmol de cada oligonucleotídeo, *Platinum Taq* DNA Polimerase (Invitrogen) 5U/uL, 10X tampão da enzima (50mM KCl; 10mM Tris-HCL pH = 8,3; 0,01% gelatina), 25mM de dNTPs e 50mM de MgCl₂. Para amplificação da região polimórfica CAG utilizaram-se os *primers* A0 e A5. As amostras foram desnaturadas a 94°C por 5 minutos seguidos de 37 ciclos de 94°C por 1 minuto (desnaturação), 60°C por 1 minuto (anelamento) e 72°C (extensão) por 1 minuto. Uma extensão final de 10 minutos (72°C) completou a reação (Ferlin *et al.*, 2004). Para a amplificação do éxon 5 utilizaram-se os *primers* E1 e E2 e para o éxon 7 os *primers* G1 e G2 (Tabela 1). Utilizou-se a mesma ciclagem para ambos os éxons: as amostras foram desnaturadas a 95 °C por 5 minutos seguidos por 30 ciclos de 95 °C por 1 minuto, 60 °C por 1 minuto e 72 °C por 1 minuto. Uma extensão final de 10 minutos completou a reação (Lubahn *et al.*, 1989).

Tabela 1. Lista de *primers* utilizados para amplificação do polimorfismo CAG e dos éxons 5 e 7 do Gene do Receptor de Andrógenos

Primer	Sequência (5' →3')	Fragemento (Pb)	
A0	GTGGTTGCTCCCGCAAGTTTCC	900	
A5	TAATTGTCCTTGGAGGAAGTGGGAGC	800	
E1	CAACCCGTCAGTACCCAGACTGACC	285	
E2	AGCTTCACTGTCACCCCATCACCATC	263	
G1	CTTTCAGATCGGATCCAGCTATCC CTCTATCAGGCTGTTCTCCCTGAT		
G2			

4.8. Análise Eletroforética

Após a amplificação de cada éxon e da região polimórfica CAG os *amplicons* foram analisados em gel de poliacrilamida 4,6% não desnaturante: 3μL do produto do PCR foram diluídos em 2μL tampão acrilamida em comparação com o marcador de peso molecular

pGene (Promega). A seguir, as amostras foram submetidas à eletrofoerese, a qual foi realizada nas seguintes condições: a 150V, 100mA em tampão TBE 1X (Tris – HCl, Ácido Bórico, EDTA – pH=8,0) por 30 minutos. Após a eletroforese, os produtos foram visualizados nos géis através da revelação com nitrato de prata.

Para a reação de sequenciamento, os *amplicons* foram analisados em gel de agarose 1,5% (com 4μL de brometo de etídeo): 4μL do produto do PCR foram diluídos em 1μL de tampão glicerol e foi usado o marcador de peso molecular *Low Mass DNA Ladder* (Invitrogen). A eletroforese foi realizada nas mesmas condições descritas anteriormente, porém com tampão TBE concentrado 0,5X. Os produtos foram visualizados em transluminador UV.

4.9. Coloração com Nitrato de Prata

O gel de poliacrilamida foi mergulhado em tampão de fixação por 5 minutos (150mL de etanol + 1 mL de ácido acético). Após este período, adicionou-se 0,3g de nitrato de prata e o gel foi mantido nesta solução por 10 minutos. Em seguida, retirou-se o tampão de fixação + nitrato de prata e o gel foi lavado com água deionizada por 10 segundos. Mergulhou-se o gel em tampão de revelação (4,5g de NaOH + 500μL de formaldeído + água deionizada, num volume final de 150mL) por aproximadamente 10 minutos. O tampão de revelação foi retirado e o gel foi lavado com água novamente. Em seguida, o gel foi mergulhado novamente em tampão de fixação por 5 minutos. Todas as etapas foram realizadas sob constante agitação.

4.10. Sequenciamento do DNA

Os produtos de PCR foram purificados com um de mix de purificação enzimática (0,33U de Exonuclease I, 0,66U de Shrimp Alkaline Phosphatase, água Milli'Q num volume final de 1µL por amostra) através da incubação à 37°C por 45 minutos, seguida da inativação enzimática à 80°C por 15 minutos. Em seguida, as amostras foram submetidas à reação de sequenciamento (segundo recomendações do fabricante): para cada amostra utilizou-se 0,75µL de Big Dye Terminator (GE Healthcare), 3,25µL de Tampão Save Money (Tris – HCl pH = 9,0 - 1M; MgCl₂ 50mM), 1µL de primer forward (5 pmol), amplicons (80ng) e água Milli'Q em um volume final de 10µL nas seguintes condições de ciclagem: 96°C por 1 minuto, seguido de 30 ciclos de 96°C por 15 segundos, 50°C por 15 segundos e 60°C por 4 minutos. Em seguida, as amostras foram precipitadas com isopropanol: adicionaram-se 90µL de isopropanol 66% em cada tubo. As amostras foram homogeneizadas e ficaram à temperatura ambiente por 15 minutos. Após este período, as amostras foram centrifugadas por 20 minutos a 12.000 rpm. Descartou-se o sobrenadante, com auxílio de um micropipetador, e foram adicionados 150µL de isopropanol 75% ern cada amostra. Homogeneizou-se gentilmente e centrifugou-se por 10 minutos a 12.000 rpm; O sobrenadante foi descartado e os tubos invertidos sob papel absorvente para secagem em estufa a 45°C por 10 minutos.

Em seguida, as amostras foram sequenciadas através da técnica de sequenciamento automatizado em sequenciador ABI 3100 *Applied Biosystems*. O seqüenciamento das amostras foi realizado no Departamento de Ciências Biomédicas (ICB - II) da Universidade de São Paulo. Os dados referentes ao seqüenciamento foram analisados no programa *BioEdit* versão 7.0.9 e o alinhamento de seqüências foi feito com o auxílio do *software ClustalW* 2.

4.11. Análise Estatísitica

Os dados obtidos foram tabulados e analisados com o auxílio do *software* estatístico Statistical Package for the Social Sciences (SPSS) for Windows Inc., USA versão 17.0. Para análise dos resultados foram utilizados os testes descritos abaixo (Intervalo de Confiança de 95%):

- ✓ Teste de Normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk;
- ✓ Teste *t-student* para avaliar diferenças entre médias;
- ✓ Análise de Variância (ANOVA) comparação múltipla de médias;
- ✓ Correlação de *Pearson* para verificar o grau de associação entre as variáveis.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Análise Seminal

Na análise seminal foram avaliados três critérios: concentração, motilidade e morfologia (WHO, 1999). A morfologia também foi analisada segundo Kruger (1986). Cada critério foi analisado individualmente. Com relação à concentração, o grupo de pacientes foi classificado em três grupos: normozoospérmicos (concentração igual ou superior a 20 milhões espermatozóides/mL), oligozoospérmicos (concentração superior a 5 milhões de espermatozóides/mL e inferior a 20 milhões de espermatozóides/mL) e oligozoospérmicos graves (concentração inferior ou igual a 5 milhões de espermatozóides/mL): 22 pacientes (48,88%) foram classificados como normozoospéricos, 14 como oligozoospérmicos (31,11%) e 09 como oligozoospérmicos graves (20,00%). Dentre os pacientes com oligozoospermia grave, dois foram classificados como azoospérmicos (ausência de espermatozóides no ejaculado).

Segundo o critério motilidade, os pacientes foram classificados em dois grupos: com motilidade igual ou superior a 50% (19 pacientes – 42,22%) e com motilidade inferior a 50% (26 pacientes – 57,77%).

Quanto à morfologia, todos os pacientes analisados apresentaram análise seminal com padrões abaixo dos considerados normais segundo os dois critérios: abaixo de 30%, segundo a OMS e abaixo de 14% segundo Kruger. Assim, para fins de comparação, os pacientes foram agrupados conforme a gravidade dos padrões morfológicos. Em relação aos critérios da OMS, os pacientes foram divididos em três grupos: com morfologia igual ou superior a 15% (12 pacientes – 31,57%), com morfologia variando entre 10 a 14% (8 pacientes – 21,05%) e com morfologia inferior a 10% (18 pacientes – 47,36%). Com relação ao critério de Kruger, os

pacientes foram classificados em dois grupos: com morfologia superior a 4% (13 pacientes – 35,13%) e com morfologia inferior ou igual a 4% (24 pacientes – 64,86%). Não foi possível avaliar a morfologia da análise seminal de 07 (15,50%) pacientes segundo a OMS e em 08 (17,77%) segundo Kruger, pois quando a concentração seminal é inferior a 2 milhões de espermatozóides/mL, a morfologia não é analisada.

A concentração da análise seminal variou de 0 a 205 milhões/espermatozóides/mL com média e desvio padrão (DP) de 30,10±36,51. A motilidade dos espermatozóides variou de 0 a 91,21% com uma média de 40,93±20,70 (DP). A morfologia segundo a OMS variou de 1 a 22%, com uma média e 10,70±6,55 (DP), e a morfologia segundo Kruger variou de 0 a 12%, com uma média de 3,80 ± 2,80 (DP) (Anexo 03).

A grande heterogeneidade dos trabalhos envolvendo homens com infertilidade idiopática dificulta a comparação entre a análise seminal dos mesmos. Apesar de todos adotarem os critérios da OMS e Kruger para classificação dos resultados obtidos na análise seminal, a grande variação do número de indivíduos envolvidos em cada estudo e os diferentes critérios de aceitação do grupo de pacientes e do grupo controle inviabiliza a comparação entre os mesmos.

5.2. Análise do Polimorfismo CAG do éxon 1 do Gene do Receptor de Andrógenos

A região polimórfica (CAG)nCAA foi analisada com base no alinhamento de sequências gerado através do *software ClustalW* 2. Cada amostra foi comparada individualmente com sua sequência de referência depositada no *GeneBank* (NM_000044.2), conforme ilustrado abaixo (Figura 4).

CAG	TTCTCTGGAGCTTCCCGCAGGTGGGCAGCTAGCTGCAGCGACTACCGCATCATCACAGCC	60
Pacl167	TTCTCTGGAGCTTCCCGCAGGTGGGCAGCTAGCTGCAGCGACTACCGCATCATCACAGCC	60
CAG	TGTTGAACTCTTCTGAGCAAGAGAAGGGGGGGGGGGGGG	120
Pacl167	TGTTGAACTCTTCTGAGCAAGAGAAGGGGGGGGGGGGGG	120
CAG	AGCCAAGCTCAAGGATGGAAGTGCAGTTAGGGCTGGGAAGGGTCTACCCTCGGCCGCCGT	180
Pacl167	AGCCAAGCTCAAGGATGGAAGTGCAGTTAGGGCTGGGAAGGGTCTACCCTCGGCCGCCGT :	180
CAG	CCAAGACCTACCGAGGAGCTTTCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGCGCGAAGTGATCCAGA	240
Pacl167	CCAAGACCTACCGAGGAGCTTTCCAGAATCTGTTCCAGAGCGTGCGCGAAGTGATCCAGA	240
CAG	ACCCGGGCCCCAGGCACCCAGAGGCCGCGAGCGCAGCACCTCCCGGCGCCAGTTTGCTGC	300
Pacl167	ACCCGGGCCCCAGGCACCCAGAGGCCGCGAGCGCAGCTCCCGGCGCCCAGTTTGCTGC (300
CAG	TGCTGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG	860
Pacl167	TGCTGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCAG	860
CAG	AGCAGCAGCAGCAAGAGACTAGCCCCAGGCAGCAGCAGCAGCAGCAGGGTGAGGATGGTT	120
Pacl167	AGCAGCAGCAGCAAGAGACTAGCCCCAGGCAGCAGCAGCAGCAGCAGGGTGAGGATGGTT	120
CAG	0.000	480
Pacl167	CTCCCCAAGCCCATCGTAGAGGCCCCACAGGCTACCTGGTCCTGGATGAGGAACAGCAAC	480
CAG	CTTCACAGCCGCAGTCGGCCCTGGAGTGCCACCCCGAGAGAGGTTGCGTCCCAGAGCCTG	540
Pacl167	CTTCACAGCCGCAGTCGGCCCTGGAGTGCCACCCCGAGAGAGTTGCGTCCCAGAGCCTG	540

Figura 4. Análise computacional comparando-se a região polimófica CAG depositada no *Gene Bank* com a do paciente 1167

A presença de asterisco (*) evidencia que não houve substituição de nucleotídeos, ou seja, que a sequência analisada é semelhante à depositada no banco de dados. Neste caso, a sequência do *Gene Bank* (CAG) tem o mesmo número de repetições CAG (22) que a região amplificada do paciente 1167 (Pac-1167).

A média das repetições CAG do éxon1 do Gene do RA do grupo de pacientes foi de 20,04±03,93 (DP) com um mínimo de 10 e máximo de 30. O grupo controle apresentou uma média de 20,64 ±03,71 (DP) com um mínimo de 11 e máximo de 31 repetições (Tabela 2).

Tabela 2. Média das repetições C	AG do Grupo de	e Pacientes e do	Grupo Controle do
Éxon1 do Gene do Receptor de Ar	drógenos		

	Média	Desvio Padrão	Valor Mínimo	Valor Máximo	Mediana	IC
Grupo de Pacientes	20,04	$\pm 03,93$	10	30	20	
						95%
Grupo Controle	20,64	$\pm 0.3,71$	11	31	21	

A Figura 5 representa o *boxplot* com a distribuição dos alelos e indica que a variabilidade das repetições CAG é menor no grupo de pacientes do que no grupo controle.

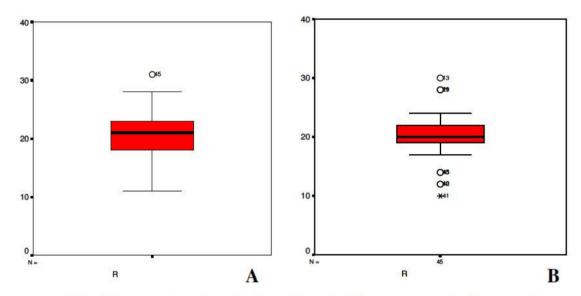


Figura 5. *Box Plot* com a distribuição dos alelos do Polimorfismo CAG do éxon 1 do Gene do Receptor de Andrógenos no Grupo Controle (A) e no Grupo de Pacientes (B)

As médias das repetições CAG do grupo controle e do grupo de pacientes são muito próximas, sendo a média do grupo controle ligeiramente maior (0,6), contrariando, neste grupo de indivíduos, a hipótese de o trato poliglutamínico ser expandido em pacientes com infertilidade idiopática. No grupo de pacientes, foram identificados 12 alelos, sendo os com 20 (17,80%) e 21 (17,80%) repetições CAG os mais freqüentes, ambos identificados em 8 pacientes. Foram identificados 13 alelos no grupo controle, sendo o 18 (15,55%) e o 21 (20,00%) os mais freqüentes, identificados em 7 e 9 pacientes respectivamente. Foram identificados 17 alelos diferentes entre os dois grupos de estudo (Anexo 04).

A distribuição do número de repetições CAG encontradas em afro-americanos foi considerada baixa, intermediária em pacientes brancos e alta em asiáticos. Estudos envolvendo indivíduos da Ásia, Singapura, Austrália, Estados Unidos e Japão indicam que o aumento na extensão das repetições de trinucleotídeos CAG está associado com a infertilidade masculina. Esta associação, entretanto, não foi observada em países europeus, sugerindo que a carga genética talvez desempenhe um papel significante na expressão dos defeitos do RA. (Tut et al., 1997; Lundin et al., 2003).

A maioria dos trabalhos classifica etnicamente os indivíduos. Porém, no presente estudo, os dois grupos analisados não foram classificados segundo este fator, porque os critérios utilizados (cabelo, cor da pele, espessura dos lábios, largura do nariz) são subjetivos. A população brasileira é uma das mais heterogêneas do mundo. Um estudo brasileiro, utilizando marcadores moleculares, demonstrou que a nível individual, não é possível obter uma classificação confiável do critério de cor com base no fenótipo individual, segundo a análise genética de microsatálites (Pimenta et al., 2006). Este trabalho analisou 12 regiões microsatélites de 752 indivíduos no Estado de São Paulo e verificou que não há significância estatística entre as regiões amplificadas e os critérios de cor (branca, intermediária e negra). Em outras palavras, a cor, determinada pela análise física não é um fator confiável para determinar a origem étnica ou a ancestralidade. Nesse sentido, nosso trabalho difere dos demais, pois o enfoque baseou-se no diagnóstico individual de infertilidade. O estudo de Sasaki et al. (2003), realizado nos Estados Unidos, comparou a região polimórfica CAG de 221 indivíduos de origem japonesa e 177 de origem germânica. Neste trabalho, concluiu-se que o tamanho das repetições CAG é levemente maior em indivíduos de origem japonesa (14 -31) do que nos de origem alemã (15 -29), porém este dado não tem significância estatística. Ou seja, não há correlação entre o polimorfismo CAG e a origem étnica (japonesa ou alemã) dos pacientes. A relação genótipo/fenótipo envolvida na etiologia da infertilidade idiopática permanece obscura, sendo necessário um número maior de estudos comparativos para elucidar o mecanismo de ação do trato poliglutamínico.

5.3. Análise de Mutações dos Éxons 5 e 7 do Gene do Receptor de Andrógenos

A busca por mutações foi procedida com base no alinhamento de sequências conforme descrito no item anterior. Foram analisadas as regiões codificadoras dos éxons 5 e 7 de 45 homens do grupo de pacientes e 45 do grupo controle e não se verificou a presença de mutações nos dois grupos analisados. No paciente 791, não foi possível identificar a sequência completa de nucleotídeos (Figura 6). Neste paciente, dois nucleotídeos localizados no éxon 5 não foram identificados: o primeiro devido a sobreposição de picos na região seqüenciada, representada pela letra "N" (qualquer nucleotídeo) (Figura 7A); e o segundo, devido a um sinal de seqüenciamento muito baixo (Figura 7B). A Figura 8 ilustra a região codificadora do éxon 7, do mesmo paciente, onde não se verifica a presença de mutações em comparação com sequência depositada no banco de dados.

Exon5	ACTGCCTCTGCCTCTTCTCCCAGGCTTCCGCAACTTACACGTGGACGACCAGATGGCT 60	
Pac791	ACTGCCTCTGCCTCTTCTTCTCCAGGCTTCCNCAACTTACACGTGGACGACCAGATGGCT 60	

Exon5	GTCATTCAGTACTCCTGGATGGGGCTCATGGTGTTTGCCATGGGCTGGCGATCCTTCACC 12	0
Pac791	GTCATTCAGTACTCCTGGATGGGGCTCATGGTGTTTGCCATGGGCTGGCGATCCTTCACC 12	0

Exon5	AATGTCAACTCCAGGATGCTCTACTTCGCCCCTGATCTGGTTTTCAATGAGTAAGTGCTC 18	0
Pac791	AATGTCAACTCCAGGATGCTCTACTTCGCCCCTGATCTGGTTTTCAATGAGTAAGTGCTC 18	0

Exon5	CTGGGGCCCAGACCTCACTAAAATACAGCAGCTTGGCCAGACCTGGTTGGT	0
Pac791	CTGGGGCCCAGACCTCACTAAAATACAGCAGCTTGGCCAGACCTGGTTGGT	0

Exon5	GATGGGGTGACAGTGAAGCT 260	
Pac791	GATGGGGTGACAGTGAANCT 260	
	********** **	

Figura 6. Análise computacional comparando-se a região codificadora do éxon 5 do Gene do RA depositada no banco de dados com a do paciente 79

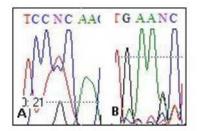


Figura 7. Nucleotídeos não identificados no sequenciamento do éxon 5 do paciente 791

Exon7	TTTCCCCTGAGATCTCCCTGACAGACTGAAGGCCCCAAGCACACAGACTTCAACTAACAG	60
Pac791	TTTCCCCTGAGATCTCCCTGACAGACTGAAGGCCCCAAGCACACAGACTTCAACTAACAG	60

Exon7	GAAGCCAAGTAGATGGTTCCCT'GTGGGGGTGGGGGTCAAGTCTGTGGTCAGAAAACTTGG	120
Pac791	GAAGCCAAGTAGATGGTTCCCTGTGGGGGGTGGGGGTCAAGTCTGTGGTCAGAAAACTTGG	120

Exon7	TGCTTTGTCTAATGCTCCTTCGTGGGCATGCTTCCCCTCCCCATTCTGTCTTCATCCCAC	180
Pac791	TGCTTTGTCTAATGCTCCTTCGTGGGCATGCTTCCCCTCCCCATTCTGTCTTCATCCCAC	180

Exon7	ATCAGTTCCAGTGGATGGGCTG:AAAAATCAAAAATTCTTTGATGAACTTCGAATGAACTA	240
Pac791	ATCAGTTCCAGTGGATGGGCTGAAAAATCAAAAATTCTTTGATGAACTTCGAATGAACTA	240
	******************	100.00.00
Exon7	CATCAAGGAACTCGATCGTATCATTGCATGCAAAAGAAAAATCCCACATCCTGCTCAAG	300
Pac791	CATCAAGGAACTCGATCGTATCATTGCATGCAAAAGAAAAAATCCCACATCCTGCTCAAG	300

Exon7	ACGCTTCTACAGCTCACCAAGCTCCTGGACTCCGTGCAGCCTGTAAGCAAACGATGGAGG	360
Pac791	ACGCTTCTACAGCTCACCAAGCTCCTGGACTCCGTGCAGCCTGTAAGCAAACGATGGAGG	360
	******************	25.00
Exon7	GTGCTTT 367	
Pac791	GTGCTTT 367	

Figura 8. Análise computacional comparando-se a região codificadora do éxon 7 do Gene do RA depositada no banco de dados com a do paciente 791

O domínio LBD é fundamental para a ligação do receptor aos andrógenos e, através da interação com o domínio TAD, leva a ativação do receptor através do recrutamento de moléculas coativadoras (McKenna *et al.*, 1999). A maioria das mutações identificadas no Gene do Receptor de Andrógenos (60%) foi identificada no domínio LBD e resulta em problemas na ligação aos andrógenos e perda da função do receptor. Entretanto, no presente estudo, verificou-se que não há correlação entre a presença de mutações na região *hot spot* mutacional do Gene do Receptor de Andrógenos e o diagnóstico de infertilidade idiopática (n

= 45). Também nenhuma mutação foi identificada no grupo controle (n = 45). Entretanto, não se pode excluir a possibilidade de o diagnóstico de infertilidade idiopática estar relacionado com a presença de mutações nos demais éxons do Gene do Receptor de Andrógenos. Este é o primeiro relato de estudo detalhado, através da técnica de següenciamento automatizado, da região hot spot mutacional do Gene do Receptor de Andrógenos em pacientes brasileiros com infertilidade idiopática. Este dado é corroborado pelo trabalho de Rajender et al. (2006), que não identificou nenhuma mutação analisando a sequência codificadora de todos os éxons do Gene do Receptor de Andrógenos de 399 pacientes (277 azoospérmicos, 100 oligozoospérmicos e 32 oligoteratozoospérmicos). O estudo de Sasagawa et al. (2001) também não identificou mutações em 81 pacientes (30 azoospérmicos e 51 do grupo controle) analisando todos os éxons do Gene do Receptor de Andrógenos. Hiort et al. (2000) e Ferlin et al. (2006), procurando identificar mutações envolvidas no diagnóstico de infertilidade idiopática, identificaram, respectivamente, a presença de 3 (n = 182) e 20 mutações (n = 1517), sendo a maioria delas localizadas nos domínios TAD e LDB. Com base nestes estudos, atribuiu-se que mutações do tipo missense estão relacionadas a 2% dos casos de infertilidade idiopática.

A presença de mutações no Gene do AR está associada com a Síndrome de Insensibilidade aos Andrógenos, uma desordem rara, ligada ao cromossomo X e que afeta somente homens com cariótipo 46, XY. O fenótipo dos pacientes varia desde completa feminilização, genitália ambígua até infertilidade, na forma mais branda de apresentação da síndrome. Mutações que levam a perda total da função do receptor estão associadas a CAIS. Mutações que não levam à perda total da função do receptor estão associadas a PAIS e MAIS. A presença de mutações no Gene do AR é tolerada porque o receptor não é essencial para a vida e, em homens, estas mutações são expressas, providenciando um sistema natural de

knock-out para o estudo dos efeitos fenotípicos deste gene (Yong *et al.*, 1998; Yong *et al.*, 2003).

Atualmente, mais de 400 mutações são conhecidas e estão envolvidas na etiologia de uma série de desordens relacionadas com o Gene do AR. Porém, poucas mutações são reportadas nos casos de infertilidade (Gottlieb et al., 2004). A maioria destas mutações resulta em redução do potencial de transcrição do receptor mutante. Entretanto, não foi verificada correlação entre o tipo de mutação e o subtipo de infertilidade (azoospermia, oligozoospermia ou teratozoospermia). Por exemplo, a substituição de uma glutamina por uma leucina no códon 58 (Gln58Leu) foi identificada em um paciente azoospérmico e em um oligoteratozoosérmico (Lund et al., 2003). A especificidade destas mutações e seu papel na etiologia da infertilidade masculina ainda são desconhecidos, porque muitas delas ocorrem na população normal. A mutação Glu211Glu foi identificada em homens férteis e inférteis. Verificou-se que 20% do potencial de transcrição do RA é reduzido como resultado da substituição Gly214Arg, resultando em oligozoospermia grave. Porém, esta mutação também foi identificada em um paciente do grupo controle (Wang et al., 1998).

Outros estudos identificaram mutações associadas à infertilidade em alguns indivíduos e a AIS em outros, porém, elas não afetaram o potencial de transcrição do receptor *in vitro* (Gottieb *et al.*, 2004). Já outros trabalhos, mostraram o oposto: a substituição Pro390Ser reduz em 62% a atividade do receptor em pacientes com oligozoospermia. A substituição Met886Val causa a redução de 50% do potencial de transcrição, resultando em oligozoospermia grave (Ghadessy *et al.*, 1999).

A maioria dos estudos concentra-se na investigação de mutações em pacientes com quadro clínico indicativo de AIS ou pacientes portadores de CAIS ou PAIS, no entanto, poucos trabalhos analisaram a prevalência destas mutações na região codificadora do Gene do Receptor de Andrógenos em pacientes inférteis (Ferlin *et al.*, 2006).

A AIS é a maior causa de pseudo-hermafroditismo masculino, tendo um importante impacto na identidade e na vida sexual dos pacientes afetados. Por isso, o conhecimento de como estas mutações são transmitidas e sua possível correlação com o diagnóstico de infertilidade idiopática é indispensável no aconselhamento genético de casais inférteis, uma vez que a presença de um receptor androgênico funcional é essencial para o processo de virilização na puberdade (Köhler *et al.*, 2004).

Apesar dos esforços realizados na última década na tentativa de identificar as mutações no AR envolvidas no diagnóstico de infertilidade idiopática, os mecanismos moleculares envolvidos na etiologia destas alterações ainda não foram completamente elucidados.

A seleção natural previne a transmissão de mutações causando infertilidade, porém este mecanismo é driblado pelas técnicas de reprodução *in vitro*. Consequentemente, o risco de se aumentar o número de indivíduos inférteis ou portadores de anormalidades genéticas na população é maior. Neste sentido, estudos como este são muito importantes para que seja analisado o risco de transmissão de anormalidades pelas técnicas de reprodução assistida e para que sejam avaliados os genes que realmente possuem importância clínica no diagnóstico de infertilidade idiopática (Ferlin *et al.*, 2006).

5.4. Correlação da Análise Seminal com o Polimorfismo CAG

Primeiramente, foram comparadas as médias entre repetições CAG do grupo de pacientes e do grupo controle. Verificou-se que não há significância estatística entre as médias (p = 0, 459). Há uma associação positiva entre elas ($r^2 = 0, 172$).

Analisamos o grau de correlação entre o polimorfismo CAG e os diferentes parâmetros seminais (concentração, motilidade e morfologia) do grupo de pacientes. Com

base nesta análise, concluiu-se que não há correlação entre o polimorfismo CAG e os critérios da análise seminal de: concentração (r = 0, 227; p = 0, 134 (Anexo 05), motilidade (r = 0, 202; p = 0, 184) (Anexo 06), morfologia segundo Kruger (r = 0, 210; p = 0, 213) (Anexo 07). Verificou-se associação entre as repetições CAG e a morfologia (OMS) (r = 0, 349; p = 0, 032) (Anexo 08). Resultado semelhante foi encontrado pelo grupo de Milatiner *et al.* (2004), que analisando a região polimórfica CAG de 172 indivíduos de origem israelense (114 homens com infertilidade idiopática e 58 do grupo controle) encontraram associação entre o polimorfismo e a morfologia da análise seminal (p = 0,01).

No presente estudo, verificou-se associação de todos os critérios da análise seminal entre si: concentração e motilidade (r = 0, 555; p < 0, 001), morfologia (OMS) e concentração (r = 0, 493; p = 0, 002), morfologia (OMS) e motilidade (r = 0, 515; p = 0,001), morfologia (Kruger) e concentração (r = 0,471; p = 0,003), morfologia (Kruger) e motilidade (r = 0,399; p = 0,015) e entre morfologia (OMS) e morfologia (Kruger) (r = 0,944; p < 0,001).

A fim de testar todas as possibilidades de associação, as médias das repetições CAG de cada um dos subgrupos relativos aos critérios concentração, motilidade e morfologia (OMS e Kruger) da análise seminal foram analisadas separadamente e comparadas entre si e com a média do grupo controle. A média e o desvio padrão das repetições CAG do grupo de pacientes classificados como normozoospérmicos foi 18,77±3,75 (DP) variando de 10 a 24, sendo menor do que no grupo controle. A média das repetições do grupo de pacientes oligozoospérmicos foi semelhante a do grupo controle 20,64±3,91 (DP) variando de 14 a 28. A média das repetições CAG do grupo de pacientes com oligozoospermia grave foi superior a do grupo controle: 22,22±3,59 (DP) variando entre 17 a 30 (Anexo 09 A). Este dado está de acordo com a hipótese de que o trato poliglutamínico é mais expandido em pacientes com anormalidades espermáticas graves. Porém, apesar das médias dos grupos oligozoospérmicos e oligozoospérmicos grave serem, respectivamente, próxima e maior do que a do grupo

controle verificou-se que não há significância estatística entre elas quando comparadas com a média do grupo controle (p = 0, 452). Entretanto, este resultado é muito importante, servindo como indício para que o trato glutamínico seja investigado em um número maior de pacientes com oligozoospermia grave.

Em relação ao critério motilidade, a média das repetições CAG dos pacientes com motilidade igual ou superior a 50% foi de 19,68±4,09 (DP) variando entre 10 a 30 repetições. No grupo com motilidade inferior a 50%, a média das repetições foi de 20,31±3,87 (DP) variando entre 12 e 28 repetições (Anexo 09 B). Não foi observada significância entre as variáveis (p = 0, 659) quando comparadas com o grupo controle. Com base na morfologia (OMS), a média das repetições CAG do grupo com morfologia igual ou superior a 15% foi de 17,58±3,65 (DP) com um mínimo de 10 e máximo de 21 repetições. A média do grupo com morfologia entre 10% a 14% foi de 19,88±4,64 (DP) com um mínimo de 12 e máximo de 28 repetições. Já a média do grupo com morfologia inferior a 10% foi de 20,72±2,96 (DP) variando entre 14 a 28 repetições (Anexo 10 A). Comparando-se as médias com o grupo controle, não foi verificada significância entre elas (p = 0, 316). Segundo o critério de Kruger, a média do grupo com morfologia superior a 4% foi de 19,08±3,74 (DP) variando entre 12 a 28 repetições. Já á média do grupo com morfologia igual ou inferior a 4% foi de 19,96±3,79 (DP) variando de 10 a 28 repetições (Anexo 10 B). Também não foi observada significância entre as médias para estes grupos em comparação com o grupo controle (p = 0, 388) (Anexo 11).

Para testar a possibilidade do aumento do número de repetições CAG estar associado com a gravidade das anormalidades da análise seminal, comparamos também as médias das repetições excluindo do grupo de pacientes os indivíduos classificados como normozoospérmicos. Verificou-se que não há significância entre as médias das repetições em comparação com o grupo controle (p = 0, 503).

Testou-se a hipótese de a infertilidade idiopática estar associada com o aumento ou diminuição das repetições CAG. Para isso, definiu-se com base na freqüência, que os alelos maiores (com mais expansões) possuem 21 repetições ou mais e que os alelos menores (com menos repetições) possuem menos de 21 repetições e compararam-se as médias de cada um destes grupos com as médias dos respectivos grupos referentes ao controle. No grupo de pacientes, 20 (46,5%) indivíduos apresentaram 21 repetições ou mais e uma média de 23,1±2,71 (DP) e 25 (53,2%) apresentaram menos de 21 repetições com uma média de 17,6±2,93 (DP). No grupo controle, 23 (53,50%) indivíduos apresentaram 21 repetições ou mais com uma média de 23,35±2,70 (DP) e 22 (46,8%) apresentaram menos de 21 repetições com uma média de 17,82±2,19 (DP). Não se verificou significância entre as médias dos grupos com 21 repetições ou mais (p = 0, 846) e entre as médias dos grupos com menos de 21 repetições (p = 0, 134).

Para verificar a hipótese de o aumento ou diminuição do trato poliglutamínico estar associado com a análise seminal, testou-se separadamente a possibilidade de correlação entre os indivíduos com alelos com 21 repetições ou mais e a análise seminal e entre os indivíduos com menos de 21 repetições e a análise seminal. Não foi verificada correlação entre o grupo com 21 repetições CAG ou mais e análise seminal segundo os critérios analisados: concentração (r = 0, 161; p = 0, 499) (Anexo 12), motilidade (r = 0, 032; p = 0, 892) (Anexo 13), morfologia OMS (r = 0, 117; p = 0, 691) (Anexo 14) e morfologia segundo Kruger (r = 0, 106; p = 0, 718) (Anexo 15).

Também não foi verificada associação entre o grupo de pacientes com menos de 21 repetições CAG e a os critérios da análise seminal: concentração (r = 0, 097; p = 0, 645) (Anexo 16), motilidade (r = 0, 062; p = 0, 770) (Anexo 17), morfologia OMS (r = 0, 205; p = 0, 337) (Anexo 18) e morfologia de Kruger (r = 0, 116; p = 0, 599) (Anexo 19).

Os alelos com 19 e 21 repetições foram os mais freqüentes entre os pacientes classificados como normozoospérmicos, sendo cada um deles identificados em 04 pacientes. O alelo com 20 repetições foi o mais freqüente entre o grupo de pacientes oligozoospérmicos, identificado em 04 indivíduos. O alelo 21 também foi o mais freqüente entre os indivíduos com oligozoospermia grave, estando presente em 03 pacientes (Anexo 20 A). Os alelos com 20 e 21 repetições foram os mais freqüentes entre o grupo de pacientes com motilidade inferior a 50%, sendo ambos identificados em 05 indivíduos. Já os alelos 19, 20 e 21 foram os mais freqüentes entre indivíduos com motilidade dentro dos parâmetros normais (Anexo 20 B).

O alelo com 20 repetições CAG foi identificado como o mais frequente entre os pacientes com morfologia inferior a 10% e entre os pacientes com morfologia variando entre 15% a 25%, sendo identificado, respectivamente, em 4 e 3 indivíduos (Anexo 20 A). Os alelos 20 e 21 foram os mais frequentes entre os pacientes com morfologia superior a 4%: identificados em 5 e 4 pacientes respectivamente. Já os alelos com 19, 20, 22 e 24 repetições foram os mais frequentes entre os pacientes com morfologia inferior ou igual a 4%, sendo identificados, cada um deles, em 3 pacientes (Anexo 20B).

O paciente com maior número de repetições CAG (Pac-1206) apresentou 30 inserções de glutamina e os seguintes parâmetros seminais: oligozoospérmico grave (0,1 x 10⁶ espermatozóide/mL) e com motilidade espermática normal (igual a 50%). Dois pacientes apresentaram 28 repetições (Pac-1252 e Pac-962). O paciente 1252 foi classificado como oligozoospérmico (14,25 x 10⁶ espermatozóide/mL), com motilidade abaixo dos parâmetros da normalidade (21,05%) e morfologia da análise seminal de 4% para o critério da OMS e 1% para o de Kruger. O paciente 962 apresentou concentração da análise seminal de 6,8 x 10⁶ espermatozóide/mL, morfologia de 33,5%, morfologia segundo a OMS de 12% e morfologia segundo Kruger de 5%. Um paciente apresentou 10 repetições CAG (menor número de

expansões) e os seguintes parâmetros seminais: concentração de 40 x 10⁶ espermatozóide/mL, motilidade de 57,50%, morfologia segundo a OMS de 7% e morfologia segundo Kruger de 2%. No grupo controle, um indivíduo apresentou 31 repetições CAG e dois apresentaram 28 repetições. O indivíduo com menor número de expansões apresentou 11 repetições CAG.

No presente estudo, não se verificou correlação entre o polimorfismo CAG e os padrões da análise seminal. A média de repetições é maior no grupo controle do que no grupo de pacientes. Ou seja, variações na região polimórfica CAG (10 – 30 repetições) do éxon 1 do Gene do Receptor de Andrógenos não explicam o diagnóstico de infertilidade idiopática em nosso grupo de estudo. Este resultado está de acordo com os estudos de Dadze et al., 2000; Sasagawa et al., 2001; von Eckardstein et al., 2001; Tse et al., 2003; 2004, Ferlin et al., 2004; Ruhayel et al., 2004; Milatiner et al., 2004; Tufan et al., 2005; Rajender et al., 2006; Martínez-Garza et al., 2008; Weterveld et al., 2008; Badran et al., 2009. Entretanto, difere dos resulados de Tut et al., 1997; Dowsing et al., 1999; Patrizio et al., 2001; Madgar et al. 2002; Mifsud et al., 2001; Mengual et al., 2003; Radpour et al., 2008, onde foi verificada correlação entre o polimorfismo CAG e o diagnóstico de infertilidade idiopática, porém dentro dos padrões de repetição considerados normais (10 – 35) (Anexo 22). Apenas um grupo de pesquisa, sugeriu que o diagnóstico de oligozoospermia está associado com menos de 16 repetições CAG em homens japoneses (Komori et al., 1991). Estes resultados conflitantes são atribuídos a vários fatores: a diversidade étnica das populações estudadas, diferentes critérios de inclusão do grupo pacientes com infertilidade idiopática e do grupo controle e o número de indivíduos incluídos em cada estudo, o que dificulta a comparação entre eles (Ferlin et al., 2004). Outra possível causa para este impasse é a possível ineficácia dos critérios de classificação seminal preconizados pela OMS (1999) (Milatiner et al., 2004).

A infertilidade afeta 15 a 20% dos casais no mundo e pode ser de ordem adquirida ou congênita. Defeitos na espermatogênese estão relacionados a 30% dos casos, porém as causas

ainda são desconhecidas (WHO, 1999). Técnicas avançadas de diagnóstico e o aconselhamento genético têm reduzido progressivamente nos últimos anos a porcentagem de homens com diagnóstico de infertilidade idiopática. Particularmente, evidências sugerem que o fator genético é responsável por 15% dos casos dos casos (Foresta *et al.*, 2002). Dentre estes, destacam-se aberrações cromossômicas, microdeleções no braço longo do cromossomo Y, que envolvem um ou mais fatores de azoospermia (AZF) (Foresta *et al.*, 2001), mutações no gene CFTR e no Gene do Receptor de Andrógenos (Hiort *et al.*, 2000). Todos estes genes estão relacionados com o diagnóstico de infertilidade idiopática, afetando diretamente a espermatogênese ou os vasos deferentes.

Os andrógenos estão envolvidos no desenvolvimento das características masculinas. Na puberdade, os andrógenos promovem o desenvolvimento e manutenção da espermatogênese. Porém, muitos homens inférteis têm níveis hormonais dentro dos parâmetros normais. A possível causa para este problema é atribuída ao comprometimento das respostas aos andrógenos. A clonagem do Gene do AR (Lubahn *et al.*, 1989) e a descoberta do seu mecanismo de tradução (Jenster *et al.*, 1991) originaram novas alternativas de investigação deste fator. Todos os andrógenos transmitem seus efeitos multifacetados através de um único receptor. O receptor de andrógenos, um membro da família dos receptores de esteróides, é um fator de transcrição nuclear, que quando ativado por andrógenos, promove a ativação de genes específicos em tecidos-alvos (Quigley *et al.*, 1995).

Andrógenos desempenham um papel crucial no desenvolvimento do fenótipo masculino e no desenvolvimento dos órgãos reprodutivos masculinos tais como: epidídimo, vasos deferentes, vesícula seminal, próstata e pênis. Além disso, andrógenos são requeridos para puberdade e fertilidade. Altos níveis de testosterona intratesticular, secretada pelas Células de Leydig, são necessários para a espermatogênese.

O éxon 1 do Gene do Receptor de Andrógenos, que codifica o domínio TAD, contém duas regiões altamente polimórficas caracterizadas por apresentarem diferentes repetições CAG e GGC, que codificam, respectivamente, os aminoácidos glutamina e glicina. O número de repetições CAG varia de 10 a 35 em indivíduos normais. A estrutura da região N-Terminal já foi elucidada e esta região é a mais variável entre os receptores de esteróides (Yong et al., 1998). Esta região é de especial interesse, devido à descoberta de que expansões glutamínicas ≥40 estão envolvidas na etiologia da doença de Kennedy (Spinal and Bulbar Muscular Atrophy – SMBA (La Sapada et al., 1991). Expansões trinucleotídidicas estão relacionadas com uma série de doenças neurodegenertivas tais como: síndrome do X Frágil, Doença de Huntigton, ataxia espinocerebelar do tipo 1, Doença de Machado-Joseph, ataxia de Friedrich, etc. Em todas estas doenças, a região polimórfica CAG é considerada expandida quando comparada com a distribuição dos alelos em pacientes não afetados (menos de 35). O mecanismo destas patologias é desconhecido, mas é objeto de intensos estudos. Pacientes com SBMA possuem sinais de redução da função do receptor de andrógenos como: ginecomastia, azoo/oligozoospermia, atrofia testicular e infertilidade. A associação do polimorfimo CAG com a doença de Kennedy e outras doenças neurodegenerativas criou precedentes para o estudo deste polimorfismo em pacientes com infertilidade idiopática, uma vez que indivíduos portadores desta doença apresentam parâmetros seminais alterados (La Spada et al., 1999; Westerveld et al., 2008).

Embora anormalidades nas repetições CAG sejam fortemente associadas com a infertilidade masculina, não é claro que o polimorfismo do comprimento da repetição CAG possa afetar a atividade do receptor de andrógeno e os parâmetros seminais. Em alguns casos esta expansão parece não afetar a afinidade de ligação aos andrógenos, mas pode causar diminuição na atividade transcricional do receptor, talvez como resultado da redução nos níveis do RNA mensageiro (RNAm) e da proteína do AR, identificada em pacientes com este

tipo de expansão. Estudos *in vitro* demonstraram uma correlação inversa entre expansões do trato poliglutamínico e a função do AR. A expansão progressiva das repetições CAG causa um decréscimo linear na atividade do receptor, mas não a elimina completamente, porém não está claro que alterações no receptor possam alterar os parâmetros seminais (Chamberlain *et al.*, 1994). A presença de alelos considerados pequenos (< 22 repetições) está relacionada com o diagnóstico de câncer de próstata (Irvine *et al.*, 1994). Expansões poliglutamínicas estão relacionadas com o diagnóstico de infertilidade, porém, o envolvimento do polimorfismo CAG na espermatogênese ainda é pouco claro e a sua ação combinada com o polimorfismo GGC é completamente desconhecida (Ferlin *et al.*, 2006).

Repetições trinucleotídicas ocorrem ao longo do genoma humano e elas expandem-se e contraem-se durante a replicação do DNA num processo dinâmico, podendo aumentar ou diminuir seu tamanho de uma geração para outra (instabilidade de microsatélites). A maioria destas repetições localiza-se em regiões não codificantes do genoma e têm efeitos não discerníveis, porém aquelas localizadas em regiões codificantes podem influenciar a expressão gênica, modulando a estrutura e estabilidade dos mRNAs e alterando a constituição da proteína. Repetições longas apresentam uma predisposição maior em se expandir (Buchanan *et al.*, 2004).

Assim sendo, estudos que analisam a correlação entre expansões CAG e o diagnóstico de infertilidade idiopática são muito importantes, uma vez que alterações nesta região podem ser transmitidas diretamente aos descendentes através das técnicas de reprodução assistida. Há alguns anos, a maioria dos indivíduos inférteis não podia conceber e, atualmente, com o desenvolvimento de técnicas de reprodução assistida, como a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ISCI) isto já é possível, aumentando o risco de transmissão de alterações genéticas.

Devido a este fato, há muitas discussões em relação à adoção ou não destes meios terapêuticos em defeitos espermatogênicos idiopáticos. Pode-se decidir por não utilizá-los em determinados casais, pois a saúde e o bem estar da futura criança é que deve orientar esse impasse, apesar da constante pressão por grande parte dos casais. Este problema poderá ser solucionado com o advento de novas e revolucionárias técnicas de diagnóstico molecular pré-implantacional e com a identificação de genes envolvidos em uma série de patologias.

O presente trabalho é o primeiro no Brasil a investigar o possível envolvimento do polimorfismo CAG e da região *hotspot* mutacional do Gene do Receptor de Andrógenos em pacientes com infertilidade idiopática utilizando a técnica de seqüenciamento automatizado. A análise da região CAG e de mutações no Gene do Receptor de Andrógenos foram realizadas em pacientes brasileiros com carcinoma de próstata (Santos *et al.*, 2003; Silva Neto *et al.*, 2008) e com a Síndrome de Insensibilidade a Andrógenos (CAIS e PAIS) (Cabral *et al.*, 1998; Melo *et al.*, 2005) porém não em homens com diagnóstico de infertilidade idiopática. Estudos como este são de extrema importância, pois fornecem evidências que direcionam as técnicas de diagnóstico, contribuem para a redução dos casos classificados como idiopáticos e para que sejam avaliados os genes que realmente têm importância clínica no diagnóstico de infertilidade idiopática.

6. CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

Com base na análise do polimorfismo CAG e da região codificadora dos éxons 5 e 7 de 45 indivíduos com infertilidade idiopática e 45 do grupo controle concluímos que:

- ✓ Com relação aos critérios da análise seminal, os pacientes foram classificados segundo os critérios de: a) Concentração: normozoospémicos (22 pacientes − 48,88%), oligizoospérmicos (14 pacientes − 31,11%) e oligozoospérmicos graves (9 pacientes − 20,00%); b) Motilidade: com motilidade igual ou superior a 50% (19 pacientes − 42,22%) e com motilidade inferior a 50% (26 pacientes − 57,77%); c) Morfologia (OMS): com morfologia superior ou igual a 15% (12 pacientes − 31,57%), com morfologia entre 10% a 14% (8 pacientes − 21,05%) e com morfologia inferior a 10% (18 pacientes − 47,36%); d) Morfologia (Kruguer): com morfologia superior a 4% (13 pacientes − 35,13%) e com morfologia inferior ou igual a 4% (24 pacientes − 64,86%);
- ✓ a varição das repetições CAG do grupo de pacientes (10 30) e do grupo controle (11 31) estão dentro dos parâmetros considerados normais;
- √ não há correlação entre o comprimento da região polimórfica CAG entre os dois grupos de estudo;
- √ há associação entre o polimorfismo CAG e a morfologia (OMS) da análise seminal;
- √ não há correlação entre as repetições CAG e a concentração, morfologia (Kruger) e
 motilidade da análise seminal;
- √ a média das repetições CAG é maior no grupo de pacientes com oligozoopermia grave;
- ✓ não há associação entre o aumento (≥21) ou redução (<21) do trato glutamínico e a análise seminal;

√ o diagnostico de infertilidade idiopática não está associado com a presença de mutações nos éxons 5 e 7, uma vez que nenhuma alteração na sequência de nulceotídeos foi identificada.

Assim sendo, o presente trabalho tem como perspectivas:

- ✓ sequenciar toda a região codificadora do éxon 1 e dos demais éxons (2, 3, 4, 6 e 8) do
 Gene do Receptor de Andrógenos;
- ✓ analisar os parâmetros hormonais (testosterona, FSH, LH e SHBG) do grupo de
 pacientes e do grupo controle;
- ✓ realizar a análise seminal do grupo controle;
- ✓ analisar, in vitro, o potencial de transcrição do receptor.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abel, A.; Taye, A. A.; Fischbeck, K. H.; Merry, D. E. (1998). Truncated androgen receptor gene with an expanded CAG repeat causes phenotypic changes in transgenic mouse. Am. J. Hum. Genet. 63: A319.
- Ahmed, S. F.; Cheng, A.; Dovey, L.; Hawkins, J. R.; martin, H.; Rowland, J.; Shimura, N.; Tait, A. D.; Hughes, A. (2000). Phenotypic features, Androgen Receptor binding, and mutational analysis in 278 clinical cases reported as Androgen Insensitivity Syndrome.
 The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 85 (2): 658-665.
- Arraste, A.; Mitra, S.; Scheweitzer, E. S.; Segal, M. R.; Finkbeiner, S. (2004). Inclusion body formation reduce levels of mutant huntingtin and the risk of neural death. **Nature.** 431: 805 810.
- Asatiani, K.; von Eckardstein, S.; Simoni, M.; Gromoll, J.; Nieschlag, E. (2003). CAG repeat length in the androgen receptor gene affects the risk of male infertility. **Int. J. Androl.** 26: 255 261.
- Assche, E., Bonduelle, M., Tournaye, H., Joris, H., Verheyen, G., Devroey, P., Steiterghem, A., Liebaers, I. (1996). Cytogenetics of infertile men. **Hum. Reprod.** 4: 1-24.
- Auger, J.; Kunstmann, J. M.; Czyglik, F.; Jouannet, P. (1995). Decline in semen quality among fertile men in Paris during de past 20 years. **N. Engl. J. Med.** 332(5): 281-5.

- Brinkmann, A. O. (2001). Molecular basis of androgen insensitivity. Molecular and Cellular Endocrinology. 179: 105-109.
- Bradan, W. A.; Fahmy, I.; Abdel-Megid, W. M.; Elder, K.; Mansour, R.; Kent-First, M. (2009). Length of androgen receptor-CAG repeats in fertile and infertile Egyptian men.

 Journal of Andrology. 30(4): 416-425.
- Buchanan, G.; Yang, M.; Cheong, A.; Harris, J. M.; Irvine, R. A.; Lambert, P. F.; Moore, N. L.; Raynor, M.; Neufing, P. J.; Coetzee, G. A.; Tilley, W. D. (2004). Structural and functional consequences of glutamine tract variation in the androgen receptor. Human Molecular Genetics. 13(16): 1677-1692.
- Cabral, D. F.; Maciel-Guerra, A. T.; Hackell, C. (1998). Mutations of androgen receptor gene in Brazilian patients with male pseudohermaphoditism. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research.** 31: 775-778.
- Chamberlain, N.L.; Driver, E.D. & Miesfelld, R.L. (1994). The length and location of CAG trinucleotide repeats in the androgen receptor N-terminal domain affect transactivation function. **Nucleic Acids Res.** 22: 3181-3186.
- Choong, C. S.; Kemppainen, J. A.; Zhou, Z. X.; Wilson, E. M. (1996). Reduced androgen receptor gene expression with first exon CAG repeat expansion. Molecular Endocrinology. 10: 1527 1535.

Dadze, S.; Wieland, C.; Jakubicza, S.; Funke, K.; Schröder, E.; Royer-Pokora, B.; Eillers, R. Wieacker, P. F. (2001). The size of the CAG repeat in exon 1 of the androgen receptor gene shows no significant relationship to impaired spermatogenesis in an infertile Caucasoid sample of German origin. **Mollecular Human Reproduction**. 6(3): 207 – 214.

Dohle, G. R.; Smit, M.; Weber, A. (2003). Androgens and male infertility. **World J. Urol**. 21: 341 – 345.

Dowsing, A.T.; Yong, E.L.; Clark, M.; McLachlan, R.I.; de Kretser, D.M. & Trounson, A.O. (1999). Linkage between male infertility and trinucleotide repeat expansion in the androgen-receptor gene. Lancet. 354: 640-643.

Ferlin, A.; Vinazi, C.; Garolla, A.; Selice, R.; Zuccarello, D.; Cazzadore, C.; Foresta, C. (2006). Male infertility and androgen receptor gene mutations: clinical features and identification of seven novel mutations. Clinical Endocrinology. 65: 606-610.

Ferlin, A.; Arredi, B.; Foresta, C. (2006). Genetic causes of male infertility. Reproductive Toxicology. 22: 133-141.

Ferlin, A.; Bartoloni, L.; Rizzo, G.; Roverato, A.; Garolla, A.; Foresta, C. (2004). Androgen Receptor Gene CAG and GGC repeat lengths and idiopathic male infertility. Molecular Human Reproduction. 10(6): 417-421.

Fiscback, K. H. (1997). Kennedy disease. J. Inher. Metab. 20: 152 – 158.

- Foresta, C.; Ferlin, A.; Gianaroroli, L.; Dallapicola, B. (2002). Guidelines for the appropriate use of genetic tests in infertile couples. **Eur. J. Hum. Genet**. 10: 303 22.
- Foresta, C.; Moro, E.; Ferlin, A. (2001). Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenisis. **Endocrinology Review**. 22: 226-239.
- Gallarneau, G. J.; Nagler, H. M. (1999). Cost-effective infertility therapies in the '90s: To treat out u cure? Contemporary Urology. 11: 32-45.
- Garolla, A.; Ferlin, A.; Vinanzi, C.; Roverato, A.; Sotti, G.; Artibani, W.; Foresta, C. (2005).
 Molecular analysis of the androgen receptor gene in testicular cancer. Endocrine-Related
 Cancer. 3: 645-655.
- Gelmann, E. P. (2002). Molecular biology of the andorgen receptor. Journal of Clinical Oncology. 20: 3001-3015.
- Ghadessy, F. J.; Lim, J.; Abdullah, A. A.; Panet-Raymond, V.; Choo, C. K.; Lumbroso, R. (1999). Oligospermic infertility associated with an androgen receptor mutations that disrupts interdomain and coactivator (TIF2) interactions. **J. Clin. Invest.** 103: 1517-1525.
- Giovannucci, E.; Stampfer, M.J.; Krithivas, K.; Brown, M.; Brufsky, A.; Talcott, J.; Hennekens, C.H. & Kantoff, P.W. (1997). The CAG repeat within the androgen receptor gene and its relationship to prostate cancer. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, 94: 3320-3323.

- Gottlieb, B.; Beitel, L. K.; Wu, J. H.; Trifiro, M. (2004). The androgen receptor gene mutations database (ARDB). **Hum. Mutat.** 23: 573 577.
- Grumbach M. M.; Hughes, I. A.; Conte, F. A. Disorders of sex differentiation. In: Melo, K. F.
 S.; Mendonça, B. B.; Billerbeck, A. E. C.; Costa, E. M. F.; Latronico, A. C.; Arnhold, I. J.
 P. (2002). Síndrome de Insensibilidade aos Andrógenos: análise clínica, hormonal e molecular de 33 casos. Arq. Bras. Endocrinol Metab. 49: 87 97.
- Hiipakka, R.A.; Liao, S. (1998). Molecular mechanism of androgen action. Trends in Endocrinology and Metabolism. 9(8): 317-324.
- Hiort, O.; Holetrhus, P. M.; Horter, T.; Schulze, W.; Kremke, B.; Pratsh, M. B.; Sinnecker, H. G.; Kruse, K. (2000). Significance of mutations in the androgen receptor gene in males with idiopathic infertility. The Journal of Clinical Endrocrinology & Metabolism. 8(85): 2810-2815.
- Irvine, R. A.; Yu, M. C.; Ross, R. K.; Coetzee, G. A. (1994). The CAG and GGC microsatellites of the androgen receptor gene are in linkage disequilibrium in men with prostate cancer. **Cancer Researsh**. 54: 2861 2864.
- Jenster, G.; Van der Korput, H. A. G. M.; Van Vroonhoven, C.; Van der Kwast T. H.; Trapman, J.; Brinkmann, A. O. (1991) Domains Of the human androgen receptor involved in steroid binding, transcriptional activation and subcellular localisation. Molecular Endocrinology. 5: 523 – 527.

- Kjessler, B. (1996). Karyotipe meiosis and spermatogenisis in a sample of men attenting in infertility clinic. **Human Genetics.** 2: 1-74.
- Klement, I. A.; Skinner, P. J.; Kaytor, M. D.; Yi, H; Hersh, S. M.; Clrk, H. B.; Zoghbi, H. Y.;
 Orr, H. T. (1998). Ataxin-1 nuclear localization and aggregation role in polyglutamine-induced disease in SCA 1 trangenic mice. Cell. 95: 41–53.
- Köhler, B.; Lumbroso, S.; Leger, J.; Audran, F.; Garu, E. S.; Kurtz, F.; Pinto, G.; Salerno, M.; Semitcheva, T.; Czernichow, P.; Sultan, C. (2004). Androgen Insensitivity Syndrome: somatic mosaicism of the Androgen Receptor in seven families and consequences for sex assingnment and genetic counseling. The Jounal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 90(1): 106 111.
- Komori, S.; Kasumi, H.; Kanazava, R.; Sakata, K.; Nakata, Y.; Kato, H. (1999). CAG repeat length in the androgen receptor gene of infertile Japanese males with oligozoospermia.

 Molecular Human Reproduction. 5: 14-16.
- Kruger T.F., Menkveld R., Stander F.S., Lombard C.J.; Van der Merwe, J. P.; van Zyl, J. A.; Smith, K. (1986). Sperm morphologic features as a prognostic factor in vitro fertilization. Fertil Steril. 46(6): 1118-1123.
- Kupfer, S. R.; Quigley, C. A. E.; French, F. S. (1992). Male pseudohermafroditism. Semin.
 Perinatol. 16: 319–31.

- La Spada, A. R.; Wilson, E. M.; Lubahn, D. B.; Harding, A. E.; Fischbeck, K. H. (1991).
 Androgen receptor gene mutations in X-linked spinal and bulbar muscular atrophy.
 Nature. 352: 77-79.
- Loy, C. J.; Yong, E. L. (2001). Sex, infertility and the molecular biology of the androgen receptor. **Curr. Opin. Obstet. Gynecol.** 13: 315–321.
- Lubahn, D. B.; Brown, T. R.; Simental, J. A.; Higgs, H. N.; Migeon, C. J.; Wilson, E. M.; French, F. S. (1989) Sequence of the intron/exon junctions of the coding region of the human androgen receptor gene and identifications of a point mutations in a family with complete androgen insensitivity. Proc. Nalt. Acad. Sci. USA. 86: 9534-9538.
- Lundin, K. B.; Giwereman, A.; Richthooff, J; Abrahamsson, P. A.; Giwereman, Y. L. (2003).
 No association between mutations in the human androgen receptor GGN repeat and intersex conditions. Mol. Hum. Reprod. 9: 375-379.
- Madhukar, D.; Rajender, S. (2008). Hormonal treatment of male infertility: promises and pitfalls. **Journal of Andrology**. 30(2): 95-112.
- Madgar, I.; Green, L.; Kent-First, M.; Weissenberg, R.; Gershoni-Baruch, R.; Goldman, B.; Friedman, E. (2002). Genotyping of Israeli infertile men with idiopathic oligozoospermia. Clin. Genet. 62: 203 207.
- Maegawa, G. H. B.; Centra, L. J. (2000). Aspectos genéticos do fator masculino na infertilidade. Fam. Saúde Desenv. 2(1): 7-12.

- Martínez-Garza, S. G.; Gallegos-Rivas, M. C.; Vargas-Maciel, M.; Rubio-Rubio, J. M.; Monteros-Rodríguez, M. E.; González-Ortega, C.; Gutiérrez-Gutiérrez, A. M. (2008). Genetic screening in infertile Mexican men: chromossomal abnormalities, Y chromossome deletions, and androgen receptor CAG repeat lengt. Journal of Androloly. 29(6): 654–658.
- McGinnis, M. Y.; Marcelli, M.; Lamb, D. J. (2002). Consequences of mutations in androgen receptor genes: molecular biology and behavior. Hormones, Brain and Behavior. 5: 347-375.
- McKenna, N. J.; Lanz, R. B.; O'Malley, B. W. (1999). Nuclear receptor coregulators: cellular and molecular biology. **Endroc. Rev.** 20: 321 344.
- McManammy, P.; Chy, H. S.; Finkelstein, D. I.; Craythorn, R. G.; Crack, P. J.; Kola, I. Cheema, S. S.; Horne, M. K.; Wreford, N. G.; O'Bryan, M. K.; De Kretser, D. M.; Morrison, J. R. (2002). A mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. Hum. Mol. Gent. 11: 2103-2211.
- McPhaul, M. J. (2002). Androgen receptor gene mutations and androgen insensitivity. **Mol.**Cell. Endocrinol. 198: 61 67.
- McPhaul, M. J. Defects of androgen action. (1998). In: Jameson, J. L. (Ed.) Principles of molecular medicine. Totowa: Humana Press. pp 581-586.

- Melo, K. F. S.; Mendonça, B. B.; Billerbeck, A. E. C.; Costa, E. M. F. Latronico, A. C.; Arnhold, I. J. P. (2005). Síndrome de Insensibilidade aos Andrógenos: Análise Clínica, Hormonal e Molecular de 33 casos. Arq. Bras. Endocrinol. Metab. 49: 87-97.
- Mengual, L.; Oriola, J.; Ascaso, C.; Ballescà, J. L.; Oliva, R. (2003). An increased repeat length in the androgen receptor gene in azoospermic ICSI candidates. American Society of Andrology. 24(2): 279 -284.
- Mifsud, A. Sim, C. K.; Boettger-Tong, H.; Moreira, S.; Lamb, D. J.; Lipshultz, L. I.; Yong, E. L. (2001). Trinucleotide (CAG) repeat polymorphisms in the androgen receptor gene: molecular markers of risk for male infertility. Fertil Steril. 75: 275-281.
- Milatiner, D.; Halle, D.; Huerta, M. Margalioth, E.; Cohen, Y. (2004). Associations between androgen receptor CAG repeat length and sperm morphology. Human Reproduction. 19(6): 1426-1430.
- Morrison, J. R. (2002). A mouse model of spinal and bulbar muscular atrophy. **Hum. Mol.**Gent. 11: 959 967.
- Ono, S.; Geller, L. N.; Lai, E. V. (1974). TfM mutation and masculinization versus feminilization of the mouse central nervous system. **Cell**. 3: 235–242.
- Patrizio, P.; Leonard, D.G.B.; Chen, K.; Hernandez-Ayup, S. & Trounson, A.O. (2001).
 Larger Trinucleotide Repeat Size in the Androgen Receptor Gene of Infertile Men With
 Extremely Severe Oligozoospermia. Journal of Andrology. 22: 444-448.

- Poletti, A.; Negri_Cesi, P.; Martini, L. (2005). Reflections on the diseases linked to mutations of the androgen receptor. **Endocrine.** 28: 243 262.
- Poletti, A. (2004). The polyglutamine tract of androgen receptor: from functions to dysfunctions in motor neurons. **Front Neuroendrocrinol.** 25: 1 26.
- Prauer, H. U. (1997). Relevance of genetic counselling in couples prior to intracytoplasmatic sperm injection. **Hum. Reprod.** 12: 1909-1912.
- Pimenta, J., R., Zuccherato, L. W., Debes, A. A., Maselli, L., Soares, R. P., Moura-Neto, R. S., Rocha, J., Bydlowski, S. P., Pena, S. D. J. (2006). Color and genomic ancestry in Brazilians: a study with forensic microsatellites. Human Heredity. 62: 190-195.
- Quigley, C.A.; Bellis, A.; Marschke, K.B.; El-Awady, M.K.; Wilson, E.M.; French, F.S. (1995). Androgen receptor defects: historical, clinical, and molecular perspectives.
 Endocrinol Rev. 16: 271-320.
- Rajender, S.; Deepa, S. R.; Madhavi, S.; Gupta, N. J.; Chakravarty, B.; Singh, L.; Thangaraj,K. (2006). Male infertility: no evidence of androgen receptor gene among Indian men.Journal of Andrology. 27(1): 102–104.
- Radpour, R.; Zhong, X.; Tavasoly, A.; Solati, S.; Holzgreve, W. (2008). Association of long polyglutamine tracts in exon 1 of the androgen receptor gene with idiopathic male infertility. **Journal of Andrology**. 1-16.

- Ruhayel, Y.; Lundin, K.; Giwercman, Y.; Halldén, C.; Willén, M.; Giwercman, A. (2004).

 Androgen receptor gene GGN and CAG polymorphisms among severeky oligozoospermic and azoospermic Swedish men. **Human Reproduction**.19(9): 2076-2083.
- Santos, M. L; Sarkis, A. S.; Nishimoto, I. N.; Nagai, M. A. (2003). Androgen receptor CAG repeat polymorphism in prostate cancer from a Brazilian population. Cancer Epidemiology. (27)5: 312-326.
- Sasagawa, I.; Yasuhiro, S.; Ashida, J.; Nakada, T.; Muroya, K.; Ogata, T. (2001). CAG repeat length analysis and mutation screening of the Androgen Receptor Gene in Japanese men with idiopathic azoospermia. **American Society of Andrology.** 22(5): 804 808.
- Sasaki, M.; Kaneuchi, M.; Sakuragi, N.; Fujimoto, S.; Carroll, P. R.; Dahiya, R. (2003). The polyglycine and polyglutamine repeats in the androgen receptor gene in Japanese and Caucasian populations. Biochemical and Biophysical Research Communications. 312: 1244–1247.
- Sato, T.; Matsumoto, T.; Yamada, T.; Watanabe, T.; Kawano, H.; Kato, S. (2003). Late onset of obesity in male androgen receptor-deficient (AR KO) mice. **Biochemical and Biophysical Research Communications.** 300: 167 171.
- Seibel, M. M. (1996). Infertility. 2 ed. New York: Appleton and Lange. 903p.

- Silva Neto, B., Koff, W. J., Biolchi, V., Brenner, C., Biolo, K. D., Spritzer, P. M., Brum, I. S. (2008). Polymorphic CAG and GGC repeat lengths in the androgen receptor gene and prostate cancer risk: analysis of a Brazilian population. **Cancer Invest.** 26(1): 74-80.
- Stenoien, D. L.; Cummings, C. J.; Adams, H. P.; Mancini, M. G.; Patel, K.; DeMartino, G.; Marcelli, M.; Weigel, N. L.; Mancini, M. A. (1999). Polyglutamine expanded androgen receptors form aggregates the sequester heat shok proteins, proteasome components and SRC-1, and are suppressed by the HDJ-2 chaperone. Hum. Mol. Genet. 8: 731–741.
- Tse, J. Y. M.; Liu, V. W. S.; Yeung, W. S. B.; Lau, E. Y. L.; Ng, E. H. Y.; Ho, P. C. (2003)

 Molecular analysis of androgen receptor gene in Hong Kong Chinese infertile men.

 Journal of Assisted Reproduction and Genetics. 20(6): 227-233.
- Tufan, A. C.; Satiroglu-Tufan, N. L.; Aydinuraz, B.; Hakan, Satitoglu, M. H.; Aydos, K.; Bagci, H. (2005). No association of the CAG repeat length in exon 1 of the androgen receptor gene with idiopathic infertility in Turkish men: implications and literature review.
 J. Exp. Med. 206: 105-115.
- Tut, T.G.; Ghadessy, F.J.; Trifiro, M.A.; Pinsky, L. & Yong, E.L. (1997) Long Polyglutamine Tracts in the Androgen Receptor Are Associated with Reduced Trans-Activation, Impaired Sperm Production, and Male Infertility. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 82: 3777-3782.
- von Eckardstain, S.; Syska, A.; Gromoll, J.; Kamischke, A.; Simoni, M.; Nieschlag, E. (2001). Inverse correlation between sperm concentration and number of androgen receptor

CAG repeats in normal men. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 86(6): 2586–2589.

Wang, Q. I.; Ghadessy, F. J.; Trouson, A.; de Kretser, D.; Mclachlan, R.; Yong, E. L. (1998).
Azoospermia associated with a mutation in the Ligand-Binding Domain of an androgen receptor displaying normal ligand binding, but defective trans-activation. The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. 83(12): 4303-4309.

Westerveld, H.; Visser, L.; Tanck, M.; van der Veen, F.; Repping, S. (2008). CAG repeat length in the androgen receptor gene is not associated with spermatogenic failure. **Fertility and Sterility**. 89(1): 253-258.

World Health Organization (1999). WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. 4 ed. Cambridge: Cambridge University Press. 138 p.

Young, E.; Loy, C.; Sim, K. (2003). Androgen receptor gene and male infertility. **Human Reproduction Update**, 9(1): 1-7.

Young, I.E.; Kurian, K.M.; Mackenzie, M.A.; Kunkler, I.H.; Cohen, B.B.; Hooper, M.L.; Wyllie, A.H. & Steel, C.M. (2000). The CAG repeat within the androgen receptor gene in male breast cancer patients. J. Med. Genet. 37: 139-140.

Young, E. L.; Tut, T. G.; Ghadessy, F.J.; Prins, G.; Ratnam, S.S. (1998). Partial androgen insensitivity and correlations with the predicted three dimensional structure of the

androgen receptor ligand-binding domain. Mol. Cell Endocrinol. 137: 41-50.

Zegers-Hochschild, F; Adamson, G. D.; de Mouzon, J.; Ishihara, O.; Mansour, R.; Nygren, K.; Sullivan, E. Vanderpoel, S. on behalf of ICMART and World Health Organization (2009). The International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary on ART terminology. Human Reproduction. 24(11): 2683-2687.

ANEXOS

ANEXO 01

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

1 – DADOS DE IDENTIFICAÇÃO	O DO SUJEITO DA PESOUIS	A
----------------------------	-------------------------	---

NOME DO PACIENTE:	
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº:	SEXO: □M □F
DATA NASCIMENTO:/	
ENDEREÇO: Nº	APTO:
CEP:TELEFONE: DDD()	

- 2 DADOS SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA
- 2.1 TÍTULO DO PROTOCOLO DE PESQUISA: "CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DO POLIMORFISMO CAG E DE MUTAÇÕES NOS ÉXONS 5 E 7 DO GENE DO RECEPTOR DE ANDRÓGENOS EM HOMENS FÉRTEIS E INFÉRTEIS NA REGIÃO DA SERRA GAÚCHA".
- 2.2 UNIDADE EXECUTORA:

Universidade de Caxias do Sul, Caxias do Sul, RS

2.3 COORDENAÇÃO

Prof. Dr Fábio Firmbach Pasqualotto (DCBM – CCBS / UCS)

Prof. Dra. Jovana Mandelli (DCBM – CCS / UCS)

Biól. Rafaele Frassini (INBI – UCS)

2.4 COLABORAÇÃO

Prof. Dra. Eleonora Bedin Pasqualotto (CCS / UCS)

2.5 ENDEREÇOS PARA CONTATO:

Dr. Fabio Firmbach Pasqualotto

Rua Pinheiro Machado, 2569 sl. 23/24 CEP: 95020170, Caxias do Sul, RS, Brasil

Fone/Fax: (054) 214 4095

e-mail: fabio@conception-rs.com.br

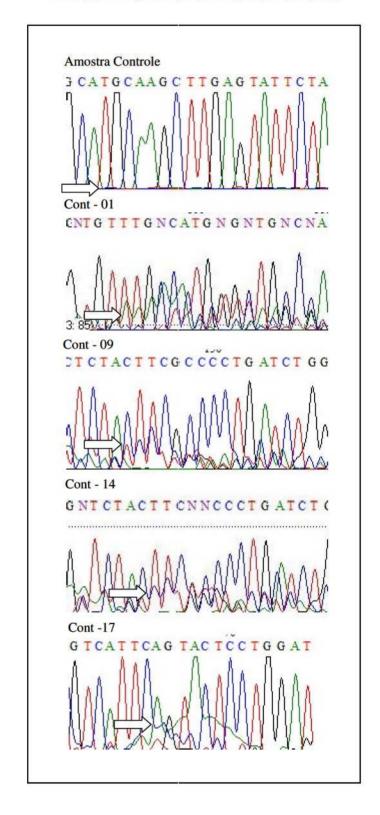
2.6 AVALIAÇÃO DO RISCO DA PESQUISA:
() SEM RISCO (X) RISCO MÍNIMO () RISCO MÉDIO
(probabilidade de que o indivíduo sofra algum dano como conseqüência imediata ou tardia do estudo)
2.7 DURAÇÃO DA PESQUISA: 24 meses
3 – REGISTRO DAS EXPLICAÇÕES DO PESQUISADOR AO PACIENTE SOBRE A PESQUISA, CONSIGNANDO:
1. Justificativa e os objetivos da pesquisa; 2. Procedimentos que serão utilizados e propósitos, incluindo a identificação dos procedimentos que são experimentais; 3. Desconfortos e riscos esperados; 4. Benefícios que poderão ser obtidos; 5. Procedimentos alternativos que possam ser vantajosos para o indivíduo. Infertilidade conjugal incide sobre 15% dos casais em idade reprodutiva. O homem corresponde a 50% das causas. Um dos aspectos que têm sido avaliados no paciente com dificuldade para engravidar é o receptor de andrógenos. Andrógenos são hormônios esteróides que determinam a expressão fenotípica do homem. 1. Os objetivos são: Avaliar as características seminais (concentração, motilidade e morfologia espermática) em pacientes inférteis, avaliar as características do receptor de andrógeno na população de pacientes inférteis; comparar as características seminais (concentração, motilidade e morfologia espermática) com as características do receptor de andrógeno. Além disso, comparar as características do receptor de andrógeno da população de pacientes inférteis com uma população de homens férteis e avaliar a necessidade de solicitar screening para os receptores de andrógeno em pacientes com queixas de infertilidade. 2. Medida do receptor de andrógeno por meios de técnicas de Biologia Molecular. 3. Desconforto mínimo, resumindo-se à coleta de sangue e de sêmen do paciente. 4. O resultado do exame laboratorial será comunicado ao paciente. 5. Ausente.
4 – ESCLARECIMENTOS DADOS PELO PESQUISADOR SOBRE GARANTIAS DO SUJEITO DA PESQUISA:
O voluntário participará de maneira gratuita deste projeto com a doação de sêmen para a realização de análises bioquímicas e testes específicos no sêmen. Acesso, a qualquer tempo, às informações sobre procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive para dirimir eventuais dúvidas. Liberdade de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar do estudo, sem que isto traga prejuízo à continuidade da assistência. Salvaguarda da confidencialidade, sigilo e privacidade. Todas as análises bioquímicas serão realizadas de forma confidencial, não sendo identificado o voluntário. As publicações não incluirão qualquer referência ao nome do doador que possam identificá-lo
5 – OBSERVAÇÕES COMPLEMENTARES
Após realizar todos os testes, as amostras serão descartadas, não podendo ser utilizadas para outro fim.

6 - CONSENTIMENTO PÓS-ESCLARECIDO

Assinatura do sujeito da pesquisa ou responsável legal

Assinatura do pesquisador

ANEXO 02
AMOSTRAS EXCLUÍDAS DO ESTUDO



ANEXO 03

ANÁLISE SEMINAL DO GRUPO DE PACIENTES

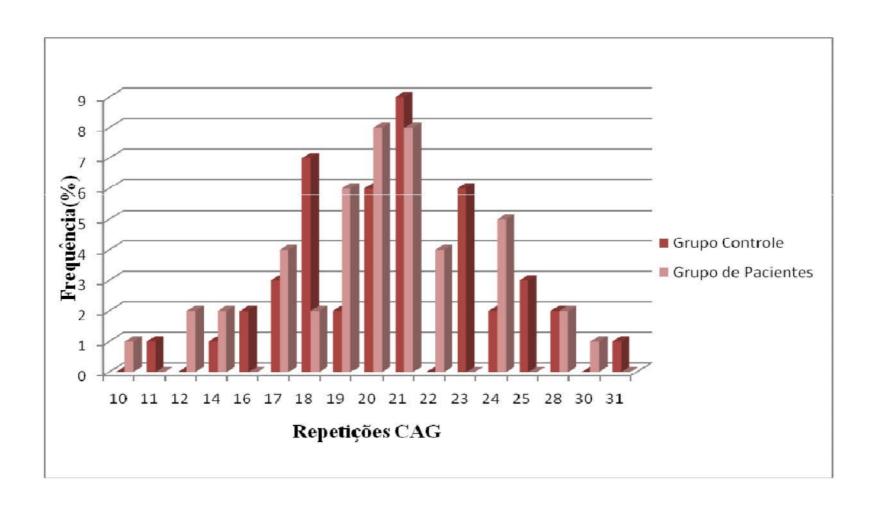
	N	Valor Mínimo	Valor Máximo	Média	Desvio Padrão (±DP)
GRUPO DE PACIENTES (TOTAL)	45 (100%)				
Categoria Concentração*	45 (100%)	0	205	30,1	36,51
$\geq 20 \times 10^6$	22 (48,8%)				
$<20 \times 10^6 \text{e} > 5 \times 10^6$	14 (31,11%)				
$\leq 5x10^6$	9 (20%)				
Motilidade	45 (100%)	0	91,21	40,93	20,7
≥ 50%	19 (42,22%)				
< 50%	26 (57,77%)				
Morfologia (OMS)	38 (100%)	1	22	10,7	6,55
≥ 15%	12 (31,57%)				
10 - 14%	8 (21,05%)				
< 10%	18 (47,36%)				
Morfologia (Kruger)	37 (100%)	0	12	3,8	2,8
> 4%	13 (35,13%)				
≤ 4%	24 (64,86%)				
GRUPO CONTROLE (TOTAL)	NA**				

^{*} espermatozóides/mL

^{**} Dados Não Avaliados

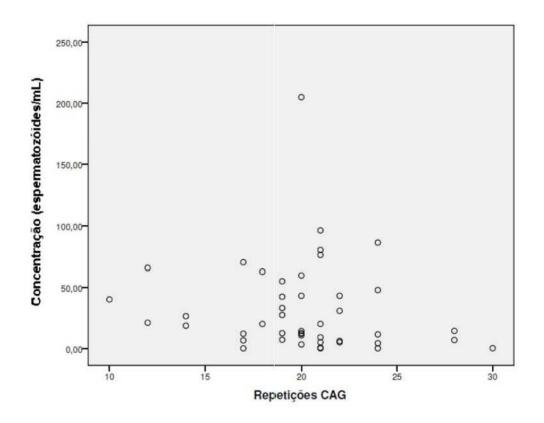
ANEXO 04

FREQUÊNCIA DOS ALELOS NO GRUPO CONTROLE E NO DE PACIENTES



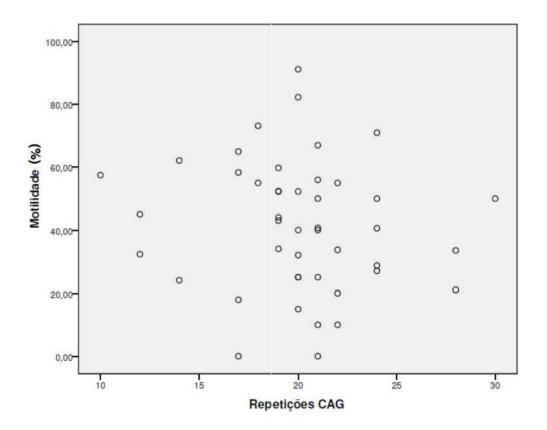
ANEXO 05

CORRELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO CAG E A CONCENTRAÇÃO SEMINAL



ANEXO 06

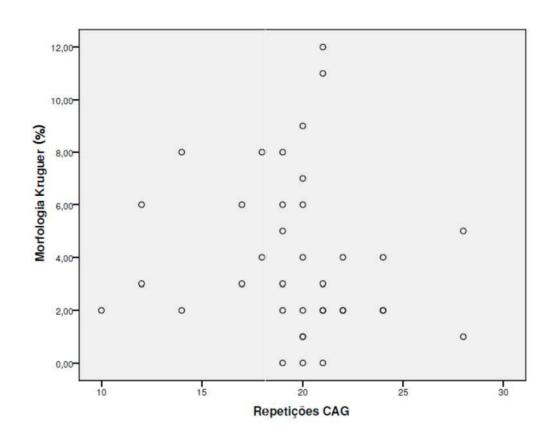
CORRELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO CAG E A MOTILIDADE SEMINAL



ANEXO 07

CORRELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO CAG E A MORFOLOGIA

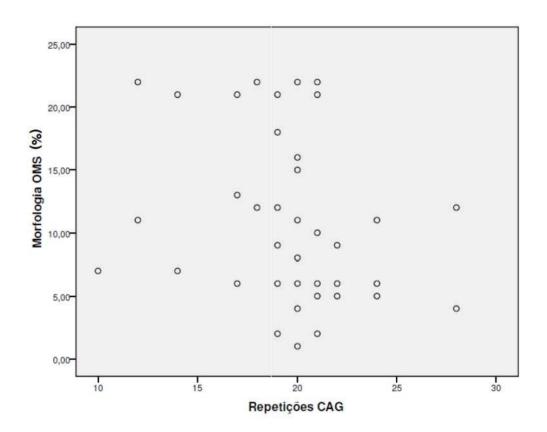
(KRUGER) SEMINAL



ANEXO 08

CORRELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO CAG E A MORFOLOGIA (OMS)

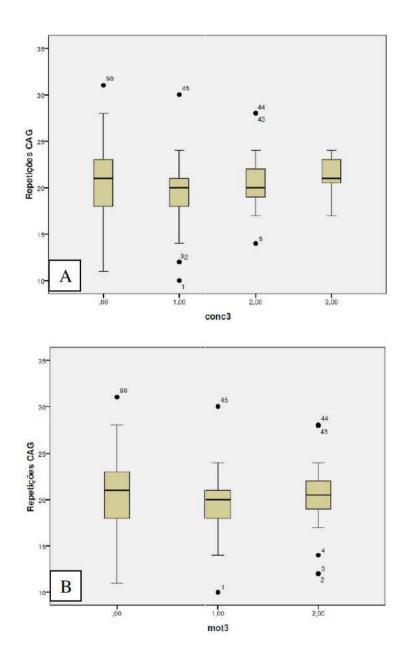
SEMINAL



ANEXO 09

BOXPLOT COM AS MÉDIAS DOS SUBGRUPOS REFERENTES À

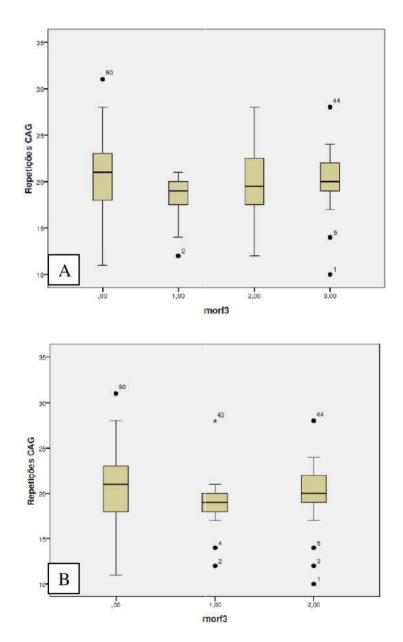
CONCENTRAÇÃO (A) E À MOTILIDADE (B)



ANEXO 10

BOXPLOT COM AS MÉDIAS DOS SUBGRUPOS REFERENTES À

MORFOLOGIA - OMS (A) E À MORFOLOGIA - KRUGER (B)



ANEXO 11

MÉDIA DAS REPETIÇÕES CAG DO ÉXON 1 DO GENE DO RECEPTOR DE

ANDRÓGENOS E DA ANÁLISE SEMINAL DO GRUPO DE PACIENTES

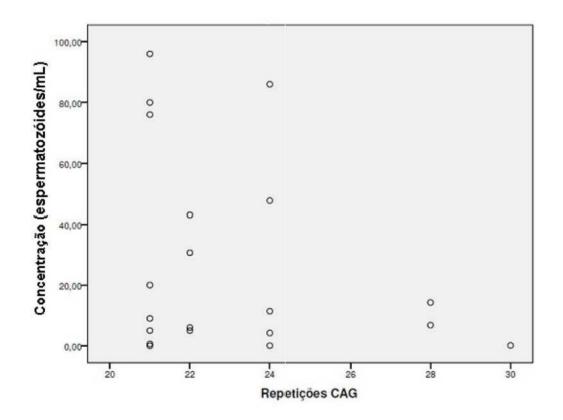
	Média	Valor Mínimo	Valor Máximo	Desvio Padrão (±DP)	IC
GRUPO DE PACIENTES (TOTAL)	20,04	10	30	±3,93	
Análise Seminal - Categorias	20,04	10	30	±3,73	
Concentração*					
$\geq 20 \times 10^6$	18,77	10	24	±3,75	
$<20x10^6e > 5x10^6$	20,64	14	28	±3,91	
$\leq 5 \times 10^6$	22,22	17	30	±3,59	
Motilidade					
≥ 50 %	19,68	10	30	±4,09	95%
< 50%	20,31	12	28	±3,87	
Morfologia (OMS)					
≥ 15%	17,58	10	21	±3,65	
10 - 14%	19,88	12	28	±4,64	
< 14%	20,72	14	28	$\pm 2,96$	
Morfologia (Kruger)					
> 4%	19,08	12	28	±3,74	
≤4%	19,96	10	28	±3,79	
GRUPO CONTROLE (TOTAL)	20,64	11	31	$\pm 3,71$	

^{*} espermatozóides/mL

ANEXO 12

CORRELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO CAG DE PACIENTES COM 21

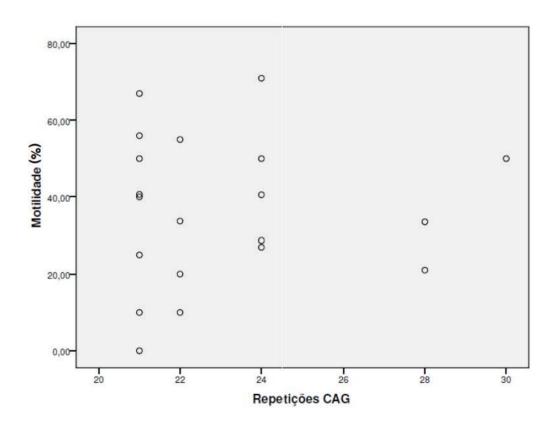
REPETIÇÕES OU MAIS E A CONCETRAÇÃO SEMINAL



ANEXO 13

CORRELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO CAG DE PACIENTES COM 21

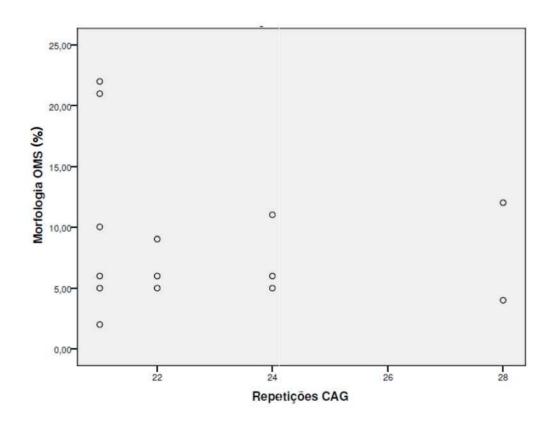
REPETIÇÕES OU MAIS E A MOTILIDADE SEMINAL



ANEXO 14

CORRELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO CAG DE PACIENTES COM 21

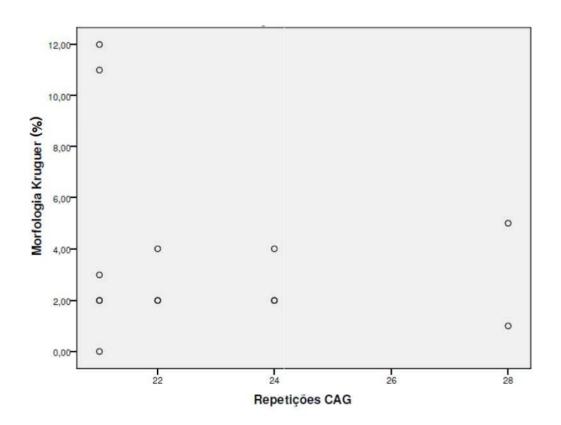
REPETIÇÕES OU MAIS E A MORFOLOGIA (OMS) SEMINAL



ANEXO 15

CORRELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO CAG DE PACIENTES COM 21

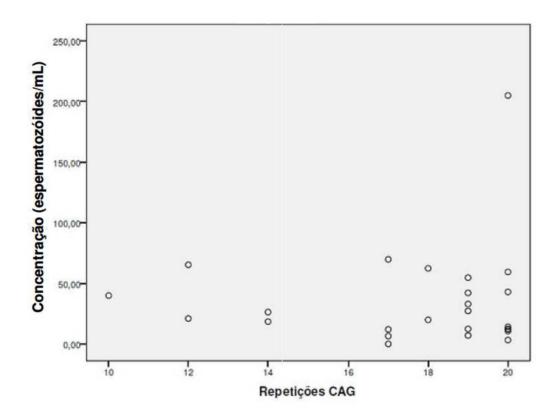
REPETIÇÕES OU MAIS E A MORFOLOGIA (KRUGER) SEMINAL



ANEXO 16

CORRELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO CAG DE PACIENTES COM

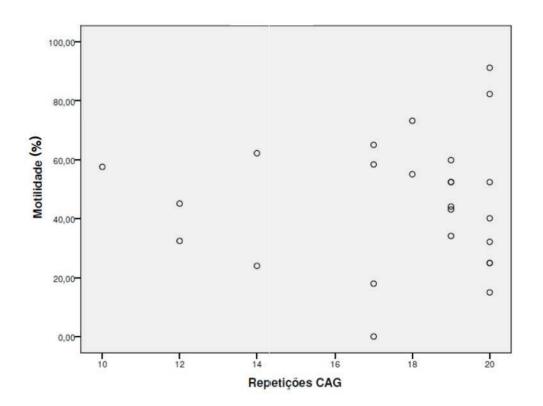
MENOS DE 21 REPETIÇÕES E A CONCETRAÇÃO SEMINAL



ANEXO 17

CORRELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO CAG DE PACIENTES COM

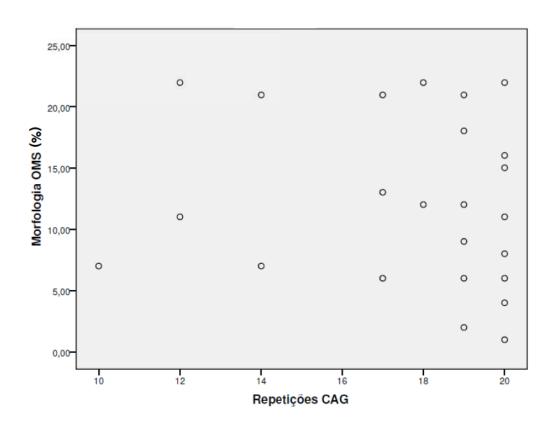
MENOS DE 21 REPETIÇÕES E A MOTILIDADE SEMINAL



ANEXO 18

CORRELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO CAG DE PACIENTES COM

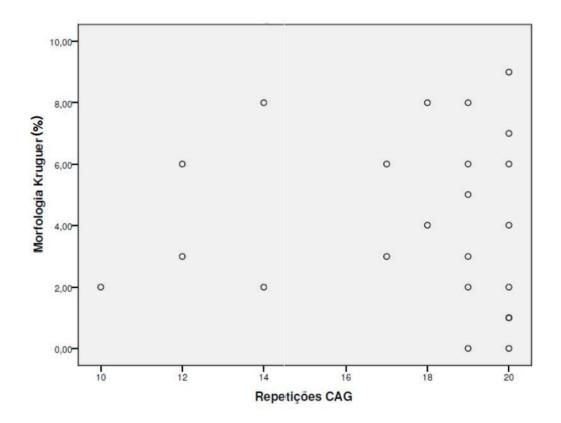
MENOS DE 21 REPETIÇÕES E A MORFOLOGIA (OMS) SEMINAL



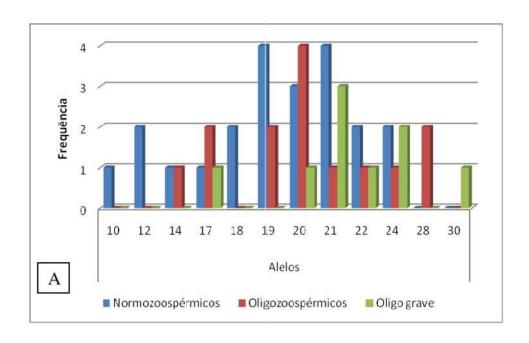
ANEXO 19

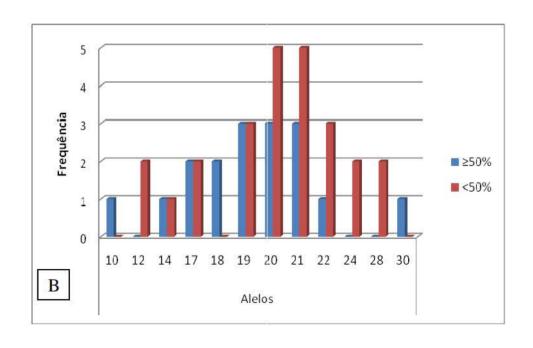
CORRELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO CAG DE PACIENTES COM

MENOS DE 21 REPETIÇÕES E A MORFOLOGIA (KRUGER) SEMINAL



ANEXO 20
FREQUÊNCIA DOS ALELOS NOS GRUPOS REFERENTES À
CONCENTRAÇÃO (A) E À MOTILIDADE (B) SEMINAL

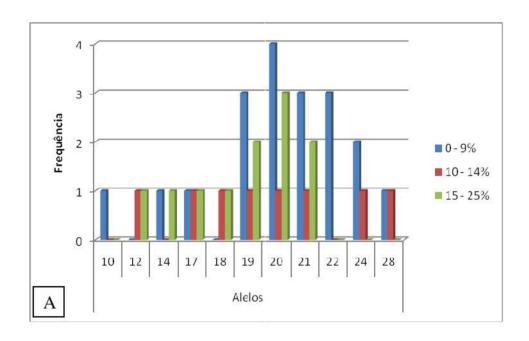


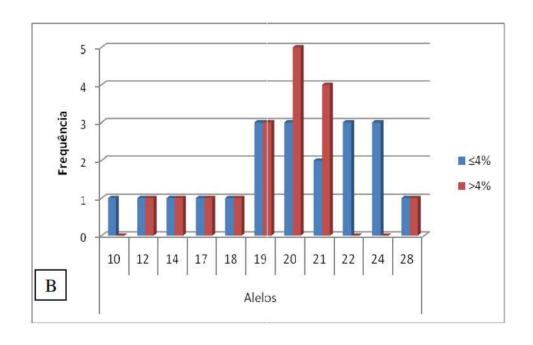


ANEXO 21

FREQUÊNCIA DOS ALELOS NOS GRUPOS REFERENTES À MORFOLOGIA

(OMS) (A) E À MORFOLOGIA (KRUGUER) (B) SEMINAL





ANEXO 22

CORRELAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO CAG E O DIAGNÓSTICO DE INFERTILIDADE EM DIFERENTES ESTUDOS

Estudo		Média ± DP das Repetições CAG (variação)					
	Inférteis	Férteis	Inférteis	Férteis	Significância (p)		
Tut et al., 1997	153	72	3	-	Sim		
Dowsing et al., 1999	30	32	$23,2 \pm 0,7 (15 - 34)$	$20.5 \pm 0.3 (17 - 25)$	Sim (0, 0001)		
Komori et al., 1999	59	36	$21,2 \pm 4,2 (14 - 32)$	$21.4 \pm 3.5 (16 - 31)$	Não		
Dadze et al., 2000	119	22	$22,0 \pm 3,2 (16 - 34)$	$20.8 \pm 3.3 (15 - 26)$	Não		
Mifsud et al., 2001	95	55	$21.9 \pm 0.31 (14 - 31)$	$20.7 \pm 0.52 (8 - 27)$	Sim(0, 034)		
Patrizio et al., 2001	69	45	$23.5 \pm 3.4 (18 - 39)$	$22.0 \pm 2.8 (12 - 30)$	Sim(0, 03)		
Sasagawa et al., 2001	30	51	$23,4 \pm 2,9 (19 - 30)$	$23,7 \pm 3,2 (17 - 28)$	Não		
von Eckardstein et al.,							
2001	43	131	2	-	Não		
Madgar et al. 2002	61	50	$18,6 \pm 3 \ (13 - 24)$	$16,6 \pm 2,6 (11 - 22)$	Sim(0,003)		
Tse et al.; 2003	85	45			Não		
Mengual et al., 2003	102	96	$23,25 \pm 2,7 (18 - 32)$	$22,42 \pm 2,8 (15 - 34)$	Sim(0, 033)		
Milatiner et al.; 2004	114	58			Não		
Ruhayel et al., 2004	85	223	22	21	Não		
Ferlin et al., 2004	163	115	$21,7 \pm 2,8 (9 - 29)$	$21,6 \pm 3,3 (9 - 31)$	Não		
Tufan et al., 2005	47	32	22,28 ±0,37 (18-29)	22,41±0,54 (16-29)	Não (0,84)		
Singh et al., 2006	399	100			Não		
Martínez-Garza et al.,				$20,88 \pm 3,19 (10 -$			
2008	65	40	$21,6 \pm 3,39 (11 - 35)$	28)	Não (0, 256)		
			$24,13 \pm 1,64 (18 -$	$20,55 \pm 2,73 (16 -$			
Radpour et al., 2008	178	210	32)	28)	Sim(0,001)		
Badran et al., 2009	129	52	$18,3 \pm 2,3$	$18,18 \pm 3,63$	Não		
Presente Estudo	45	45	$20,04 \pm 3,93 \ (10 - 30)$	20,64 ±3,71 (11 - 31)	Não (0, 459)		