



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

MESTRADO EM GENÉTICA

**A ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO *RsaI* DO
GENE RECEPTOR- β DE ESTRÓGENO COM A
INFERTILIDADE MASCULINA**

BÁRBARA MARIOTTO BORDIN

ORIENTADORA: Prof^ª. Dr^ª. Katia Karina Verolli O. Moura

Goiânia-GO

2009

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS

MESTRADO EM GENÉTICA

**A ASSOCIAÇÃO ENTRE O POLIMORFISMO *RsaI* DO
GENE RECEPTOR- β DE ESTRÓGENO COM A
INFERTILIDADE MASCULINA**

BÁRBARA MARIOTTO BORDIN

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu*
Genética da Universidade Católica de Goiás
como requisito parcial para obtenção do
Título de Mestre em Genética.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Katia Karina Verolli O. Moura

Goiânia-GO

2009

Dedico este trabalho...

Aos meus pais José Luiz de Miranda Bordin e Lucilena Mariotto de Miranda Bordin e aos meus irmãos Sofia e Gabriel Mariotto Bordin pelo incentivo e apoio incondicional e ininterrupto durante toda minha formação acadêmica.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmãos pelo amor e apoio incondicional sem o qual seria impossível chegar aonde cheguei.

A Prof^a Dra. Katia Karina pela amizade e pelo valoroso apoio em prol da realização desta tese, assim como o meu aperfeiçoamento profissional.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Genética da Universidade Católica de Goiás pela oportunidade de aprendizagem que me foi transmitida, nos ensinamentos de genética, no aprendizado da pesquisa, no exercício da ética, numa dinâmica onde o compromisso se faz presente pela comunicação do conhecimento que cada mestrando irá levar consigo, em uma multiplicação do saber.

Aos profissionais do Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas de Goiânia–GO pelo apoio e contribuição.

Aos amigos Raimundo, Ângela, Wyara, Patrícia, Emilia, Lana, Constanza, Cíntia, Rita, Ana Carolina, Circonsisto pelo companheirismo a vida a fora e pela contribuição direta ou indireta para a realização deste trabalho.

SUMÁRIO

FIGURAS, TABELAS E ANEXOS	v
SIGLAS, SIMBOLOS E ABREVIATURAS	vii
RESUMO.....	x
ABSTRACT	xi
1-INTRODUÇÃO	12
1.1- Espermatogênese	14
1.2- Regulação da Espermatogênese	16
1.3- Estrógeno no trato Reprodutivo Masculino	18
1.4- Receptores de Estrógenos no Trato Reprodutivo Masculino	23
2- OBJETIVO GERAL	28
2.1 Objetivos Específicos	28
3- JUSTIFICATIVA	29
4- MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1 Coleta de amostras	30
4.2 Espermograma	30
4.3 Extração de DNA Genômico	31
4.4 Reação em cadeia da polimerase – PCR	31
4.5 Análise estatística	32
5- RESULTADOS	35
6- DISCUSSÃO	51
7- CONCLUSÃO	56
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57
ANEXOS	72

FIGURAS, TABELAS E ANEXOS

FIGURAS

Figura 1: Esquema de uma pequena porção de um túbulo seminífero (Fonte: <http://rge.fmrp.usp.br/cursos/zm/esp3.htm>).

Figura 2: Conversão de testosterona em estrógeno feita pela enzima aromatase P450 (Fonte: <http://fanaticcook.blogspot.com/2007/09/aromatase-on-becoming-woman-or-man.html>).

Figura 3: Fontes de estrógeno (Fonte: Hess, 2003).

Figura 4: Localização da aromatase em células testiculares de ratos adultos (Fonte: Carreau *et al.*, 2007).

Figura 5. Estrutura dos domínios do Receptor de estrógeno β (RE β) (Fonte: Saunders, 1997).

Figura 6: Frequência do genótipo RsaI AG. Proporção do RsaI AG nos diferentes grupos.

^a Grupo com diferença estatística significante comparada ao grupo normal.

TABELAS

Tabela I: Sequência dos *primers* e tamanho esperado dos fragmentos (Fonte: Aschim *et al.*, 2005).

Tabela II: Protocolo para amplificação do polimorfismo *RsaI* do gene RE β (*RsaI* variante A, *RsaI* variante G).

Tabela III: Protocolo de Termociclagem para amplificação dos *primers*.

Tabela IV: Comparação das idades dos pacientes normais e alterados tanto ao espermograma.

Tabela V: Distribuição fenotípica dos pacientes estudados baseado no laudo do espermograma.

Tabela VI: Distribuição dos genótipos AA, AG e GG do polimorfismo *RsaI* entre os pacientes normais e alterados segundo espermograma.

Tabela VII: Distribuição dos genótipos AA, AG e GG do polimorfismo *RsaI* entre os pacientes normais e entre cada tipo de alteração encontrada no espermograma.

Tabela VIII: Comparação entre o laudo do espermograma com hábitos de fumar e ingerir bebida alcoólica, caxumba e contato com xenobióticos.

Tabela IX: Correlação dos genótipos do polimorfismo *RsaI* AG e GG do gene *RE β* com o hábito de fumar, ingerir bebida alcoólica, caxumba e xenobióticos.

Tabela X: Comparação das variáveis: habito de fumar, ingerir bebida alcoólica, ter caxumba e contato com xenobiótico com os genótipos do polimorfismo *RsaI* GG e AG para cada grupo classificado (normal ou alterado) quanto ao laudo do espermograma.

Tabela XI: Comparação das variáveis: habito de fumar, ingerir bebida alcoólica, ter caxumba e contato com xenobiótico com os genótipos do polimorfismo *RsaI* (GG e AG) para cada alteração quanto ao laudo do espermograma.

ANEXOS

Anexo I - Questionário.

Anexo II - Termo de Consentimento livre e esclarecido.

Anexo III - Consentimento da participação da pessoa como sujeito.

SIGLAS, SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

SIGLAS

A - Adenina

cdNA - ácido desoxirribonucléico complementar

CEP/UCG - Comitê de Ética em pesquisas com seres humanos da Universidade Católica de Goiás

CONEP/SISNEP - Comissão Nacional de Ética em Pesquisa / Sistema Nacional de Informações Sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos

DNA - Ácido desoxirribonucléico

dNTPs - Desoxinucleotídeos trifosfatos

DP - Desvio padrão

EDTA - Ácido etilendiamino tetra-acético

FIV - Fertilização *in vitro*

FSH - hormônio folículo estimulante

G - Guanina

GnRH - Hormônio liberador de gonadotrofina

GO - Goiás

hRE α - receptor α de estrógeno humano

hRE β - receptor β de estrógeno humano

ICSI - Injeção intra-citoplasmática de espermatozóide

LH - hormônio luteinizante

mRE β - receptor β de estrógeno de camundongo

PCR - Reação em cadeia de polimerase

RE - receptor de estrógeno

RE α - receptor α de estrógeno

RE β - receptor β de estrógeno

rRE β - receptor β de estrógeno de rato

TBE - Tris/Borato/EDTA

Tris - Tris-hidroxi-metil-aminocetano

WHO - World Health Organization

SÍMBOLOS

H₂O – Água

MgCl₂ - Cloreto de magnésio

% - por cento

pb - Pares de base

mL - Mililitros

< - menor

> - maior

α - Alpha

β - Beta

pg - Picogramas

ng - Nanogramas

U - Unidade

μL - Microlitros

pMol - Picomol

mM - Milimolar

°C - graus Celcius

± - mais ou menos

n - número

V/cm – volts por centímetro

ABREVIATURAS

vs. – *versus*

RESUMO

O gene Receptor β de estrogênio ($RE\beta$) desempenha um papel importante na regulação da fertilidade tanto em homens e mulheres. O polimorfismo *RsaI* no éxon 5 do $RE\beta$ tem-se mostrado associada com infertilidade masculina em caucasianos. O objetivo deste estudo foi investigar a frequência deste polimorfismo na etiologia da infertilidade idiopática masculina e sua correlação com o tabagismo, etilismo, contato com xenobióticos e caxumba. Nós analisamos 287 brasileiros, incluindo 161 inférteis e 126 homens férteis para avaliar a associação do polimorfismo *RsaI* do gene $RE\beta$ com a infertilidade masculina. Os alelos variantes do polimorfismo *RsaI* (AA, AG ou GG) foram determinadas pela reação em cadeia da polimerase alelo-específica. Em comparação com um grupo controle (homens normozoospermicos), a frequência do genótipo heterozigoto *RsaI*-AG foi quatro vezes maior em homens inférteis (9,94 vs. 2,38%, $P = 0,01$), cinco vezes maior em azoospermicos (11,36 vs. 2,38% , $P = 0,02$) e sete vezes maior em teratozoospermicos (17,79 vs. 2,38%, $P = 0,001$). A frequência do genótipo heterozigoto *RsaI*-AG foi três vezes maior nos fumantes inférteis (23,8 vs. 7,4%, $P = 0,038$) em comparação com não fumantes inférteis e nove vezes maior em fumantes azoospermicos (66,7 vs. 6,9%, $P = 0,035$), comparado com não fumantes azoospermicos. O polimorfismo *RsaI* no gene $RE\beta$ pode ter efeitos sobre a modulação da espermatogênese humana. Parece haver uma associação consistente entre o polimorfismo *RsaI* e tabagismo em homens inférteis.

Palavras-chave: polimorfismo *RsaI*, gene $RE\beta$, infertilidade masculina, tabagismo.

ABSTRACT

Oestrogen Receptor β (ER β) gene plays an important role in the regulation of fertility in both males and females. The *RsaI* polymorphism in exon 5 of ER β has been shown to be associated with male infertility in Caucasian patients. The aim of this study was to investigate the frequency of this polymorphism in the etiology of idiopathic male infertility and to correlate with smoking and ethylism habits, xenobiotic contact and mumps. We analyzed 287 Brazilian men, including 161 infertile and 126 fertile men to evaluate the association of *RsaI* polymorphism in male infertility. The *RsaI* variant alleles (AA, AG or GG) of the patients were determined by allele-specific polymerase chain reaction. Compared with a control group (normozoospermic men), the frequency of the heterozygous *RsaI* AG-genotype was four times higher in infertile men (9,94 vs. 2,38%; $P = 0,01$), five times higher in azoospermic men (11,36 vs. 2,38%; $P = 0,02$) and seven times higher in teratozoospermic men (17,79 vs. 2,38%; $P = 0,001$). The frequency of the heterozygous *RsaI* AG-genotype was three times higher in infertile smokers (23,8 vs. 7,4%; $P = 0,038$) compared with infertile nonsmokers and nine times higher in azoospermic smokers (66,7 vs. 6,9%; $P = 0,035$), compared with azoospermic nonsmokers. The *RsaI* polymorphism in the ER β gene may have modulating effects on human spermatogenesis. There seems to be consistent association between *RsaI* polymorphism and smoking habits in infertile men.

Keywords: *RsaI* polymorphism, ER β gene, male infertility, smoking habits.

1- INTRODUÇÃO

A fertilidade humana é dependente de eventos complexos que envolvem fatores femininos e masculinos. Cerca de 8 a 15% dos casais apresentam problemas fisiopatológicos de fertilidade reprodutiva, a qual apenas é considerada quando o período de tentativas excede por completo um ano (Niederberger & Meacham, 2003; Pasqualotto et al., 2007). Nestes casos, vários exames devem ser realizados tanto no homem quanto na mulher, para se descobrir as possíveis causas e, a partir daí, quais as intervenções possíveis para que o casal gere filhos.

Hoje, sabe-se que o homem é responsável por cerca de 30% a 40% dos casos em que o casal enfrenta problemas para engravidar (Approbato et al., 1999). Em conjunto com fatores femininos, mais 20%. Dessa forma, no mínimo 50% dos casos de infertilidade contam com a participação masculina. Isso acontece devido ao potencial de fertilização do espermatozóide que depende da integração entre várias propriedades, que contribuem para sua competência (Bordin et al., 2005).

A infertilidade masculina relacionada com a produção de espermatozóides é constatada inicialmente através de alterações detectadas no espermograma. Pode ocorrer ausência total destas células (azoospermia), diminuição do número (oligozoospermia, < 20 milhões de espermatozóide/mL de ejaculado), alterações na forma (teratozoospermia), na capacidade de movimento (astenozoospermia) ou na vitalidade (necrospermia). A infertilidade masculina por azoospermia ou oligospermia severa (número de espermatozóides < 5 milhões/mL de ejaculado), afeta aproximadamente 7 a 10% de todos os homens (WHO - World Health Organization, 1999).

Várias alterações cromossômicas são associadas à infertilidade masculina. Ciccodicola e colaboradores (2000) constataram a incidência de alterações cromossômicas masculinas. Krausz e colaboradores (2001) relataram que em homens com azoospermia,

21% apresentam alterações cromossômicas significativas. Essas alterações numéricas e rearranjos cromossômicos envolvendo os cromossomos sexuais ou autossômicos estão associados a danos severos na espermatogênese, causando azoospermia não obstrutiva ou oligospermia severa (Pernice et al., 2002). A realização de estudos cromossômicos deve ser considerada nesses homens para a detecção das alterações cromossômicas. O diagnóstico exato da causa da infertilidade é muito importante para uma completa orientação do tratamento do casal infértil (McElravey & Cortes, 2001).

As condições mais frequentes associadas à infertilidade masculina podem ser classificadas em pré-testiculares, testiculares e pós-testiculares (Kucheria et al., 2003). As pré-testiculares são as alterações que ocorrem no sistema hormonal que impedem a produção de espermatozoides adequados. As testiculares são as doenças do testículo propriamente dito. E as pós-testiculares abrangem problemas no sistema de ductos que transportam os gametas masculinos para o exterior (Schiavini, 1999). Um homem anteriormente fértil pode se tornar infértil ou até mesmo estéril devido a problemas ocorridos ao longo da vida. Além disso, o próprio envelhecimento provoca alterações que geram a redução na produção espermática (Aitken et al., 1995).

Outra condição que estabelece um declínio na capacidade reprodutiva masculina de maneira progressiva é o tabagismo. Existem inúmeros trabalhos demonstrando o efeito deletério do cigarro sobre a fertilidade masculina (Pasqualotto et al., 2006; Sepaniak et al., 2006). Uma análise demonstrou que pacientes fumantes apresentam um decréscimo médio de 10% na motilidade espermática, 13% na concentração espermática e 3% na morfologia espermática (Vine, 1996). O volume seminal apresenta-se diminuído em pacientes fumantes, estratificados de acordo com o número de cigarros por dia, quando comparados aos pacientes não fumantes (Zinaman et al., 2000; Pasqualotto et al., 2006).

O tabagismo pode igualmente causar diminuição da fertilidade por alterar os níveis

hormonais séricos de testosterona e estradiol bem como alteração no DNA dos espermatozoides (Pasqualotto et al., 2006; Sepaniak et al., 2006). A fertilidade masculina fica prejudicada pelo tabagismo, na medida em que ocorre um decréscimo nas taxas de gravidez e alteração nos parâmetros seminais de pacientes tabagistas (Vogt et al., 1986). Por isso, é proposto que homens com qualidade seminal limítrofe, os quais pretendam ter filhos, talvez sejam beneficiados com o abandono do cigarro. Contudo, esta medida possui dados limitados na tentativa de recuperar a função espermática (Zinaman et al., 2000).

Além do cigarro, uma série de substâncias de exposição ocupacional tem sido considerada deletéria para o sistema reprodutivo masculino, como pesticidas e agrotóxicos (Pasqualotto et al., 2004; Queiroz & Waissmann, 2006).

1.1 Espermatogênese

Dentro das causas pré-testiculares existe uma série de fatores que podem sofrer alteração e causar a infertilidade. A espermatogênese é um processo de diferenciação e maturação da espermatogônia em espermatozoide, leva cerca de 74 dias para completar o ciclo e a produção diária é de cerca de 120 milhões de espermatozoides em homens normais (Rose & Scott, 1994). Espermatogônias estão presentes entre as células de Sertoli, perto da membrana basal dos túbulos (Figura 1), são as células germinativas mais imaturas no testículo, e incluem espermatogônias tipo A, espermatogônias intermediárias (encontrada apenas em roedores), e espermatogônias tipo B, sendo estas últimas determinadas a sofrerem diferenciação. A população das células germinativas é considerada um subconjunto da população tipo A, embora a sua identidade não possa ser diferenciada em função da morfologia (Clermont et al., 1972; O'Donnell et al., 2001).

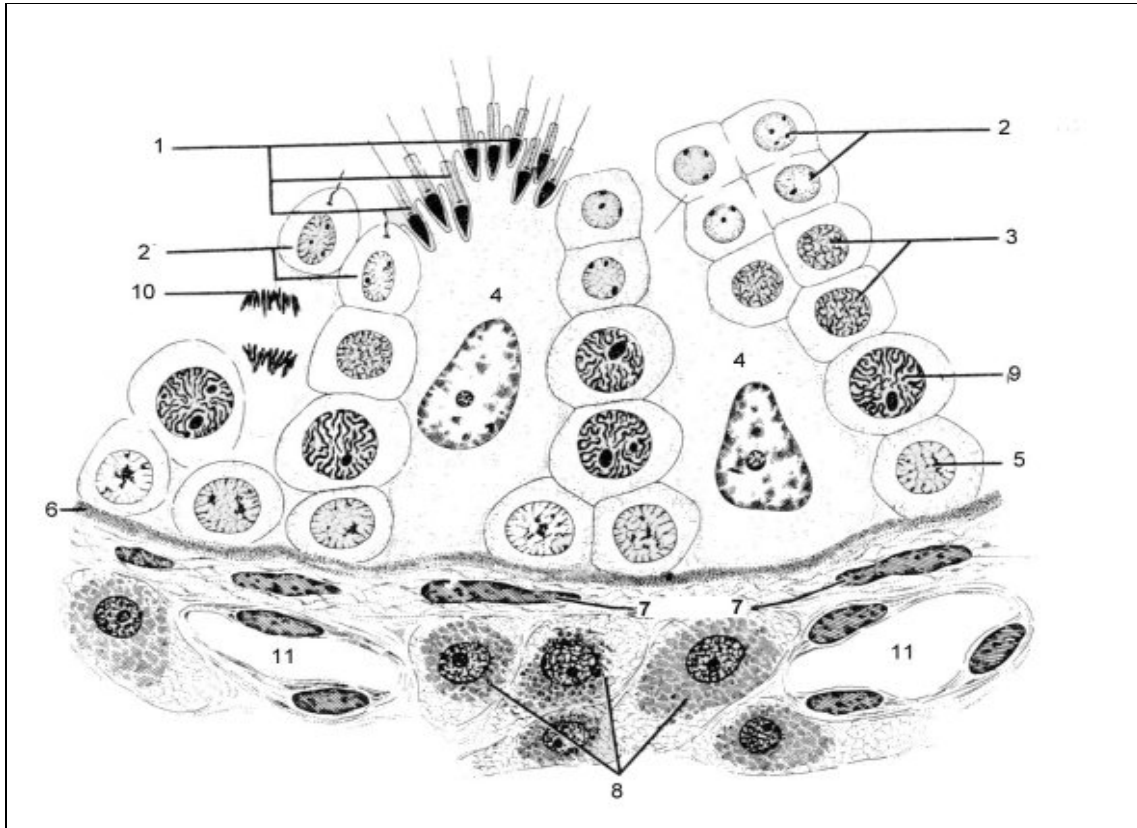


Figura 1: Esquema de uma pequena porção de um túbulo seminífero. 1)espermatozóide, 2)espermátide, 3) espermatócito secundário, 4) célula de Sertoli, 5) espermatogônia, 6) lâmina basal, 7) fibroblasto, 8)células intersticiais do testículo (células de Leydig), 9) espermatócito primário, 10) célula em divisão e 11)vaso sanguíneo. Fonte: <http://rge.fmrp.usp.br/cursos/zm/esp3.htm>

Espermatogônias sofrem numerosas mitoses para produzir um grande número de células germinativas disponíveis para entrar em meiose. Assim, a proliferação da população das espermatogônias fornece a fonte para os milhões de espermatozoides que são produzidos por dia. Após a última mitose das espermatogônias tipo B, são formados espermatócitos primários. Essas células replicam seu DNA e, conseqüentemente, iniciam meiose e produzem espermatócitos secundários. Essas células rapidamente sofrem a segunda divisão meiótica para produzir espermátides haplóides redondas (Russell et al., 1990; O'Donnell et al., 2001).

A diferenciação das espermátides redondas na espermátide madura de forma alongada (espermatozóide) é o processo conhecido como Espermiogênese. As espermátides

sofrem condensação nuclear, contração do citoplasma, formação do acrossoma e desenvolvimento de cauda, para emergir como espermatozóides flagelados. Estes são lançados no lúmen do túbulo pelo processo denominado espermição, durante o qual a maior parte do citoplasma dos espermatozóides é ejetada, na forma de um corpo residual, e fica embutido no citoplasma de uma célula de Sertoli (Russell et al., 1993).

1.2 Regulação da Espermatogênese

Desenvolvimento das células germinativas tem uma interação altamente coordenada com a célula de Sertoli. Ambas podem comunicar-se diretamente através de interações mediadas ligante-receptor ou fatores parácrinos. A produção e secreção de muitas proteínas das células de Sertoli estão envolvidas no desenvolvimento de células germinativas ocorrendo em cada fase de forma dependente (Parvinen et al., 1982), refletindo na capacidade da célula de Sertoli em se adaptar à evolução das necessidades das células germinativas. Durante muitos anos, foi considerado que células de Sertoli eram as responsáveis pelo controle do desenvolvimento das células germinativas; no entanto, estudos recentes investigando animais com transplante de espermatogônias de rato para camundongo demonstraram claramente que células germinativas de rato em contato com células de Sertoli de camundongo desenvolvem de acordo com a cinética da espermatogênese do rato, trazendo assim o papel das células germinativas no controle de seu próprio destino (França et al., 1998).

Bem como a produção de espermatozóides, o testículo está envolvido na produção de hormônios que são necessários para diversas funções no corpo, incluindo a manutenção das características sexuais secundárias, e *feedback* sobre o hipotálamo e hipófise para controlar a secreção de gonadotrofinas: hormônio luteinizante (LH, *Luteinising Hormone*) e hormônio folículo estimulante (FSH, *Follicle-stimulating hormone*) (França et al., 1998).

É bem conhecido que as gonadotrofinas são os principais reguladores endócrinos da espermatogênese. LH estimula a Célula de Leydig para a secreção de andrógenos, a saber, testosterona, o que, por sua vez, age em receptores andrógenos no epitélio seminífero para controlar a espermatogênese. FSH estimula receptores dentro da célula de Sertoli para regulamentar a espermatogênese, estimulando a produção de inúmeros fatores nas células de Sertoli. Os papéis de testosterona e FSH no testículo têm sido extensivamente estudados, ainda que relativamente pouco se saiba sobre o modo como estes hormônios agem dentro da célula de Sertoli para estimular e manter espermatogênese (Weinbauer et al., 1993; Sharpe, 1994; McLachlan et al., 1996).

Têm sido mostrados androgênios sozinhos estimulando todas as fases de desenvolvimento nas células germinativas em camundongos, que têm deficiência congênita do hormônio liberador de gonadotrofina (GnRH, *gonadotropin-releasing hormone*) e, por conseguinte, FSH e LH (Singh et al., 1995), destacando a exigência de andrógeno na espermatogênese. A questão de saber se FSH é essencial para a espermatogênese nos ratos foi respondida pela geração de ratos transgênicos que possuíam orientadas perturbações do receptor de FSH (Dierich et al., 1998) ou na subunidade- β do gene *FSH* (Kumar et al., 1997). Machos de ambos os modelos transgênicos são férteis e exibem todas as fases de desenvolvimento de células germinativas, sugerindo que o FSH não é um requisito absoluto para a fertilidade. No entanto, em ambos os casos, os testículos são menores, e menos espermatozoides são produzidos (Singh et al., 1995; Kumar et al., 1997; Dierich et al., 1998), devido à exigência de FSH durante o período neonatal na divisão da célula de Sertoli (Singh et al., 1996).

Mais recentes estudos quantitativos sobre a falta de receptor de FSH em camundongos também demonstraram defeitos de desenvolvimento espermático, levando a má qualidade da produção de espermatozoides (Krishnamurthy et al., 2000). Assim,

embora o FSH não seja essencial para a espermatogênese, é claramente essencial para espermatogênese quantitativamente normal e fertilidade.

A iniciação e manutenção de espermatogênese quantitativamente normal dependem da regulamentação endócrina por FSH, LH, e andrógenos, e assim, a plena fertilidade depende do delicado equilíbrio do eixo hipotálamo-hipófise-testículo. Mas um crescente corpo de evidência sugere que o estrógeno deve ser adicionado à lista de hormônios envolvidos na regulação da espermatogênese (O'Donnell et al., 2001).

1.3 Estrógeno no trato Reprodutivo Masculino

A visão tradicional do estradiol como o hormônio "feminino" e da testosterona como o hormônio "masculino" tem sido contestada nos últimos anos (Sharpe, 1998). A espermatogênese é conhecida há muitos anos por ser regulada por FSH e andrógenos, entretanto, surgem provas de modelos animais, incluindo ratos transgênicos, sugerindo que o estrógeno deve ser adicionado à lista de hormônios importantes para a espermatogênese (O'Donnell et al., 2001). Apenas recentemente pesquisas identificaram genes envolvidos na regulação da espermatogênese. O conhecimento cada vez maior do genoma humano e dos genes que controlam a reprodução humana se torna fundamental no estudo da fertilidade (Lahn & Page, 1997).

Foi constatado, na década de 1930, que o desenvolvimento testicular era responsivo ao hormônio "feminino" (Wolff & Ginglinger, 1935; Weniger, 1990; Hess, 2003). Também foi constatado nas décadas de 1930 e 1940 que a exposição a altas doses de estrógenos poderia induzir malformações do trato reprodutivo masculino (Burrows, 1935; McLachlan et al., 1975; Arai et al., 1983; Hess, 2003). Assim, durante os anos formativos da biologia reprodutiva como uma disciplina, foi sugerido que o estrógeno pode ser importante no homem (Greco et al., 1993; Hess, 2003).

A importância potencial do estrogênio durante o desenvolvimento do aparelho reprodutor masculino foi constatada pelo relato que tratamento com dietilestilbestrol (DES) durante a gravidez induzia criptorquidia (quando o um ou os dois testículos não descem para a bolsa escrotal) e cistos no epidídimo em ratos do sexo masculino (McLachlan et al., 1979). Esta descoberta abriu a porta a inúmeras investigações sobre os efeitos em longo prazo da exposição de compostos estrogênicos sobre o desenvolvimento do trato reprodutivo masculino (Hess, 2003).

A concentração de estrogênios no sangue periférico é geralmente baixa no sexo masculino, mas varia de 2-180 pg/mL, dependendo da espécie (de Jong et al., 1973; Waites & Einer-Jensen, 1974; Dohler & Wuttke, 1975; Ganjam & Amann, 1976; Eiler & Graves, 1977; Overpeck et al., 1978; Kumari et al., 1980; Setchell, 1982; Claus et al., 1985; Melnyk et al., 1992; Claus et al., 1992; Bujan et al., 1993). Concentrações de estrogênio são normalmente mais elevadas na veia testicular e vasos linfáticos do que na circulação geral. Além disso, no trato reprodutivo, estrogênios podem atingir concentrações relativamente elevadas (Hess, 2003), são também abundantes no sêmen e, dependendo da espécie, a sua concentração pode variar de 14 a cerca de 900 pg/mL (Ganjam & Amann, 1976; Bujan et al., 1993; Waites & Einer-Jensen, 1974; Eiler & Graves, 1977; Claus et al., 1985).

Mais interessante foi a descoberta que a aromatase P450, que é capaz de converter andrógenos em estrogênios (Figura 2), está presente no testículo (Tcholakian et al., 1974; Dorrington et al., 1978; Pomerantz, 1979; Valladares & Payne, 1979; Weniger & Zeis, 1983).

Estudos prévios indicaram que a principal fonte de estrogênio nos homens imaturos seja a célula de Sertoli (van der Molen et al., 1981). No testículo adulto, as células de Leydig expressam aromatase (P450arom) e sintetizam estradiol, a uma taxa muito maior do que a verificada no adulto nas células de Sertoli (Rommerts & Brinkman, 1981; Rommerts

et al., 1982; Payne et al., 1987; Levallet et al., 1998; Carreau et al., 1999; Levin, 2002; Carreau et al., 2003). Atualmente, um crescente corpo de evidências indica que células germinativas também sintetizam estrógeno e, eventualmente, servem como a principal fonte deste esteróide no trato reprodutivo masculino (Carreau et al., 2003).

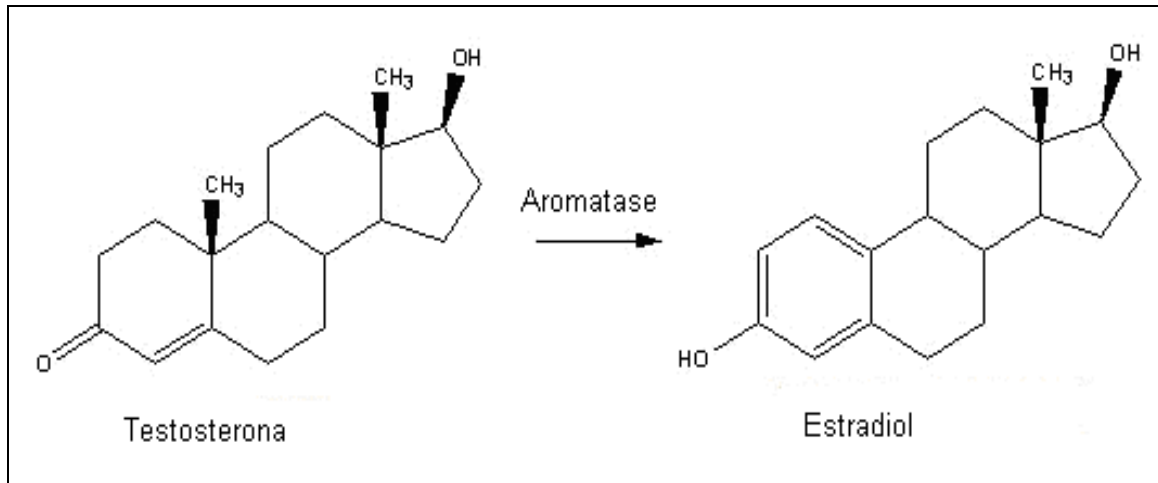


Figura 2: Conversão de testosterona em estrógeno feita pela enzima aromatase P450. Fonte: <http://fanaticcook.blogspot.com/2007/09/aromatase-on-becoming-woman-or-man.html>

As fontes potenciais de estrogênio no trato reprodutivo masculino são ilustradas na Figura 3. Estrógeno é produzido em tecidos periféricos e chegam ao trato reprodutivo através do plasma, mas também é sintetizado por células de Leydig, no interstício testicular. A contribuição do estrógeno do testículo para o plasma e da vasculatura para o testículo é desconhecida, mas presume-se que a maioria dos estrógenos linfáticos seria derivado de células de Leydig, e juntamente com as células germinativas contêm aromatase no testículo adulto. Células de Leydig podem também contribuir para concentrações desse hormônio no fluido da rede testicular, mas é mais provável que a produção pelas células germinativas prevê o estrogênio que terá como alvo o epitélio do ducto eferente, na região que contém a maior concentração de receptores de estrógeno (RE) (Hess, 2003).

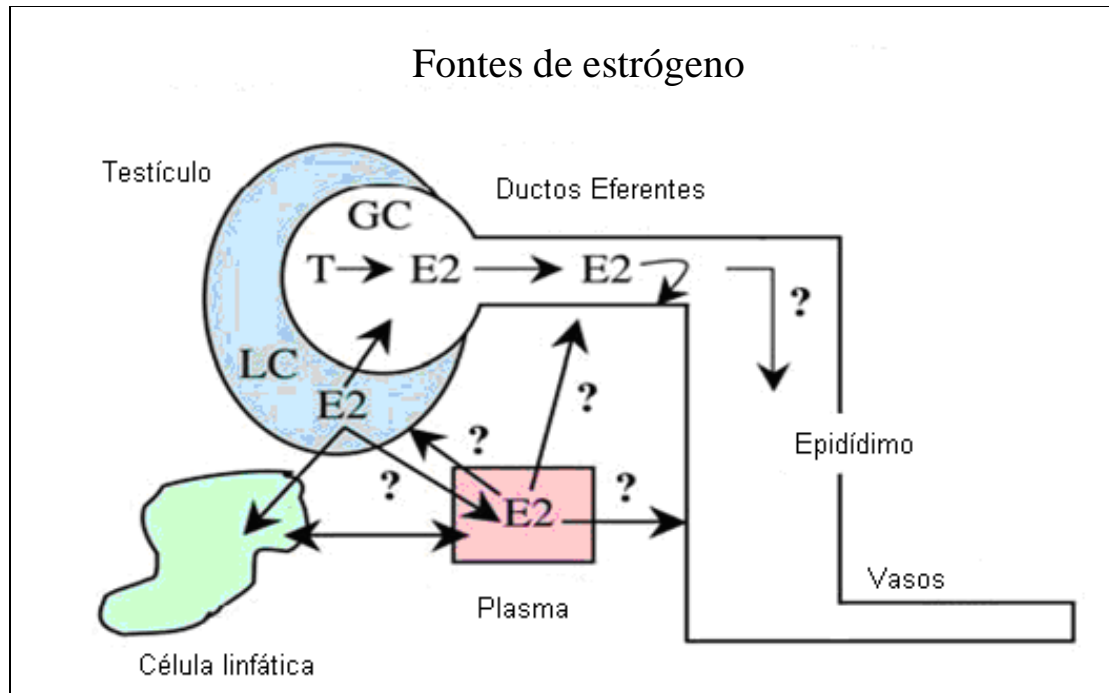


Figura 3: Fontes de estrógeno. E2: estrógeno; LC: célula de Leydig; GC: Célula germinativa. Fonte: Hess, 2003.

Nitta e colaboradores (1993) relataram pela primeira vez que P450arom está presente em células germinativas testiculares do rato macho adulto. Sua presença foi confirmada por análise isolada de *Western blot* e *Northern blot* de células germinativas. Sua atividade em células germinativas foi igual ou excedeu a atividade encontrada nas células intersticiais. A enzima foi localizada no Complexo de Golgi em todo o citoplasma das espermátides alongadas e tardias. Mais recentemente, Carreau e colaboradores (2003) e Rago e colaboradores (2003) demonstraram expressão e atividade da aromatase no esperma humano.

A presença de aromatase nas células germinativas masculinas foi demonstrada em várias espécies, incluindo rato (Figura 4), camundongo, urso pardo, galo e no homem (Nitta et al., 1993; Hess et al., 1995; Kwon et al., 1995; Janulis et al., 1996; Janulis et al., 1998; Hess et al., 2001; Kotula-Balak et al., 2003; Rago et al., 2003; Lambard et al., 2003).

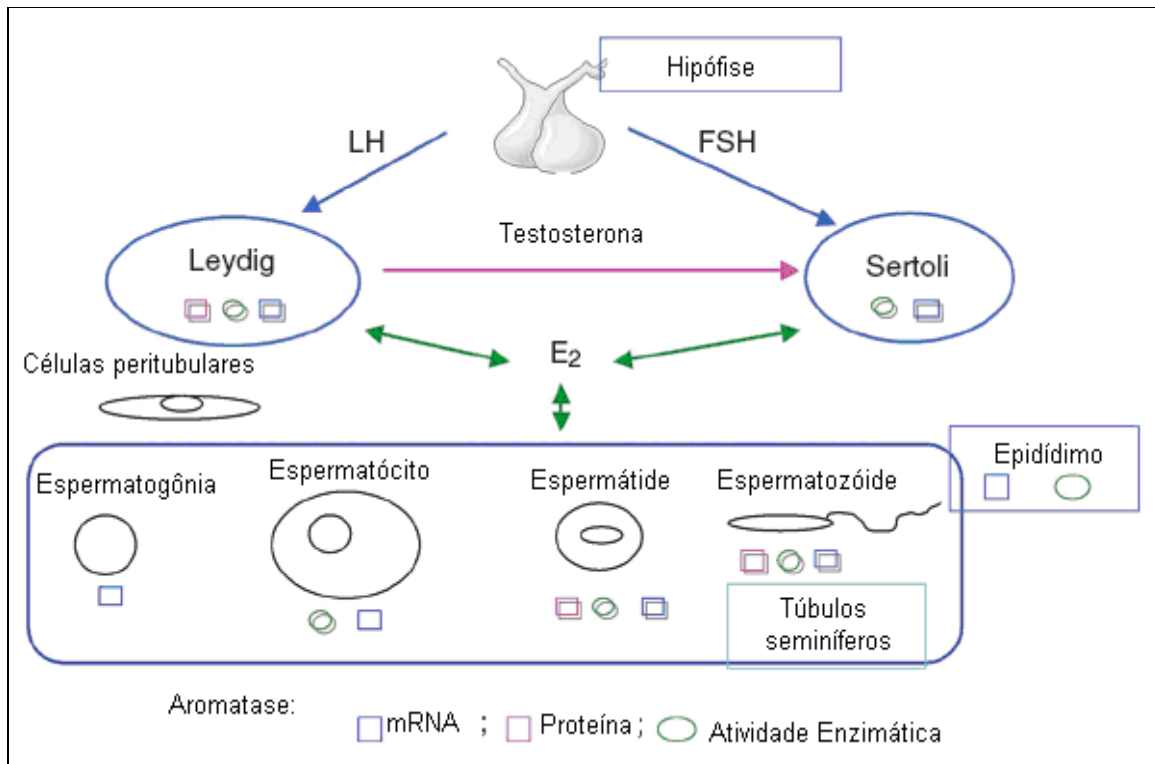


Figura 4: Localização da aromatase em células testiculares de ratos adultos. E2: estradiol. Fonte: Carreau et al., 2007.

A presença da aromatase em células germinativas e espermatozóides foi confirmada recentemente e demonstrou que representam aproximadamente 62% do total da aromatase testicular (Levallet & Carreau, 1997; Levallet et al., 1998; Carreau et al., 1988). Outros demonstraram a ausência de aromatase no epidídimo do rato (Schleicher et al., 1989), assim, a conversão de andrógenos a estrógenos no esperma continua a ser a principal fonte de estrogênio na luz do trato reprodutivo da espécie. Esta observação levanta novas e excitantes hipóteses quanto à possibilidade de estrogênio regular funções no ducto eferente, epidídimo e ducto deferente (Hess, 2003).

1.4 Receptores de Estrógenos no Trato Reprodutivo Masculino

Existem dois tipos de hormônios: os hidrossolúveis e os lipossolúveis, que também são denominados esteróides. Os hidrossolúveis representam a grande maioria e atuam sobre receptores situados na membrana plasmática. Os lipossolúveis como, por exemplo, o estrógeno e a progesterona, atravessam a membrana celular com facilidade e se fixam em receptores localizados no citoplasma e no núcleo da célula alvo (Junqueira & Carneiro, 1997).

Os genes regulados pelos hormônios esteróides são diferentes conforme o tipo da célula-alvo. De uma forma geral, as respostas da célula ativada pelo hormônio dependem do próprio hormônio e das características da célula-alvo. Os receptores podem ser semelhantes, mas os genes ativados são diferentes, dependendo do tipo celular (Junqueira & Carneiro, 1997), portanto hormônios esteróides regulam a função celular através de receptores intracelulares específicos expressos em seus tecidos-alvos.

A clonagem de cDNAs codificando um número de receptores de estrógenos e a comparação de suas seqüências revelou que, juntamente com os receptores de hormônios tireoidianos, eles pertencem a uma grande superfamília de genes que atuam como fatores de transcrição ligante-ativada (Carson-Jurnica et al., 1990).

Na década de 90 novas descobertas levaram à hipótese de que o estrogênio não apenas tem funções importantes no trato reprodutivo masculino adulto, mas que o estrógeno e seus receptores são "essenciais" para a fertilidade normal. Este novo paradigma, para o papel do estrógeno no homem começou com a descoberta de que células germinativas testiculares e epididimais contêm aromatase e sintetizam estrógeno (Nitta et al., 1993). Esta descoberta explica a presença de uma elevada concentração de estradiol na rede testicular fornecendo uma fonte de estrógeno para a alta concentração de receptores que foram posteriormente encontrados no trato reprodutivo masculino (Cooke et al., 1991;

Iguchi et al., 1991; Hess et al., 1995; Fisher et al., 1997; Goyal et al., 1997; Hess et al., 1997a).

Os receptores de estrógeno (RE) são fatores de transativação mediada através da ligação com o hormônio esteróide 17- β -estradiol, isto em ambos os sexos, masculino e feminino (Enmark et al., 1997), sendo as chaves regulatórias do processo que envolve o desenvolvimento e a manutenção do sistema reprodutivo (Clarke & Sutherland, 1990). Duas isoformas da proteína receptora para o estrógeno foram encontradas, clonadas e caracterizadas em várias espécies, denominadas receptor- α estrogênico (RE α) e receptor- β estrogênico (RE β) (Kuiper et al., 1996; Mosselman et al., 1996; Moore et al., 1998; Ogawa et al., 1999). Estes receptores são membros da superfamília dos genes que compreendem receptores nucleares de diversos ligantes hidrófobos, como os hormônios esteróides (estrógeno, progesterona, glucocorticóides, mineralocorticóides), ácidos retinóicos (vitamina A), vitamina D, protaglandina e hormônios da tireóide (Gronemeyer, 1991; Mangelsdorf et al., 1995).

No entanto, a função do estrógeno não foi descoberta até ratos sem receptores α de estrógeno, ER α *knockout* (α ERKO), terem sido produzidos (Lubahn et al., 1993). O rato α ERKO mostrou pela primeira vez que ER α é essencial para a fertilidade do macho (Eddy et al., 1996; Dupont et al., 2000). Este modelo animal foi desenvolvido para mostrar que o estrógeno fornece uma função fisiológica na regulação fluido-dinâmica no trato reprodutivo masculino, uma função que é "essencial" para o desempenho reprodutivo normal (Hess et al., 1997b; Lee et al., 2000; Hess & Nakai, 2000; Nakai et al., 2001; Zhou et al., 2001; Lee et al., 2001; Oliveira et al., 2001; Oliveira et al., 2002).

Todos os REs partem de um composto estrutural básico similar, tendo domínios de A a F (Mangelsdorf et al., 1995) e RE β não é exceção (Figura 5). Como RE α e outros membros da família de receptores hormônio esteróide, o gene hRE β (humano) é codificado

por oito exons e foi mapeado e localizado no braço longo do cromossomo 14 no loco 2 entre os sublocos 2 e 4 (14q22-24) (Enmark et al., 1997).

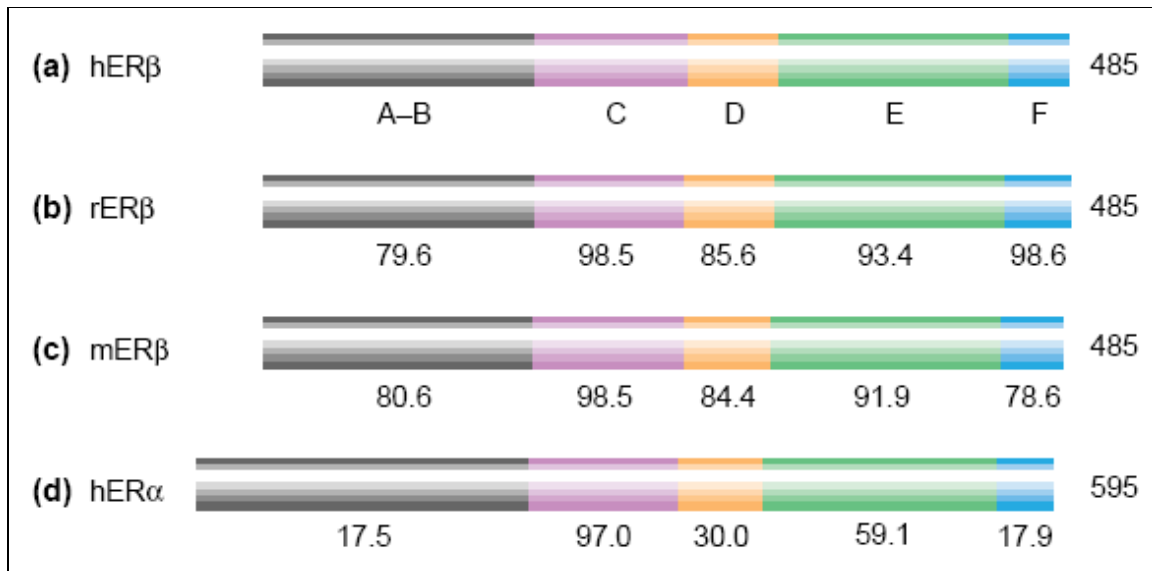


Figura 5. Estrutura dos domínios do Receptor de estrógeno β (RE β). A localização das diferentes domínios (A-B, C, D, E e F) são indicados para o (a) hRE β e a percentagem de homologia de aminoácidos entre ER β no Homem e dos receptores homólogos identificados em (b) ratos e (c) camundongos são mostrados. (d) Homologia entre hRE β e hRE α é apresentada para comparação. Fonte: Saunders, 1997.

Os papéis dos domínios funcionais de receptores esteróides foram definidos por experiências em que domínios individuais dos receptores foram trocados, ou atividades de receptores modificadas por mutagênese sítio-dirigida (Carson-Jurnica et al., 1990). Os cDNAs do RE β em seres humanos (Mosselman et al., 1996), ratos (Kuiper et al., 1996) e camundongos (Tremblay et al., 1997) foram clonados e mostraram ter seqüências com homologia significativa (Figura 5).

O domínio A/B é uma região pouco conservada entre as espécies e contém a Função Ativadora 1, sendo importante para a transativação do gene específico. O domínio C, ao contrário do anterior, é mais conservado em ambas as formas α e β do receptor humano e entre as espécies. É responsável pela ligação específica junto ao estrógeno e contribui ainda para a dimerização e transativação (Kumar et al., 1987; Green & Chambon, 1987).

O domínio D acredita-se estar envolvido nas mudanças conformacionais da molécula durante a ativação (Kumar & Chambon, 1988). A região E contém o domínio da Função Ativadora 2, que por sua vez está envolvida na transativação da Função Ativadora 1 (Tasset et al., 1990; Seielstad et al., 1995). A região F desempenha o papel de distinguir entre as agonistas e antagonistas do estrógeno (Montano et al., 1995).

Mosselman et al. (1996) relataram, pela primeira vez, o sequenciamento do cDNA $RE\beta$ de humanos, anunciando uma proteína de 477 aminoácidos. Moore et al. (1998) e Ogawa et al. (1999) clonaram o cDNA e encontraram 53 aminoácidos adicionais na região terminal amino do $RE\beta$. Recentes estudos confirmam a expressão do comprimento total da proteína $RE\beta$, contendo 530 aminoácidos.

Baseando-se nas análises do RNAm, o $RE\beta$ é encontrado em vários tecidos, incluindo o sistema nervoso central, sistema cardiovascular, sistema imune, trato urogenital, trato gastrintestinal, rins e pulmões (Enmark et al., 1997). A detecção de $RE\beta$ nestes sítios tem sido limitada à expressão do RNAm devido à falta da especificidade e da sensibilidade dos anticorpos que detectam a proteína $RE\beta$ no tecido normal. Autores relatam que não se compreende muito a função da proteína $RE\beta$, que requer maiores investigações através do uso de sondas moleculares e biológicas (Pavao & Traish, 2001).

Recentemente várias variantes do gene $RE\beta$ foram descritas, incluindo o polimorfismo *RsaI*, que é super-expresso em disfunções ovulatórias. Neste polimorfismo ocorre a troca de bases guanina por adenina na posição do nucleotídeo 1082, no exon 5, do gene $RE\beta$. No entanto, faltam estudos genéticos sobre essas variantes. Tais informações poderiam ajudar no conhecimento sobre o papel do estrógeno na fisiologia e fisiopatologia do sistema reprodutivo masculino (Aschim et al., 2005).

Aschim e colaboradores (2005) realizaram, pela primeira vez, estudo mostrando uma associação entre variantes genéticas do gene $RE\beta$ e infertilidade masculina, e

constataram a frequência do genótipo AG do polimorfismo *RsaI* aumentada em homens inférteis, comparado com grupo controle.

2- OBJETIVO GERAL

Analisar a frequência alélica do polimorfismo *RsaI* do gene receptor- β de estrógeno ($RE\beta$) com métodos genético-moleculares em pacientes masculinos e correlacionar com alterações no espermograma.

2.1 Objetivos Específicos

- Analisar os possíveis genótipos (AA, AG ou GG) do polimorfismo *RsaI* no gene ($RE\beta$) nos pacientes;
- Pesquisar a correlação hábito de fumar, consumir bebida alcoólica, contato com xenobióticos e ter sido acometido por caxumba com alteração espermática;
- Pesquisar a correlação hábito de fumar, consumir bebida alcoólica, contato com xenobióticos e ter sido acometido por caxumba com os genótipos do polimorfismo *RsaI* no gene ($RE\beta$).

3- JUSTIFICATIVA

A infertilidade masculina idiopática precisa ser desvendada. O estudo dos receptores de estrógeno pode ajudar no desenvolvimento de melhores métodos de diagnóstico e na expansão dos conhecimentos sobre a espermatogênese. Apenas recentemente pesquisas identificaram genes envolvidos na regulação da espermatogênese. O conhecimento cada vez maior do genoma humano e dos genes que controlam a reprodução humana se torna fundamentais no estudo da fertilidade.

Homens com diagnóstico de alterações no espermograma, correlacionado com infertilidade, deveriam passar por uma investigação pré-tratamento. Este passo é de grande importância visando posterior encaminhamento para técnicas de reprodução assistida.

Com a utilização das técnicas como a injeção intra-citoplasmática de espermatozóide (ICSI) e fertilização *in vitro* (FIV), homens inférteis podem se tornar pais. Através dessas técnicas podem ser usados espermatozoides de indivíduos com síndromes ou translocações e obter crianças com doenças semelhantes ou mais graves que as dos pais. Isto precisa ser discutido com o casal que deve ser submetido a um exame de aconselhamento genético. Seguramente, a ICSI foi um grande acontecimento para a reprodução humana, mas esta técnica deve ser usada com parcimônia e sabedoria e o casal tem que participar das decisões, recebendo todas as informações.

4- MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Coleta de amostras

Foram coletadas amostras de sangue periférico (10mL) e/ou sêmen de 287 pacientes encaminhados ao Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas de Goiânia-GO, com clínica de infertilidade idiopática. Foi motivo de exclusões pacientes com azoospermia obstrutiva ou tumores. Dados relativos aos pacientes incluindo nome, idade na época do diagnóstico, tabagismo, etilismo, contato com xenobióticos (agrotóxicos, combustíveis e material usado em fotocópia), atividade profissional, acometimento por caxumba, antecedentes familiares e filhos ou não, foram colhidos dos prontuários e/ou dos respectivos pacientes (através de um questionário – Anexo I) e anotados em formulários apropriados. Foi feita também a submissão a cada paciente do Termo de Consentimento Livre Esclarecido (Anexo II) e do Consentimento da participação da pessoa como sujeito (Anexo III), aprovado pelo Comitê de Ética em pesquisas com seres humanos da Universidade Católica de Goiás CEP/UCG (347/2005) e pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa / Sistema Nacional de Informações Sobre Ética em Pesquisa envolvendo Seres Humanos CONEP/SISNEP (FR060948).

4.2 Espermograma

O sêmen foi analisado pela técnica estabelecida como padrão pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1999), no Laboratório de Reprodução Humana HC-UFG, pelos profissionais deste laboratório. Os pacientes estiveram em abstinência de 2 a 5 dias. A coleta foi realizada no próprio laboratório, em local apropriado. Após trinta minutos da coleta do sêmen, verificou-se a liquefação, o volume e o pH, e em seguida foi feito o exame microscópico para observação da motilidade na câmara de *Makler*, e a vitalidade com

eosina a 2% sob lamínula. Com a coloração rápida (panótico) faz-se a contagem morfológica, classificando os espermatozoides em normais ou anormais segundo os critérios da sociedade de urologia (Schiavini, 1999) e Organização Mundial da Saúde (WHO, 1999).

4.3 Extração de DNA Genômico

A análise molecular foi realizada no Núcleo de Pesquisas Replicon da Universidade Católica de Goiás. Para a extração de DNA genômico foi utilizado o Kit GFX™ (Amersham Pharmacia Biotech, EUA).

4.4 Reação em cadeia da polimerase – PCR

Foi realizada PCR alelo-específica nas amostras de DNA de cada paciente para detectar as variantes do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ*. Duas reações por paciente foram realizadas, uma utilizando *primer* específico para a variante polimórfica “A” e uma utilizando *primer* específico para a variante do tipo selvagem “G”, cada reação feita juntamente com *primers* controles. Os *primers* (Tabela I) utilizados foram sugeridos por Aschim e colaboradores (2005).

As condições da PCR foram estabelecidas para gerar tanto um fragmento controle e um mais curto, banda alelo-específica, na presença da variante; e só o fragmento controle na sua ausência da variante.

Portanto os possíveis resultados dos genótipos do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* que podem ser encontrados com o uso dos *primers* propostos por Aschim e colaboradores (2005) são AA, AG ou GG.

Tabela I: Sequência dos *primers* e tamanho esperado dos fragmentos.

<i>Primer</i>	Sequência (5' - 3')	Tamanho do fragmento, pares de bases (bp)
<i>RsaI</i> Fw	ACT TGC CAT TCT GTC TCT ACA	
<i>RsaI</i> Rev Controle	CAC AGG ACC CTG AAT CCT	409 (controle)
<i>RsaI</i> RevA	AGC TCT CCA AGA GCC GT	127 (variante A)
<i>RsaI</i> RevG	AGC TCT CCA AGA GCC GC	127 (variante G)

FONTE: Aschim et al. (2005).

O protocolo usado para a amplificação está especificado na Tabela II e o protocolo de termociclagem está especificado na Tabela III.

Para a análise dos produtos obtidos pela PCR, o material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em solução tampão Tris-borato de EDTA (TBE) a 1x. O gel foi submetido a um campo elétrico constante de 10 V/cm por um período de 1 hora aproximadamente. Os géis foram corados com brometo de etídio a 5 µg/ml, por um período de 20 minutos. O registro visual do gel foi feito com o auxílio de um sistema de vídeo-documentação (*Image Master VDS®* - Amersham Pharmacia Biotech, EUA).

4.5 Análise estatística

A comparação da distribuição das idades entre os grupos de pacientes alterados e normais quanto ao espermograma foi feita usando o teste U Mann Whitney. As frequências dos genótipos do polimorfismo *RsaI* do gene receptor- β de estrógeno ($RE\beta$) foram comparadas com as alterações espermáticas usando o teste Exato de Fisher. As frequências dos pacientes com alteração espermática foram com as variáveis (hábito de fumar, ingestão de bebida alcoólica, contato com xenobióticos e acometimento por caxumba) usando o teste

Qui-Quadrado. Estes testes estatísticos foram feitos com o auxílio do *software* Bioestat (versão 5.0, Fonte: *biocistron.blogspot.com/*)

Tabela II: Protocolo para amplificação do polimorfismo *RsaI* do gene *RE β* (*RsaI* variante A, *RsaI* variante G).

REAGENTES	[] UTILIZADA	VOL. P/ 1 AMOSTRA
<i>RsaI</i> variante A		
Tampão	1X	2,5 μ L
MgCl ₂ (50mM)	1,5 mM	1,5 μ L
dNTPs	1,25 mM de cada	1 μ L de cada = 4 μ L
Taq polimerase 5 U/ μ L	2,5 U/ μ L	0,2 μ L
Primer Fw	20 pMol	0,5 μ L
Primer Rev controle	20 pMol	0,5 μ L
Primer Rev A	20 pMol	0,5 μ L
H ₂ O Mili Q	---	13,3 μ L
DNA amostra	200 ng/ μ L	2 μ L
Volume final		25 μL
<i>RsaI</i> variante G		
Tampão	1X	2,5 μ L
MgCl ₂ (50mM)	1,5 mM	1,5 μ L
dNTPs	1,25 mM de cada	1 μ L de cada = 4 μ L
Taq polimerase 5 U/ μ L	2,5 U/ μ L	0,2 μ L
Primer Fw	20 pMol	0,5 μ L
Primer Rev controle	20 pMol	0,5 μ L
Primer Rev G	20 pMol	0,5 μ L
H ₂ O Mili Q	---	13,3 μ L
DNA amostra	200 ng/ μ L	2 μ L
Volume final		25 μL

Tabela III: Protocolo de Termociclagem para amplificação dos *primers*.

	Temperatura (°C)	Tempo (minutos)	Ciclos
Desnaturação	96°C	3	1
Amplificação cíclica	96°C	1	35
	58°C	30 segundos	
	72°C	3	
Extensão final	72°C	7	1
Armazenamento	4°C		

5- RESULTADOS

A média de idade observada nos pacientes alterados segundo o laudo de espermograma é 35,11 (DP \pm 7,81), próxima à média obtida dos pacientes normais quanto ao espermograma que é 33,71 (DP \pm 9,9). Utilizando o teste U Mann Whitney, teste de normalidade de variáveis, o valor *P* é maior que 0,05 indicando que a diferença das idades entre os grupos não é estatisticamente significativa, comprovando assim a homogeneidade entre as idades dos grupos de pacientes alterados e normais segundo espermograma (Tabela IV).

Tabela IV: Comparação das idades dos pacientes normais e alterados quanto ao espermograma.

Grupo	N	Idade Média	DP	<i>P</i> ^a
Normais	126	33,71	9,9	0,087
Alterados	161	35,11	7,81	

^a Valor *P* do Teste U Mann Whitney.

As frequências fenotípicas, segundo o laudo do espermograma, observadas dentre os pacientes normais foram de 43,9% (126/287) e no grupo de pacientes com alteração no laudo foram 56,1% (161/287). Sendo que 15,3% (44/287) dos pacientes alterados são azoospermicos, 15% (43/287) são oligozoospermicos, 10,1% (29/287) apresentaram astenozoospermia e 15,7% (45/287) apresentaram teratozoospermia (Tabela V).

As frequências genotípicas do gene receptor β de estrógeno (RE β) nos pacientes normais para o espermograma foram 2,38% (3/126) do genótipo AG e 97,62% (123/126) do genótipo GG. Nos pacientes com alterações no espermograma, 9,94% (16/161) são do genótipo AG e 90,06% (145/161) são do genótipo GG.

Tabela V: Distribuição fenotípica dos pacientes estudados baseado no laudo do espermograma.

Laudo do Espermograma	N (%)
Normal	126 (43,9)
Alterados	161 (56,1)
Azoospermia	44 (15,3)
Oligozoospermia	43 (15,0)
Astenozoospermia	29 (10,1)
Teratozoospermia	45 (15,7)
Total	287 (100%)

Não foi encontrado genótipo AA em nenhum dos grupos estudados. Houve a constatação que a frequência do genótipo heterozigoto do polimorfismo *RsaI* AG nos pacientes alterados é cerca de quatro vezes maior do que no grupo com espermograma normal, sendo $P = 0,01$ (Tabela VI).

Tabela VI: Distribuição dos genótipos AA, AG e GG do polimorfismo *RsaI* entre os pacientes normais e alterados segundo espermograma.

Diagnóstico	<i>RsaI</i>						P^a
	AA		AG		GG		
	N	%	N	%	N	%	
Normal (n = 126)	0	0	3	2,38	123	97,62	0,01
Alterado (n = 161)	0	0	16	9,94	145	90,06	

^a Valor P do Teste Exato de Fisher. Genótipo polimórfico AG versus genótipo GG dos pacientes com alteração, comparado com os normais.

Foram analisadas as frequências genotípicas do gene *RE β* para cada tipo de alteração encontrada no espermograma (Tabela VII). Nos azoospermicos (44) foi

constatado 11,36% (5/44) com genótipo AG e 88,64% (39/44) com genótipo GG. No grupo dos pacientes oligozoospermicos (43) foi constatado 6,98% (3/43) com genótipo AG e 93,02% (40/43) com genótipo GG. No grupo com astenozoospermia 100% (29) têm o genótipo GG. Nos pacientes com teratozoospermia (45) foi constatado que 17,79% (8/45) têm genótipo AG e 82,21% (37/45) têm genótipo GG. O genótipo AA para o polimorfismo *RsaI* do gene receptor β de estrógeno ($RE\beta$) não foi encontrado em nenhum dos pacientes estudados (Tabela VII).

Tabela VII: Distribuição dos genótipos AA, AG e GG do polimorfismo *RsaI* entre os pacientes normais e entre cada tipo de alteração encontrada no espermograma.

Diagnóstico	<i>RsaI</i>			<i>P</i> ^a
	AA (%)	AG (%)	GG (%)	
Normal (n = 126)	0 (0)	3 (2,38)	123 (97,62)	
Azoospermia (n = 44)	0 (0)	5 (11,36)	39 (88,64)	0,020
Oligozoospermia (n = 43)	0 (0)	3 (6,98)	40 (93,02)	0,330
Alterados				
Astenozoospermia (n = 29)	0 (0)	0 (0)	29 (100)	1,000
Teratozoospermia (n = 45)	0 (0)	8 (17,79)	37 (82,21)	0,001

^a Valor *P* do Teste Exato de Fisher. Genótipo polimórfico AG versus genótipo GG dos pacientes com alteração, comparado com os normais.

Houve significância estatística ($P < 0,05$), pelo teste de Exato de Fisher, para os grupos dos azoospermicos, sendo $P = 0,020$. A frequência do genótipo polimórfico AG do gene β receptor de estrógeno ($RE\beta$) nos pacientes com azoospermia é aproximadamente cinco vezes maior do que no grupo normal. A frequência do genótipo AG nos pacientes com teratozoospermia é aproximadamente 7,5 vezes maior do que no grupo normal, sendo significante estatisticamente já que $P = 0,001$. Não houve significância estatística para os

astenozoospermicos ($P = 1,000$), já que em nenhum dos pacientes deste grupo foi encontrado o genótipo polimórfico AG. Nos oligozoospermicos a frequência do genótipo AG é aproximadamente três vezes maior que a frequência do genótipo AG do grupo normal, entretanto não tem significância estatística, sendo $P = 0,330$ (Figura 6, Tabela VII).

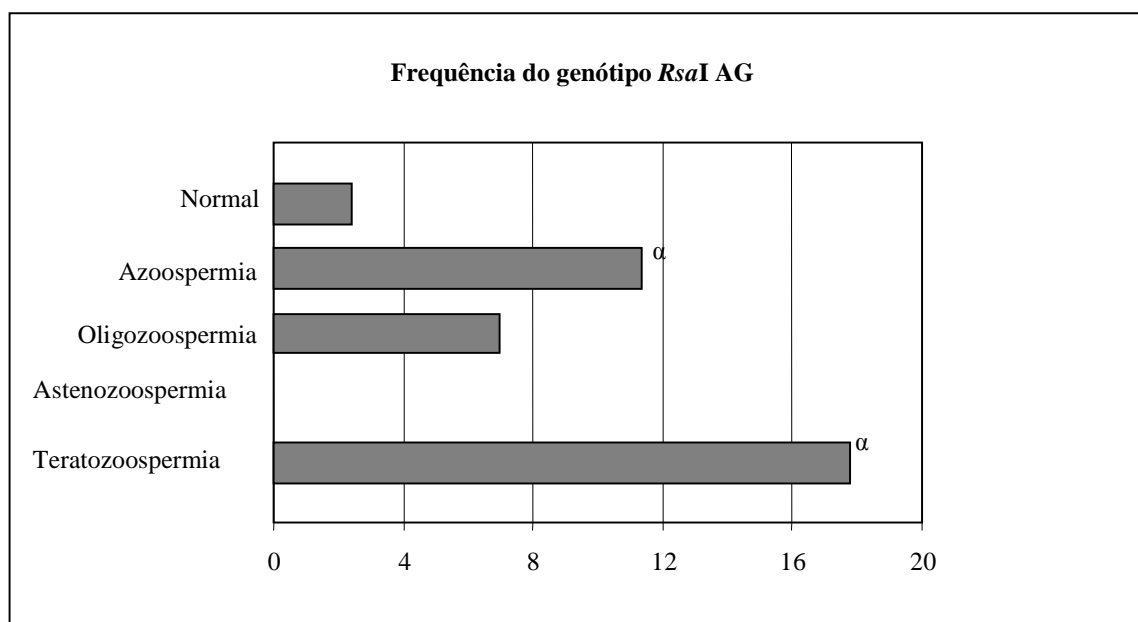


Figura 6: Frequência do genótipo *RsaI* AG. Proporção do *RsaI* AG nos diferentes grupos. ^α Grupo com diferença estatística significativa comparada ao grupo normal.

Dos 287 pacientes cujas amostras foram estudadas 74,6% (214/287) responderam ao questionário sobre hábitos de fumar, ingerir bebida alcoólica, contato com xenobióticos e também histórico de ter tido caxumba, feito no ato da coleta, sendo 40% (85/214) com espermograma normal e 60% (129/214) com espermograma alterado. Foi feita uma correlação entre o laudo do espermograma e os itens do questionário (Tabela VIII).

Dentre os pacientes que apresentaram espermograma normal, 18,8% (16/85) fumam e 81,2% (69/85) não praticam este hábito. Dentre os pacientes com alteração espermática 16,3% (21/129) praticam ou praticaram o hábito de fumar e 83,7% (108/129) nunca fumaram. A diferença das frequências de fumantes, entre normais e com alteração no espermograma, não é estatisticamente significativa, sendo $P = 0,766$.

Tabela VIII: Comparação entre o laudo do espermograma com hábitos de fumar e ingerir bebida alcoólica, caxumba e contato com xenobióticos.

Grupos	Normal		Alterados		P^{α}
	N	%	N	%	
Fuma					
Sim	16	18,8	21	16,3	0,766
Não	69	81,2	108	83,7	
Total	85		129		
Bebe					
Sim	41	48,3	59	45,7	0,827
Não	44	51,7	70	54,3	
Total	85		129		
Caxumba					
Sim	46	54,1	59	45,7	0,289
Não	39	45,9	70	54,3	
Total	85		129		
Xenobióticos					
Sim	30	35,3	42	32,6	0,789
Não	55	64,7	87	67,4	
Total	85		129		

^α Valor P do Teste Qui-Quadrado. Pacientes com espermograma normal versus pacientes com espermograma alterado que responderam 'Sim', comparado com os pacientes que responderam 'Não', para cada uma das variáveis.

Dentre os pacientes normais, segundo laudo do espermograma, 48,3% (41/85) ingerem bebida alcoólica e 51,7% (44/85) não ingerem. E aqueles com alteração no espermograma 45,7% (59/129) bebem e 54,3% (70/129) não bebem. Sendo o valor $P = 0,827$ a diferença das frequências de pacientes que ingerem bebida alcoólica, entre normais e com alteração no espermograma, não é estatisticamente significativa neste estudo.

Quanto a ter sido acometido por caxumba, 54,1% (46/85) dos pacientes normais quanto ao espermograma tiveram a doença e 45,9% (39/85) não tiveram. Já com os pacientes alterados quanto ao espermograma, 45,7% (59/129) tiveram a doença e 54,3% (70/129) não tiveram caxumba. Neste estudo não há significância estatística na diferença entre as frequências de pacientes que já tiveram a doença no grupo com alteração espermática comparado com o grupo dos normais segundo espermograma, sendo $P = 0,289$.

Dentre os pacientes com espermograma normal, 35,3% (30/85) tiveram contato com xenobióticos e 64,7% (55/85) não tiveram. No grupo dos pacientes com teste espermático alterado, 32,6% (42/129) tiveram contato com xenobióticos e 67,4% (87/129) não tiveram. Sendo o valor $P = 0,767$, a diferença das frequências de pacientes que tiveram contato com xenobióticos, entre normais e com alteração no espermograma, não é estatisticamente significativa neste estudo.

A correlação entre os genótipos do polimorfismo *RsaI* encontrados nas amostras de DNA analisadas (AG e GG) com o hábito de fumar, ingerir bebida alcoólica, ter contato com xenobióticos e com o fato de já ter sido acometido por caxumba está demonstrada na Tabela IX.

Dentre os pacientes fumantes, 13,5% (5/37) são do genótipo AG e 86,5% (32/37) apresentaram genótipo GG. Dentre os pacientes não fumantes 5,1% (9/177) são do genótipo AG e 94,9% (168/177) são GG. A frequência do genótipo AG do polimorfismo *RsaI* é aproximadamente duas vezes maior em fumantes comparada com a frequência em não fumantes. Mas essa diferença não tem significância estatística, sendo $P = 0,136$.

Tabela IX: Correlação dos genótipos do polimorfismo *RsaI* AG e GG do gene *REβ* com o hábito de fumar, ingerir bebida alcoólica, caxumba e xenobióticos.

Variáveis / Genótipos	AG	GG	P^a
-----------------------	----	----	-------

	N	%	N	%	
Fuma					
Sim (n = 37)	5	13,5	32	86,5	0,136
Não (n = 177)	9	5,1	168	94,9	
Bebe					
Sim (n = 100)	6	6	94	94	0,790
Não (n = 114)	8	7	106	93	
Caxumba					
Sim (n = 105)	7	6,7	98	93,3	1,000
Não (n = 109)	7	6,4	102	93,6	
Xenobióticos					
Sim (n = 72)	6	8,3	66	91,7	0,559
Não (n = 142)	8	5,6	134	94,4	

^a Valor *P* do Teste Exato de Fisher. Genótipo polimórfico AG versus genótipo tipo selvagem GG dos pacientes que responderam ‘Sim’, comparado com os pacientes que responderam ‘Não’, para cada uma das variáveis.

No grupo de pacientes que ingerem bebida alcoólica, 6% (6/100) são do genótipo AG para o polimorfismo estudado e 94% (94/100) são do genótipo GG. Dentre os pacientes que não bebem 7% (8/114) são AG e 93% (106/114) são GG quanto ao genótipo. As frequências do genótipo AG são aproximadamente iguais entre aqueles que bebem e aqueles que não bebem, sendo $P = 0,790$, não havendo diferença estatisticamente significativa na relação entre os genótipos do polimorfismo *RsaI* e o hábito de ingerir bebida alcoólica nos pacientes estudados.

Dentre os pacientes analisados que tiveram caxumba, 6,7% (7/105) apresentam genótipo AG e 93,3% (98/105) apresentaram genótipo GG. Quanto aos pacientes que não

tiveram a doença, 6,4% (7/109) são AG e 93,6 (102/109) são GG quanto ao genótipo. As frequências do genótipo AG são aproximadamente iguais entre aqueles que tiveram caxumba comparada com aqueles que não tiveram a doença, por isso $P = 1,000$, não havendo diferença estatisticamente significativa na relação entre os genótipos do polimorfismo *RsaI* e a doença nos pacientes cujas amostras de DNA foram estudadas.

No grupo de pacientes que tiveram contato com xenobióticos, 8,3% (6/72) apresentaram genótipo AG e 91,7% (66/72) apresentaram GG. Já no grupo de pacientes que não tiveram contato com xenobióticos, 5,6% (8/142) apresentaram genótipo AG e 94,4% (134/142) apresentaram genótipo GG. Não há diferença estatisticamente significativa entre os genótipos do polimorfismo *RsaI* na relação com o contato com xenobióticos nos pacientes cujas amostras de DNA foram estudadas, sendo $P = 0,559$.

A comparação das variáveis: hábito de fumar, ingerir bebida alcoólica, ter caxumba e contato com xenobiótico com os genótipos do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* encontrados no estudo para cada grupo classificado (normal ou alterado) segundo o laudo do espermograma foi realizada (Tabela X).

Dentre os pacientes fumantes com espermograma normal, 0% (0/16) tem o genótipo AG e 100% (16/16) apresentaram genótipo GG. Dentre os pacientes não fumantes com espermograma normal 1,5% (1/69) são do genótipo AG e 98,5% (68/69) são GG. As frequências do genótipo AG são relativamente próximas entre os fumantes e não fumantes, normais quanto ao espermograma, por isso $P = 1,000$. Não há, portanto significância estatística na diferença entre os genótipos do polimorfismo *RsaI* e o hábito de fumar nos pacientes com espermograma normal deste estudo.

Tabela X: Comparação das variáveis: hábito de fumar, ingerir bebida alcoólica, ter caxumba e contato com xenobiótico com os genótipos do polimorfismo *RsaI* GG e AG do gene *REβ* para cada grupo classificado (normal ou alterado) quanto ao laudo do espermograma.

Grupos / Variáveis	Fuma		Bebe		Caxumba		Xenobiótico		
	Sim (%)	Não (%)	Sim (%)	Não (%)	Sim (%)	Não (%)	Sim (%)	Não (%)	
Normal	GG	16 (100)	68 (98,5)	41 (100)	43 (97,7)	46 (100)	38 (97,4)	29 (96,7)	55 (100)
	AG	0 (0)	1 (1,5)	0 (0)	1 (2,3)	0 (0)	1 (2,6)	1 (3,3)	0 (0)
	Total	16	69	41	44	46	39	30	55
	<i>P</i> ^a	1,000		1,000		0,458		0,353	
Alterados	GG	16 (76,2)	100 (92,6)	53 (89,8)	63 (90)	52 (88,1)	64 (91,4)	37 (88)	79 (90,8)
	AG	5 (23,8)	8 (7,4)	6 (10,2)	7 (10)	7 (11,9)	6 (8,6)	5 (12)	8 (9,2)
	Total	21	108	59	70	59	70	42	87
	<i>P</i> ^a	0,038		0,784		0,570		0,756	

^a Valor *P* do Teste Exato de Fisher. Pacientes que responderam 'Sim' com polimórfico AG versus os pacientes que responderam 'Não' com polimórfico AG, comparado com os pacientes com genótipo polimórfico GG, para cada uma das variáveis.

No grupo de pacientes que ingerem bebida alcoólica com espermograma normal, 0% (0/41) é do genótipo AG para o polimorfismo estudado e 100% (41/41) são do genótipo GG. Dentre os pacientes que não bebem com espermograma normal, 2,3% (1/44) são AG e 97,7% (43/44) são GG quanto ao genótipo. Dentre os pacientes normais quanto ao espermograma, as freqüências do genótipo AG são relativamente próximas entre os que

bebem e os que não bebem, por isso $P = 1,000$. Não há, portanto diferença estatisticamente significativa entre os genótipos do polimorfismo *RsaI* e o hábito de ingerir bebida alcoólica nos pacientes com espermograma normal deste estudo.

Dentre os pacientes que tiveram caxumba com espermograma normal, 0% (0/46) apresentou genótipo AG e 100% (46/46) apresentaram genótipo GG. Quanto aos pacientes que não tiveram a doença, 1,6% (1/39) são AG e 97,4% (38/39) são GG quanto ao genótipo. A diferença entre as frequências do genótipo AG entre aqueles que tiveram caxumba comparada com aqueles que não tiveram a doença não é estatisticamente significativa nos pacientes cujos espermogramas são normais neste estudo, sendo $P = 0,458$.

Dentre os pacientes normais quanto ao espermograma que tiveram contato com xenobióticos, 3,3% (1/30) apresentou genótipo AG e 96,7% (29/30) apresentaram genótipo GG. Quanto aos pacientes que não tiveram contato com xenobióticos, 0% (0/55) é AG e 100% (55/55) são GG quanto ao genótipo. A diferença entre as frequências do genótipo AG entre aqueles que tiveram e não tiveram contato com xenobióticos não tem significância estatística, nos pacientes cujos espermogramas são normais, neste estudo, sendo $P = 0,353$.

Dentre os pacientes fumantes com espermograma alterado, 23,8% (5/21) tem o genótipo AG e 76,2% (16/21) apresentaram genótipo GG. Dentre os pacientes não fumantes com espermograma alterado 7,4% (8/108) são do genótipo AG e 92,6% (100/108) são do genótipo GG. A frequência do genótipo AG do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* nos fumantes com espermograma alterado é três vezes maior que nos não fumantes com espermograma alterado. Esta diferença é estatisticamente significativa, sendo $P = 0,038$.

No grupo de pacientes que ingerem bebida alcoólica com espermograma alterado, 10,2% (6/59) são do genótipo AG e 89,8% (53/59) são do genótipo GG. Dentre os pacientes que não bebem com espermograma alterado, 10% (7/70) são AG e 90% (63/70)

são GG quanto ao genótipo. As frequências do genótipo AG são relativamente próximas entre os que bebem e os que não bebem, alterados quanto ao espermograma, sendo $P = 0,784$. Não há, portanto significância estatística na diferença entre os genótipos do polimorfismo *RsaI* no hábito de ingerir bebida alcoólica nos pacientes com espermograma alterado deste estudo.

Dentre os pacientes que tiveram caxumba com espermograma alterado, 11,9% (7/59) apresentou genótipo AG e 88,1% (52/59) apresentaram genótipo GG. Quanto aos pacientes que não tiveram a doença e com espermograma alterado, 8,6% (6/70) são AG e 91,4% (64/70) são GG quanto ao genótipo. A pequena diferença entre as frequências do genótipo AG entre aqueles que tiveram caxumba comparada com aqueles que não tiveram a doença não é estatisticamente significativa nos pacientes cujos espermogramas são alterados neste estudo, sendo $P = 0,570$.

Dentre os pacientes que tiveram contato com xenobióticos com alteração no espermograma, 12% (5/42) apresentaram genótipo AG e 88% (37/42) apresentaram genótipo GG. Quanto aos pacientes que não tiveram contato com xenobióticos, 9,2% (8/87) é AG e 90,8% (79/87) são GG quanto ao genótipo. A diferença entre as frequências do genótipo AG entre aqueles que tiveram e não tiveram contato com xenobióticos não tem significância estatística, nos pacientes cujos espermogramas são alterados neste estudo, sendo $P = 0,756$.

Foi realizada uma comparação das variáveis: hábito de fumar, ingerir bebida alcoólica, ter caxumba e contato com xenobióticos, com os genótipos do polimorfismo *RsaI* encontrados no estudo para cada uma das alterações segundo o laudo do espermograma (Tabela XI).

Tabela XI: Comparação das variáveis: hábito de fumar, ingerir bebida alcoólica, ter caxumba e contato com xenobiótico com os genótipos do polimorfismo *RsaI* (GG e AG) para cada alteração quanto ao laudo do espermograma.

Grupos / Variáveis	Fuma		Bebe		Caxumba		Xenobiótico		
	Sim (%)	Não (%)	Sim (%)	Não (%)	Sim (%)	Não (%)	Sim (%)	Não (%)	
Azoo	GG	1 (33,3)	27 (93,1)	8 (80)	20 (90,9)	11 (84,6)	17 (89,5)	5 (100)	23 (85,2)
	AG	2 (66,7)	2 (6,9)	2 (20)	2 (9,1)	2 (15,4)	2 (10,5)	0 (0)	4 (14,8)
	Total	3	29	10	22	13	19	5	27
	P^a	0,035		0,572		1,000		0,593	
Oligo	GG	6 (85,7)	23 (92)	15 (93,7)	14 (87,5)	12 (92,3)	17 (89,5)	10 (77)	19 (100)
	AG	1 (14,3)	2 (8)	1 (6,3)	2 (12,5)	1 (7,7)	2 (10,5)	3 (23)	0 (0)
	Total	7	25	16	16	13	19	13	19
	P^a	0,993		1,000		1,000		0,058	
Asteno	GG	3 (100)	21 (100)	10 (100)	14 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)	12 (100)
	AG	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
	Total	3	21	10	14	12	12	12	12
	P^a	1,000		1,000		1,000		1,000	
Terato	GG	6 (75)	29 (87,9)	20 (87)	15 (83,3)	17 (81)	18 (90)	10 (83,3)	25 (86,2)
	AG	2 (25)	4 (12,1)	3 (13)	3 (16,4)	4 (19)	2 (10)	2 (16,7)	4 (13,8)
	Total	8	33	23	18	21	20	12	29
	P^a	0,577		1,000		0,662		0,995	

Legenda: Azoo: azoospermia, Oligo: oligozoospermia, Asteno: astenozoospermia, Terato: teratozoospermia.
^a Valor P do teste Exato de Fisher.

No grupo dos pacientes fumantes com azoospermia, 66,7% (2/3) tem o genótipo AG e 33,3% (1/3) apresentaram genótipo GG. Dentre os pacientes não fumantes com

azoospermia, 6,9% (2/29) são do genótipo AG e 93,1% (27/29) são do genótipo GG. A frequência do genótipo AG do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* nos fumantes com azoospermia é aproximadamente 9,7 vezes maior que nos não fumantes com azoospermia. Esta diferença é estatisticamente significativa, sendo $P = 0,035$.

No grupo de pacientes que ingerem bebida alcoólica com azoospermia, 20% (2/10) são do genótipo AG e 80% (8/10) são do genótipo GG. Dentre os pacientes que não bebem com azoospermia, 9,1% (2/22) são AG e 90,9% (20/22) são GG quanto ao genótipo. A frequência do genótipo AG nos pacientes que bebem com azoospermia é aproximadamente duas vezes maior do que a frequência do genótipo AG dos pacientes que não bebem com azoospermia, mas essa diferença não é estatisticamente significativa, sendo $P = 0,572$.

Dentre os pacientes que tiveram caxumba com azoospermia, 15,4% (2/13) apresentou genótipo AG e 84,6% (11/13) apresentaram genótipo GG. Quanto aos pacientes que não tiveram a doença e com azoospermia, 10,5% (2/19) são AG e 89,5% (17/19) são GG quanto ao genótipo. A pequena diferença entre as frequências do genótipo AG nos pacientes que tiveram caxumba comparada com aqueles que não tiveram a doença não é significativa estatisticamente para os pacientes azoospermicos deste estudo, sendo $P = 1,000$.

Dentre os pacientes que tiveram contato com xenobióticos com azoospermia 0% (0/5) apresentou genótipo AG e 100% (5/5) apresentaram genótipo GG. Quanto aos pacientes que não tiveram contato com xenobióticos com azoospermia, 14,8% (4/27) é AG e 85,2% (23/27) são GG quanto ao genótipo. A diferença entre as frequências do genótipo AG entre aqueles azoospermicos que tiveram e não tiveram contato com xenobióticos não é estatisticamente significativa neste estudo, sendo $P = 0,593$.

Dentre os pacientes fumantes com oligozoospermia, 14,3% (1/7) tem o genótipo AG e 85,7% (6/7) apresentaram genótipo GG. Dentre os pacientes não fumantes com

oligozoospermia 8% (2/25) são do genótipo AG e 92% (23/25) são GG. A diferença entre as frequências do genótipo AG do polimorfismo *RsaI* nos fumantes e não fumantes, com oligozoospermia, não é significativa estatisticamente nos pacientes deste estudo, sendo $P = 0,993$.

No grupo de pacientes que ingerem bebida alcoólica com oligozoospermia, 6,3% (1/16) são do genótipo AG para o polimorfismo estudado e 93,7% (15/16) são do genótipo GG. Dentre os pacientes que não bebem com oligozoospermia, 12,5% (2/16) são AG e 87,5% (14/16) são GG quanto ao genótipo. A diferença entre as frequências do genótipo AG do polimorfismo *RsaI* no pacientes com oligozoospermia que bebem e não bebem não é estatisticamente significativa, sendo $P = 1,000$.

Dentre os pacientes que tiveram caxumba com oligozoospermia, 7,7% (1/13) apresentou genótipo AG e 92,3% (12/13) apresentaram genótipo GG. Quanto aos pacientes que não tiveram a doença e com oligozoospermia, 10,5% (2/19) são AG e 89,5% (17/19) são GG quanto ao genótipo. A pequena diferença nas frequências do genótipo AG e GG do polimorfismo *RsaI* entre os pacientes que tiveram caxumba comparada com aqueles que não tiveram a doença não é estatisticamente significativa nos pacientes oligozoospermicos, sendo $P = 1,000$.

Dentre os pacientes que tiveram contato com xenobióticos com oligozoospermia 23% (3/13) apresentou genótipo AG e 77% (10/13) apresentaram genótipo GG. Quanto aos pacientes que não tiveram contato com xenobióticos com oligozoospermia, 0% (0/19) é AG e 100% (19/19) são GG quanto ao genótipo. A frequência do genótipo AG do polimorfismo *RsaI* nos pacientes oligozoospermicos que tiveram contato com xenobióticos é vinte e três vezes maior que a frequência de AG nos pacientes oligozoospermicos que não tiveram contato com xenobióticos. Apesar de existir uma grande diferença entre as frequências do genótipo AG, esta diferença não é estatisticamente significante, sendo $P = 0,058$.

Todos os pacientes astenozoospermicos são GG quanto ao genótipo, assim sendo nenhum paciente com esta alteração é do genótipo AG, por isso as frequências genótípicas AG e GG para cada uma das variáveis serão sempre iguais, 0% e 100% respectivamente e o valor de P será sempre 1,000. Portanto não haverá diferença estatística nas frequências dos genótipos do polimorfismo *RsaI* nos pacientes astenozoospermicos estudados.

Dentre os pacientes fumantes com teratozoospermia, 25% (2/8) tem o genótipo AG e 75% (6/8) apresentaram genótipo GG. Dentre os pacientes não fumantes com teratozoospermia 12,1% (4/33) são do genótipo AG e 87,9% (29/33) são do genótipo GG. A frequência do genótipo AG nos teratozoospermicos fumantes é aproximadamente duas vezes maior que nos não fumantes. A diferença entre essas frequências do genótipo AG do polimorfismo *RsaI* nos fumantes e não fumantes, com teratozoospermia, não é estatisticamente significativa nos pacientes deste estudo, sendo $P = 0,577$.

No grupo de pacientes que ingerem bebida alcoólica com teratozoospermia, 13% (3/23) são do genótipo AG para o polimorfismo estudado e 87% (20/23) são do genótipo GG. Dentre os pacientes que não bebem com teratozoospermia, 16,4% (3/18) são AG e 83,3% (15/18) são GG quanto ao genótipo. A diferença entre as frequências do genótipo AG do polimorfismo *RsaI* no pacientes com teratozoospermia que bebem e não bebem não é estatisticamente significativa, sendo $P = 1,000$.

Dentre os pacientes que tiveram caxumba com teratozoospermia, 19% (4/21) apresentou genótipo AG e 81% (17/21) apresentaram genótipo GG. Quanto aos pacientes que não tiveram a doença e com teratozoospermia, 10% (2/20) são AG e 90% (18/20) são GG quanto ao genótipo. A diferença nas frequências do genótipo AG e GG do polimorfismo *RsaI* entre os pacientes que tiveram caxumba comparada com aqueles que não tiveram a doença não é estatisticamente significativa nos pacientes teratozoospermia, sendo $P = 0,662$.

Dentre os pacientes que tiveram contato com xenobióticos com teratozoospermia 16,7% (2/12) apresentou genótipo AG e 83,3% (10/12) apresentaram genótipo GG. Quanto aos pacientes que não tiveram contato com xenobióticos com teratozoospermia, 13,8% (4/29) é AG e 86,2% (25/29) são GG quanto ao genótipo. A diferença entre as frequências do genótipo AG do polimorfismo *RsaI* nos teratozoospermicos que tiveram e não tiveram contato com xenobióticos não é estatisticamente significativa neste estudo, sendo $P = 0,995$.

6- DISCUSSÃO

Estudos atuais têm demonstrado que aproximadamente 20% dos casais, ou seja, um em cada cinco casais, apresenta problemas de infertilidade, dentre estes, 40% dos casos se devem a fatores masculinos (Santos & Ortega, 2000) e estão ligados à produção dos espermatozóides. Além das causas masculinas, a infertilidade pode ter causa feminina, ou uma combinação de ambos, ainda há casos onde não há causas aparentes para o problema. Alterações genéticas podem estar envolvidas em alguns casos, sobretudo, quando se refere à infertilidade idiopática. Em cerca de 40% dos casos de infertilidade masculina, a causa não chega a ser identificada (Ruiz, 1996).

O interesse no estudo das causas da infertilidade sempre foi grande, atualmente, porém, tem aumentado paralelamente ao desenvolvimento de novas tecnologias reprodutivas. O advento da fertilização *in vitro* e, principalmente, da injeção intracitoplasmática de espermatozóides têm permitido que homens com alto grau de infertilidade possam, finalmente, tornarem-se pais.

Nos últimos anos o conhecimento sobre a etiologia genética da infertilidade tem ampliado graças aos avanços de novas tecnologias reprodutivas, pois diferentes anormalidades genéticas têm sido identificadas, sendo que atualmente representam uma parte considerável na etiologia deste problema (Maegawa & Centa, 2000).

Apenas recentemente pesquisas identificaram genes envolvidos na regulação da espermatogênese. O conhecimento cada vez maior do genoma humano e dos genes que controlam a reprodução humana se tornam fundamentais no estudo da fertilidade (Lahn & Page, 1997). Pesquisas recentes mostram um crescente corpo de evidências sugerindo que o estrógeno deve ser adicionado à lista de hormônios envolvidos na regulação da espermatogênese, que é conhecida há muitos anos por ser regulada por FSH e andrógenos

(O'Donnell et al., 2001).

Aschim e colaboradores (2005) realizaram, pela primeira vez, estudo mostrando uma associação entre variantes genéticas do gene receptor- β de estrógeno ($RE\beta$) e infertilidade masculina, e constataram a frequência do genótipo AG do polimorfismo *RsaI* aumentada em homens inférteis, comparado com grupo controle.

Em nosso estudo verificamos que a frequência do genótipo *RsaI* AG do gene receptor- β de estrógeno ($RE\beta$) em homens com alteração espermática (azoospermia, oligozoospermia, astenozoospermia ou teratozoospermia) é cerca de quatro vezes maior que nos homens normais segundo o laudo do espermograma. Dentre as alterações espermáticas, foi constatado que a frequência do genótipo *RsaI* AG do gene $RE\beta$ é cerca de cinco vezes maior nos azoospérmicos, aproximadamente 7,5 vezes maior nos teratozoospérmicos e três vezes maior nos oligozoospérmicos comparados aos normais segundo laudo do espermograma. Sendo que nos oligozoospérmicos não houve significância estatística, que pode ser devido ao baixo poder estatístico resultante de pequenas amostras.

Estes dados estão em conformidade com a pesquisa feita por Aschim e colaboradores (2005), que relataram uma frequência do genótipo *RsaI* AG do gene $RE\beta$ três vezes maior em homens inférteis comparado com controles. No estudo de Aschim, os homens foram classificados, de acordo com o espermograma, observando apenas a alteração relativa ao número de espermatozóides, portanto não foi analisada a morfologia e a motilidade espermática. Neste estudo os homens foram classificados como inférteis por terem concentração espermática menor que 5 milhões/mL de ejaculado (oligozoospermia severa), e o grupo controle composto por aqueles com concentração espermática maior do que 5 milhões/mL de ejaculado, onde estariam também os oligospérmicos não severos com concentração espermática entre 5 e 20 milhões/mL de ejaculado.

Nossos achados estão em conformidade com a observação do aumento do risco de uma redução da qualidade do sêmen em homens expostos ao dietilestilbestrol, potente estrogênio, no útero (Gill et al., 1977). Além disso, estudos mostram que ocorre suspensão da espermatogênese quando os homens estão em terapia de estrogênio em longo prazo, antes de cirurgias de mudança de sexo (Schulze, 1988; Aschim et al., 2004), e portanto, parece plausível supor que uma maior exposição aos estrogênios dificulta a espermatogênese. Um outro papel direto de estrogênio na espermatogênese é indicado pela detecção de ER β em células de Sertoli no testículo humano, bem como as células germinais (Saunders et al., 2001).

Os mecanismos que envolvem a função alterada do gene RE β em indivíduos com genótipo AG do polimorfismo *RsaI* não são ainda elucidados. Uma mudança de G para A não leva a mudança de aminoácidos na proteína. Pode-se especular, no entanto, que esse polimorfismo está em desequilíbrio com outras variações genéticas que possam afetar sua expressão gênica ou função. Um estudo recente mostrou que o polimorfismo *RsaI* estava em desequilíbrio completo com um polimorfismo localizado pouco antes do éxon 8 do gene ER β (Forsti et al., 2003). Isto pode potencialmente afetar o *splicing* deste éxon, levando a formação de uma proteína com propriedades diferentes da proteína do tipo selvagem (Ogawa et al., 1998; Peng et al., 2003). O polimorfismo *RsaI* poderia também ter um efeito direto através da mudança da seqüência nucleotídica e, assim, levar a mudança na estrutura secundária do mRNA ER β , possivelmente levando a alterações na síntese de mRNA, *splicing*, maturação, transportes, tradução, ou degradação (Shen et al., 1999; Iida & Akashi, 2000).

No nosso estudo verificamos também que a freqüência do genótipo AG do polimorfismo *RsaI* do gene RE β nos fumantes com espermograma alterado é três vezes maior que a freqüência em não fumantes com espermograma alterado. Dentro dessas

alterações espermáticas, foi constatado que a frequência do genótipo *RsaI* AG do gene *REβ* é 9,7 vezes maior nos azoospémicos fumantes comparado com os azoospémicos não fumantes.

A exposição a drogas e toxinas ambientais pode alterar a espermatogênese diretamente ou através do sistema endócrino. Pesticidas, sulfasalazina, nitrofurantoína, cimetidina, cafeína, nicotina, álcool e maconha têm sido indicados como agentes gonadotóxicos (Lipshultz, 1980). Embora os resultados dos estudos clínicos, que tentaram correlacionar o hábito de fumar como causador de infertilidade masculina, sejam heterogêneos, já existe evidência cumulativa suficiente para estabelecer esta relação, sendo o tabagismo responsável por alterações da motilidade e morfologia espermática, como depressor da espermatogênese (Thompson, 1994), além de alterações nos níveis hormonais (Vine, 1996). Pasqualotto e colaboradores (2006), que relataram que o hábito de fumar pode alterar os níveis hormonais séricos de testosterona e estradiol bem como alteração no DNA dos espermatozóides.

Nossos estudo veio a contribuir com a escassa literatura referente à infertilidade masculina idiopática, por meio de um pioneirismo na análise do polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* em grupos de homens estratificados em grupos, de acordo com cada uma das alterações que podem ocorrer no laudo do espermograma separadamente. Pesquisas comparando o tabagismo com infertilidade também são por vezes controversas e escassas. Nosso estudo foi o primeiro a ser realizado associando o polimorfismo *RsaI* do gene *REβ* com tabagismo. Muito ainda a respeito da infertilidade masculina precisa ser estudado e elucidado, principalmente no entendimento dos mecanismos genéticos que regem a fisiologia masculina humana.

Atualmente, a maioria dos homens inférteis podem conceber com o advento de técnicas de reprodução assistida. Isto faz com que exames de detecção de

cromossomopatias e alterações genéticas se tornem fundamentais na investigação da infertilidade. Existem várias razões para que o rastreamento de homens inférteis seja feito como, por exemplo, o fato de que alguns distúrbios genéticos são incompatíveis com a fertilização, e também alterações genéticas implicam em um alto risco dos pais passarem a constituição genética alterada para os descendentes, tendo como conseqüências a infertilidade masculina ou anormalidades genéticas na prole. Este risco deve ser avaliado antes da tentativa de fertilização ser feita, porque a fertilização com um doador de sêmen pode ser uma alternativa melhor para muitos casais.

7- CONCLUSÃO

- A frequência do genótipo heterozigoto AG do polimorfismo *RsaI* do gene receptor- β de estrógeno ($RE\beta$) nos pacientes alterados, segundo espermograma, é cerca de quatro vezes maior do que no grupo normal.
- A frequência do genótipo heterozigoto AG do polimorfismo *RsaI* do gene $RE\beta$ nos pacientes com azoospermia é aproximadamente cinco vezes maior do que no grupo normal, segundo o laudo de espermograma.
- A frequência genótipo heterozigoto AG do polimorfismo *RsaI* do gene $RE\beta$ nos pacientes com teratozoospermia é aproximadamente 7,5 vezes maior do que no grupo normal, segundo o laudo de espermograma.
- A frequência do genótipo heterozigoto AG do polimorfismo *RsaI* do gene $RE\beta$ nos fumantes com espermograma alterado é três vezes maior que nos não fumantes com espermograma alterado.
- A frequência do genótipo heterozigoto AG do polimorfismo *RsaI* do gene $RE\beta$ nos fumantes com azoospermia é aproximadamente 9,7 vezes maior que nos não fumantes com azoospermia.

8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aitken RJ, Buchingham DW, Brindle J, Gomez E, Baker HW, Irvine DS. Analysis of sperm movement in relation to the oxidative stress created by leukocytes in washed sperm preparations and seminal plasma. *Hum Reprod.* 1995;10(8):2061-71.
2. Approbato MS, Moura KKVO, Barbosa EFMC, Gomide NC. Prevalência de infertilidade masculina e sua correlação com os fatores sócio-ambientais. In: *Anais 48º Congresso Brasileiro de Gineco-Obstetrícia, Goiânia-GO, 1999.*
3. Arai Y, Mori T, Suzuki Y, Bern HA. Long-term effects of perinatal exposure to sex steroids and diethylstilbestrol on the reproductive system of male mammals. *Int Rev Cytol.* 1983;84:235-65.
4. Aschim EL, Sæther T, Wiger R, Grotmol T, Haugen TB. Differential distribution of splice variants of estrogen receptor beta in human testicular cells suggests specific functions in spermatogenesis. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2004;92:97-106.
5. Aschim EL, Giwercman A, Ståhl O, Eberhard J, [Cwikel M](#), [Nordenskjöld A](#), et al. The RsaI Polymorphism in the Estrogen Receptor-Gene Is Associated with Male Infertility. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005;90(9):5343-8.
6. Bordin BM, Arruda JT, Miranda LCB, Moura KKVO. Alterações no espermograma e a associação com tabagismo e etilismo. In: *Anais 32º Congresso Brasileiro de Análises clínicas, Goiânia-GO, 2005.*
7. Bujan L, Mieusset R, Audran F, Lumbroso S, Sultan C. Increased oestradiol level in seminal plasma in infertile men. *Hum Reprod.* 1993;8(1):74-7.
8. Burrows H. Pathological conditions induced by oestrogenic compounds in the coagulating gland and prostate of the mouse. *Am J Cancer.* 1935;23:490-512.

9. Carreau S, Papadopoulos V, Drosowsky MA. Stimulation of adult rat Leydig cell aromatase activity by a Sertoli cell factor. *Endocrinology*. 1988;122(3):1103-9.
10. Carreau S, Genissel C, Bilinska B, Levallet J. Sources of oestrogen in the testis and reproductive tract of the male. *Int J Androl*. 1999;22(4):211-23.
11. Carreau S, Lambard S, Delalande C, Denis-Galeraud I, [Bilinska B](#), [Bourguiba S](#). Aromatase expression and role of estrogens in male gonad: a review. *Reprod Biol Endocrinol*. 2003;1:35.
12. Carreau S, Silandre D, Bourguiba S, Hamden K, [Said L](#), [Lambard S](#), et al. Estrogens and male reproduction: a new concept. *Braz J Med and Biol Res*. 2007;40(6):761-8.
13. Carson-Jurnica MA, Schrader WT, O'Malley BW. Steroid receptor superfamily: structure and functions. *Endocr Rev*. 1990;11(2):209-20.
14. Ciccodicola A, D'Esposito M, Esposito T, Gianfrancesco F, [Migliaccio C](#), [Miano MG](#), et al. Differentially regulated and evolved genes in the fully sequenced Xp/Yq pseudoautonomal region. *Hum Mol Genet*. 2000;9(3):395-401.
15. Clarke CL, Sutherland RL. Progesterin regulation of cellular proliferation. *Endocr Rev*. 1990;11(2): 266-301.
16. Claus R, Schopper D, Hoang-Vu C. Contribution of individual compartments of the genital tract to oestrogen and testosterone concentrations in ejaculates of the boar. *Acta Endocrinol (Copenh)*. 1985;109(2): 281-8.
17. Claus R, Dimmick MA, Gimenez T, Hudson LW. Estrogens and prostaglandin F(2)alpha in the semen and blood plasma of stallions. *Theriogenology*. 1992;38:687-93.
18. Clermont Y. Kinetics of spermatogenesis in mammals: seminiferous epithelium

cycle and spermatogonial renewal. *Physiol Rev.* 1972;52(1):198-236.

19. Cooke PS, Young P, Hess RA, Cunha GR. Estrogen receptor expression in developing epididymis, efferent ductules, and other male reproductive organs. *Endocrinology.* 1991;128(6):2874-9.

20. de Jong FH, Hey AH, van der Molen HJ. Effect of gonadotrophins on the secretion of oestradiol-17 β and testosterone by the rat testis. *J Endocrinol.* 1973;57:277-84.

21. Dierich A, Sairam MR, Monaco L, Fimia GM, [Gansmuller A](#), [LeMeur M](#), [Sassone-Corsi P](#). Impairing follicle-stimulating hormone (FSH) signaling in vivo: targeted disruption of the FSH receptor leads to aberrant gametogenesis and hormonal imbalance. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1998;95(23):13612-7.

22. Dohler KD, Wuttke W. Changes with age in levels of serum gonadotropins, prolactin and gonadal steroids in prepubertal male and female rats. *Endocrinology.* 1975;97(4):898-907.

23. Dorrington JM, Fritz IB, Armstrong DT. Control of testicular estrogen synthesis. *Biol Reprod.* 1978;18:55-64.

24. Dupont S, Krust A, Gansmuller A, Dierich A, [Chambon P](#), [Mark M](#). Effect of single and compound knockouts of estrogen receptors α (ER α) and β (ER β) on mouse reproductive phenotypes. *Development.* 2000;127(19):4277-91.

25. Eddy EM, Washburn TF, Bunch DO, Goulding EH, [Gladden BC](#), [Lubahn DB](#) et al. Targeted disruption of the estrogen receptor gene in male mice causes alteration of spermatogenesis and infertility. *Endocrinology.* 1996;137(11):4796-805.

26. Eiler H, Graves CN. Oestrogen content of semen and the effect of exogenous oestradiol-17beta on the oestrogen and androgen concentration in semen and blood plasma of bulls. *J Reprod Fert.* 1977;50:17-21.

27. Enmark E, Peltö-Huikko M, Grandien K, Lagercrantz S, [Lagercrantz J](#), [Fried G](#), et al. Human estrogen receptor β gene structure, chromosomal localization, and expression pattern. *J Clin Endocrinol Metab.* 1997;82:4258-65.
28. Fisher JS, Millar MR, Majdic G, Saunders PT, [Fraser HM](#), [Sharpe RM](#). Immunolocalisation of oestrogen receptor-alpha within the testis and excurrent ducts of the rat and marmoset monkey from perinatal life to adulthood. *J Endocrinol.* 1997;153(3):485-95.
29. Forsti A, Zhao C, Israelsson E, Dahlman-Wright K, Gustafsson JÅ, Hemminki K. Polymorphisms in the estrogen receptor beta gene and risk of breast cancer: no association. *Breast Cancer Res Treat.* 2003;79:409-413.
30. [França LR](#), [Ogawa T](#), [Avarbock MR](#), [Brinster RL](#), [Russell LD](#). Germ cell genotype controls cell cycle during spermatogenesis in the rat. *Biol Reprod.* 1998;59(6):1371-7.
31. Ganjam VK, Amann RP. Steroids in fluids and sperm entering and leaving the bovine epididymis, epididymal tissue, and accessory sex gland secretions. *Endocrinology.* 1976;99(6):1618-30.
32. Gill WB, Schumacher GF, Bibbo M. Pathological semen and anatomical abnormalities of the genital tract in human male subjects exposed to diethylstilbestrol *in utero*. *J Urol.* 1977;117:477-480.
33. [Goyal HO](#), [Bartol FF](#), [Wiley AA](#), [Khalil MK](#), [Chiu J](#), [Vig MM](#). Immunolocalization of androgen receptor and estrogen receptor in the developing testis and excurrent ducts of goats. *Anat Rec.* 1997;249(1):54-62.
34. [Greco TL](#), [Duello TM](#), [Gorski J](#). Estrogen receptors, estradiol, and diethylstilbestrol in early development: the mouse as a model for the study of estrogen

receptors and estrogen sensitivity in embryonic development of male and female reproductive tracts. *Endocr Rev.* 1993;14(1):59-71.

35. Green S, Chambon P. Oestradiol induction of a glucocorticoid-responsive gene by a chimaeric receptor. *Nature.* 1987;325(6099):75-78.

36. Gronemeyer H. Transcription activation by estrogen and progesterone receptors. *Annu Reviews Genet.* 1991;25:89-123.

37. Hess RA, Bunick D, Bahr J. Oestrogen, its receptors and function in the male reproductive tract - a review. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;178:29-38.

38. Hess RA, Bunick D, Bahr JM. Sperm, a source of estrogen. *Environ Health Perspect.* 1995;7:59-62.

39. Hess RA, Bunick D, Lee KH, Bahr J, Taylor JA, Korach KS et al. A role for oestrogens in the male reproductive system. *Nature.* 1997a;390(6659):509-12.

40. [Hess RA](#), [Gist DH](#), [Bunick D](#), [Lubahn DB](#), [Farrell A](#), [Bahr J](#), et al. Estrogen receptor (alpha and beta) expression in the excurrent ducts of the adult male rat reproductive tract. *J Androl.* 1997b;18(6):602-11.

41. Hess RA, Nakai M. Histopathology of the male reproductive system induced by the fungicide benomyl. *Histol Histopathol.* 2000;15(1):207-24.

42. Hess RA. Estrogen in the adult male reproductive tract: A review. *Reprod Biol Endocrinol.* 2003;9:52.

43. Iguchi T, Uesugi Y, Sato T, Ohta Y, Takasugi N. Developmental pattern of estrogen receptor expression in male mouse genital organs. *Mol Androl.* 1991;6:109-19.

44. Iida K, Akashi H. A test of translational selection at 'silent' sites in the human genome: base composition comparisons in alternatively spliced genes. *Gene.* 2000;261:93-

105.

45. Janulis L, Bahr JM, Hess RA, Bunick D P450 aromatase messenger ribonucleic acid expression in male rat germ cells: detection by reverse transcription polymerase chain reaction amplification. *J Androl.* 1996;17(6):651-8.

46. Janulis L, Bahr JM, Hess RA, Janssen S, Osawa Y, Bunick D. Rat testicular germ cells and epididymal sperm contain active P450 aromatase. *J Androl.* 1998;19(1):65-71.

47. Junqueira LC, Carneiro J. *Biologia celular e molecular.* 6th edition. Editora Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, 109-214 pp. 1997

48. Kotula-Balak M, Slomczynska M, Fraczek B, Bourguiba S, Tabarowski Z, Carreau S, et al. Complementary approaches demonstrate that cellular aromatization in the bank vole testis is related to photoperiod. *Eur J Histochem.* 2003;47(1):55-62.

49. [Krausz C](#), [Rajpert-De Meyts E](#), [Frydelund-Larsen L](#), [Quintana-Murci L](#), [McElreavey K](#) et al. Double-blind Y chromosome microdeletion analysis in men with known sperm parameters and reproductive hormone profiles: microdeletions are specific for spermatogenic failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;82(6):2638-42.

50. Krishnamurthy H, Danilovich N, Morales CR, Sairam MR. Qualitative and quantitative decline in spermatogenesis of the follicle- stimulating hormone receptor knockout (FORKO) mouse. *Biol Reprod,* 2000;62(5):1146-59.

51. Kucheria K, Jobanputra V, Talwar R, Ahmad ME, Dada R, Sivakumaran TA. Human molecular cytogenetics: diagnosis, prognosis, and disease management. *Teratog Carcinog Mutagen Suppl.* 2003;1:225-33.

52. Kuiper GG, Enmark E, Peltö-Huikko M, Nilsson S and Gustafsson JA. Cloning of a novel receptor expressed in rat prostate and ovary. *Proc Natl Acad Sci U S A.*

1996;93(12):5925-30.

53. Kumar V, Green S, Stack G, Berry M, Jin J, Chambon P. Functional domains of the human estrogen receptor. *Cell*. 1987;51(6):941-51.

54. [Kumar V](#), [Chambon P](#). The estrogen receptor binds tightly to its responsive element as a ligand-induced homodimer. *Cell*. 1988;55(1):145-56.

55. Kumar TR, Wang Y, Lu N, Matzuk MM. Follicle stimulating hormone is required for ovarian follicle maturation but not male fertility. *Nat Genet*. 1997;15(2):201-4.

56. Kumari GL, Allag IS, Das RP, Datta JK. () Regional differences in steroidogenesis and hormone levels in the epididymis and vas deferens of adult rats. *Int J Androl*. 1980;3(3):267-81.

57. Kwon S, Hess RA, Bunick D, Nitta H, Janulis L, Osawa Y et al. Rooster testicular germ cells and epididymal sperm contain P450 aromatase. *Biol Reprod*. 1995;53(6):1259-64.

58. Lahn BT, Page D. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science*. 1997;278(5338):675-80.

59. Lambard S, Galeraud-Denis I, Bouraima H, Bourguiba S, Chocat A, Carreau S. Expression of aromatase in human ejaculated spermatozoa: a putative marker of motility. *Mol Hum Reprod*. 2003;9(3):117-24.

60. Lee KH, Hess RA, Bahr JM, Lubahn DB, Taylor J, Bunick D. Estrogen receptor alpha has a functional role in the mouse rete testis and efferent ductules. *Biol Reprod*. 2000;63(3):1873-80.

61. Lee KH, Finnigan-Bunick C, Bahr J, Bunick D. Estrogen Regulation of Ion Transporter Messenger RNA Levels in Mouse Efferent Ductules Are Mediated

Differentially Through Estrogen Receptor (ER) alpha and ER beta. *Biol Reprod.* 2001;65(5):1534-41.

62. Levallet J, Carreau S. In vitro gene expression of aromatase in rat testicular cells. *C R Acad Sci III.* 1997;320(2):123-9.

63. Levallet J, Bilinska B, Mittre H, Genissel C, Fresnel J, Carreau S. Expression and immunolocalization of functional cytochrome P450 aromatase in mature rat testicular cells. *Biol Reprod.* 1998;58(4):919-26.

64. Levin ER. Cellular functions of plasma membrane estrogen receptors. *Steroids.* 2002;67(6):471-5.

65. Lipshultz LI, Ross CE, Wharton D, Milby T, Smith R, Joyner RE. Dibromochloropropano and its effect on testicular function in men. *J Urol.* 1980;124:464-8.

66. Lubahn DB, Moyer JS, Golding TS, Couse JF, Korach KS, Smithies O. Alteration of reproductive function but not prenatal sexual development after insertional disruption of the mouse estrogen receptor gene. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1993;90(23):11162-6.

67. Maegawa GHB, Centa LJR. Aspectos genéticos do fator masculino na infertilidade. *Fam. Saúde Desenv.* 2000;2(1):7-12.

68. [Mangelsdorf DJ](#), [Thummel C](#), [Beato M](#), [Herrlich P](#), [Schütz G](#), [Umesono K](#), et al. The nuclear receptor superfamily: the second decade. *Cell.* 1995;83(6):835-9.

69. [McElreavey K](#), [Cortes LS](#). X-Y translocations and Sex differentiations. *Semin Reprod Med.* 2001;19(2):133-9.

70. McLachlan JA. Transplacental effects of diethylstilbestrol in mice. *Natl Cancer Inst Monogr.* 1979;51:67-72.

71. McLachlan JA, Newbold RR, Bullock B. Reproductive tract lesions in male mice exposed prenatally to diethylstilbestrol. *Science*. 1975;190(4218):991-2.
72. McLachlan RI, Wreford NG, O'Donnell L, De Kretser DM, Robertson DM. The endocrine regulation of spermatogenesis: independent roles for testosterone and FSH. *J Endocrinol*. 1996;148(1):1-9.
73. Melnyk PM, Sanford LM, Robaire B. Moderate increases in peripheral blood estradiol concentration in the adult ram do not directly inhibit testosterone secretion. *Can J Physiol Pharmacol*. 1992;70(10):1384-91.
74. Montano MM, Muller V, Trobaugh A, Katzenellenbogen BS. The carboxy-terminal F domain of the human estrogen receptor: role in the transcription activity of the receptor and the effectiveness of antiestrogens as estrogen antagonists. *Mol Endocrinol*. 1995;9(7):814-25.
75. Moore JT, McKee DD, Slentz-Kesler K, Moore LB, Jones SA, Horne EL, et al. Cloning and characterization of human estrogen receptor β isoforms. *Biochem Biophys Res Commun*. 1998;247(1):75-8.
76. Mosselman S, Polman J, Dijkema R. ER beta: identification and characterization of a novel human estrogen receptor. *FEBS Lett*. 1996;392(1):49-53.
77. Nakai M, Bouma J, Nie R, Zhou Q, Carnes K, Lubahn DB et al. Morphological analysis of endocytosis in efferent ductules of estrogen receptor-alpha knockout male mouse. *Anat Rec*. 2001;263(1):10-8.
78. Niederberger CS, Meacham RB. Male Infertility. *Rev Urol*. 2003;5(3):200-3.
79. [Nitta H](#), [Bunick D](#), [Hess RA](#), [Janulis L](#), [Newton SC](#), [Millette CF](#), et al. Germ cells of the mouse testis express P450 aromatase. *Endocrinology*. 1993;132(3):1396-1401.

80. [O'Donnell L](#), [Robertson KM](#), [Jones ME](#), [Simpson ER](#). Estrogen and Spermatogenesis. *Endocr Rev*. 2001;22(3):289-318.
81. Ogawa S, Inoue S, Watanabe T, Orimo A, Hosoi T, Ouchi Y, et al. Molecular cloning and characterization of human estrogen receptor β cx: a potential inhibitor of estrogen action in human. *Nucleic Acids Res*. 1998;26:3505-3512.
82. [Ogawa S](#), [Chan J](#), [Chester AE](#), [Gustafsson JA](#), [Korach KS](#), [Pfaff DW](#). Survival of reproductive behaviors in estrogen receptor beta gene-deficient (betaERKO) male and female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1999;96(22):12887-92.
83. [Oliveira CA](#), [Carnes K](#), [França LR](#), [Hess RA](#). Infertility and testicular atrophy in the antiestrogen-treated adult male rat. *Biol Reprod*. 2001;65(3):913-20.
84. [Oliveira CA](#), [Zhou Q](#), [Carnes K](#), [Nie R](#), [Kuehl DE](#), [Jackson GL](#), et al. ER function in the adult male rat: short- and long term effects of the antiestrogen ICI 182,780 on the testis and efferent ductules, without changes in Testosterone. *Endocrinology*. 2002;143(6):2399-409.
85. [Overpeck JG](#), [Colson SH](#), [Hohmann JR](#), [Applestone MS](#), [Reilly JF](#). Concentrations of circulating steroids in normal prepubertal and adult male and female humans, chimpanzees, rhesus monkeys, rats, mice, and hamsters: a literature survey. *J Toxicol Environ Health*. 1978;4(5-6):785-803.
86. Parvinen M. Regulation of the seminiferous epithelium. *Endocr Rev*. 1982;3(4):404-17.
87. [Pasqualotto FF](#), [Lucon AM](#), [Sobreiro BP](#), [Pasqualotto EB](#), [Arap S](#). Effects of medical therapy, alcohol, smoking and endocrine disruptors on male infertility. *Rev Hosp Clin Fac Med São Paulo*. 2004;59(6):375-82.
88. Pasqualotto FF, Sobreiro BP, Hallak J, Pasqualotto EB, Lucon AM. Cigarette

smoking is related to a decrease in semen volume in a population of fertile men. *BJU Int.* 2006;97(2):324-6.

89. Pavao M, Traish AM. Estrogen receptor antibodies: specificity and utility in detection, localization and analyses of estrogen receptor alpha and beta. *Steroids.* 2001;66(1):1-16.

90. Payne AH, Perkins LM, Georgiou M, Quinn PG. Intratesticular site of aromatase activity and possible function of testicular estradiol. *Steroids.* 1987;50(4-6):435-48.

91. Peng B, Lu B, Leygue E, Murphy LC. Putative functional characteristics of human estrogen receptor- β isoforms. *J Mol Endocrinol.* 2003;30:13-29.

92. Pernice F, Mazza G, Puglisi D, Luppino MG, Frisina N. Nonrobertsonian translocation t(6;11) is associated with infertility in an oligozoospermic male. *Fertil Steril.* 2002;78(1):192-4.

93. Pomerantz DK. Effects of in vivo gonadotropin treatment on estrogen levels in the testis of the immature rat. *Biol Reprod.* 1979;21(5):1247-55.

94. Queiroz EK, Waissmann W. Occupational exposure and effects on the male reproductive system. *Cad Saude Publica.* 2006;22(3):485-93.

95. Rago V, Bilinska B, Palma A, Ando S, Carpino A. Evidence of aromatase localization in cytoplasmic droplet of human immature ejaculated spermatozoa. *Folia Histochem Cytobiol.* 2003;41(1):23-7.

96. Rommerts FF, Brinkman AO. Modulation of steroidogenic activities in testis Leydig cells. *Mol Cell Endocrinol.* 1981;21(1):15-28.

97. Rommerts FF, de Jong FH, Brinkmann AO, van der Molen HJ. Development

and cellular localization of rat testicular aromatase activity. *J Reprod Fertil* 1982;65(2):281-8.

98. Rose BI, Scott B. Sperm motility, morphology, hyperactivation, and ionophore induced acrosome reactions after overnight incubation with mycoplasmas. *Fertil Steril*. 1994;61(2):341-8.

99. Ruiz, M A. Infertilidade Masculina. *Jornal A Tribuna*, Santos – SP, 1996.

100. Russell LD, Ettlín RA, Sinha-Hikim AP, Clegg ED. *Histological and Histopathological Evaluation of the Testis*. 1st edition. Cache River Press, Clearwater, pp 39-86, 1990.

101. Russell LD. Role in Spermiation. In: Russell LD, Griswold MD (eds) *The Sertoli Cell*. 1st edition. Cache River Press, Clearwater, pp 269-304, 1993.

102. Santos FR and Ortega M. Infertilidade Masculina. In: *Anais do Congresso Brasileiro de Genética, Águas de Lindóia – SP, 2001*.

103. Saunders PT, Sharpe RM, Williams K, Macpherson S, Urquart H, Irvine DS, et al. Differential expression of oestrogen receptor α and β proteins in the testes and male reproductive system of human and non-human primates. *Mol Hum Reprod*. 2001;7: 227-236.

104. Saunders PT, Maguire SM, Gaughan J, Millar MR. Expression of oestrogen receptor beta (ER beta) in multiple rat tissues visualized by immunohistochemistry. *J Endocrinol* 1997;154(3):R13-6.

105. Schiavini JL. Uretrites–capítulo 39. In: Bendhack DA and Damião R (eds) *Guia prático de urologia*. 1st edition. BG Editora e Produções Culturais Ltda, São Paulo, pp 226-30, 1999.

106. Schleicher G, Khan S, Nieschlag E. Differentiation between androgen and estrogen receptor mediated effects of testosterone on FSH using androgen receptor deficient (Tfm) and normal mice. *J Steroid Biochem.* 1989;33(1):49-51.
107. Schulze C. Response of the human testis to long-term estrogen treatment: Morphology of Sertoli cells, Leydig cells and spermatogonial stem cells. *Cell Tissue Res.* 1988;251:31-43.
108. Seielstad DA, Carlson KE, Kushner PJ, Greene GL, Katzenellenbogen JA. Analysis of the Structural Core of the Human Estrogen Receptor Ligand Binding Domain by Selective Proteolysis/Mass Spectrometric Analysis, *Biochemistry.* 1995;34(39):2605-15.
109. Sepaniak S, Forges T, Gerard H, Foliguet B, Bene MC, Monnier-Barbarino P. The influence of cigarette smoking on human sperm quality and DNA fragmentation. *Toxicology.* 2006;223(1-2):54-60.
110. Setchell BP. The flow and composition of lymph from the testes of pigs with some observations on the effect of raised venous pressure. *Comp Biochem Physiol A Comp Physiol.* 1982;73(2):201-5.
111. Sharpe RM. Regulation of spermatogenesis. In: Knobil E and Neill JD (eds) *The Physiology of Reproduction*, 2nd edition. Raven Press Ltd., New York, pp 1363-1434,1994.
112. Sharpe RM. The roles of oestrogen in the male. *Trends Endocrinol Metab.* 1998;9(9):371-7.
113. Shen LX, Basilion JP, Stanton Jr VP. Single-nucleotide polymorphisms can cause different structural folds of mRNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:7871-7876.
114. Singh J, O'Neill C, Handelsman DJ. Induction of spermatogenesis by androgens in gonadotropin-deficient (hpg) mice. *Endocrinology.* 1995;136(12):5311-21.

115. Singh J, Handelsman DJ. Neonatal administration of FSH increases Sertoli cell numbers and spermatogenesis in gonadotropin- deficient (hpg) mice. *J Endocrinol.* 1996;151(1):37-48.
116. [Tasset D](#), [Tora L](#), [Fromental C](#), [Scheer E](#), [Chambon P](#). Distinct classes of transcriptional activating domains function by different mechanisms. *Cell.* 1990;62(6):1177-87.
117. Tcholakian RK, Chowdhury M, Steinberger E. Time of action of oestradiol-17beta on luteinizing hormone and testosterone. *J Endocrinol.* 1974;63(3):411-2
118. Thompson ST. Prevention of male infertility: an update. *Urol. Clin North Amer.* 1994;21:365-76.
119. Tremblay GB, Tremblay A, Copeland NG, Gilbert DJ, Jenkins NA, Labrie F, et al. Cloning, chromosomal localization, and functional analysis of the murine estrogen receptor β . *Mol Endocrinol.* 1997;11(3):353-65.
120. Valladares LE, Payne AH. Induction of testicular aromatization by luteinizing hormone in mature rats. *Endocrinol.* 1979;105(2):431-6.
121. van der Molen HJ, Brinkmann AO, de Jong FH, Rommerts FF. Testicular oestrogens. *J Endocrinol.* 1981;89:33-46.
122. Vine MF. Smoking and male reproduction: a review. *Int J Androl.* 1996;19(16):323-37.
123. Vogt HJ, Heller WD, Borelli S. Sperm quality of healthy smokers, ex-smokers, and never smokers. *Fertil Steril.* 1986;45(1):106-10
124. Waites GM, Einer-Jensen N. Collection and analysis of rete testis fluid from macaque monkeys. *J Reprod Fertil.* 1974;41(2):505-8.

125. Weinbauer GF, Nieschlag E. Hormonal control of spermatogenesis. In: de Kretser DM (ed) *Molecular Biology of the Male Reproductive System*. 1st edition. Academic Press, San Diego, pp 99-142, 1993.
126. Weniger JP, Zeis A. Aromatization of testosterone by then rat embryo testis. *C R Seances Acad Sci III*. 1983;296(6):293-6.
127. Weniger JP. Aromatase activity in fetal gonads of mammals. *J Dev Physiol*. 1990;14(6):303-6.
128. WHO – World Health Organization. *Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Semen-Cervical Mucus Interaction*. 4th edition. The Press Syndicate of the University of Cambridge, Cambridge, 1999.
129. Wolff E, Ginglinger A. Sur la transformation des Poulets males en intersexues par injection d'hormone femelle (folliculine) aux embryons. *Archs Anat Histol Embryol*. 1935;20:219-78.
130. Zinaman MJ, Brown CC, Selevan SG, Clegg ED. Semen quality and human fertility: a prospective study with healthy couples. *J Androl*. 2000;21(1):145-53.
131. Zhou Q, Clarke L, Nie R, Carnes K, LaI LW, Lien YH, et al. Estrogen action and male fertility: Roles of the sodium/hydrogen exchanger-3 and fluid reabsorption in reproductive tract function. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2001;98(24):14132-7.

ANEXOS

Anexo I:

QUESTIONÁRIO

NOME: _____

IDADE: _____

FILHOS: () SIM () NÃO

QUANTOS: MENINOS (____) MENINAS (____)

DESTE CASAMENTO: () SIM () NÃO

TELEFONE: _____ TEL. CONTATO: _____

Nº PRONTUÁRIO: _____

Nº PRONT. ESPOSA: _____

1. FUMA: () SIM () NÃO

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

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

2. BEBE: () SIM () NÃO

TUDO DIA () DE VEZ EM QUANDO ()

VINHO () CERVEJA () CACHAÇA () OUTROS _____

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

3. JÁ TRABALHOU COM:

AGRICULTURA: () SIM () NÃO TEMPO: _____

RAIO X: () SIM () NÃO TEMPO: _____

XEROX: () SIM () NÃO TEMPO: _____

MINERAÇÃO: () SIM () NÃO TEMPO: _____

OUTROS PRODUTOS PERIGOSOS: _____

4. DOENÇAS:

CAXUMBA: () SIM () NÃO _____

DIABETES: () SIM () NÃO

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

6. QUEDA DE CAVALO: () SIM () NÃO

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

7. PACIENTE TEM OU TEVE:

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

8. OPEROU: () SIM () NÃO

9. ESPOSA FEZ:

LAQUEADURA: SIM () NÃO ()

TESTE PÓS-COITO: SIM () NÃO ()

10. INDICAÇÃO CLÍNICA: ICSI () FIV ()

ESPERMOGRAMA

NÚMERO SPTZ: _____ x 10⁶/mL

MOTILIDADE: _____

MORFOLOGIA: _____

PH: _____

LAUDO: _____	Oligospermia: $< 20 \times 10^6/\text{ml}$ Oligosp. Severa: $< 5 \times 10^6/\text{ml}$ Azoospermia: zero SPTZ Astenospermia: $< 50\%$ a + b Teratospermia: $< 30\%$ ovais
--------------	--

COLETA DAS AMOSTRAS

INICIAIS: _____ N°: _____ DATA: _____

SANGUE: _____ mL: _____ ANTICOAGULANTE: _____

TUBOS: _____

SÊMEN: _____ TUBOS: _____

PROCESSAMENTO AMOSTRA: _____

RESPONSÁVEL COLETA: _____

OBS.: _____

Anexo II

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIMENTO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa você não será penalizado de forma alguma. Em caso de dúvida você poder procurar o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica de Goiás pelos telefones 227-1071- Prof. Nivaldo ou Leonardo

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: ANÁLISE DA INFERTILIDADE MASCULINA IDIOPÁTICA SOB ASPECTOS GENÉTICO-MOLECULARES

Pesquisador Responsável: Dra. Katia Karina Verolli de O. Moura.

Telefone para contato: 3227-1385

Eu abaixo qualificado, após ter sido esclarecido verbalmente e depois de ler o resumo do projeto intitulado: ANÁLISES DA INFERTILIDADE MASCULINA IDIOPÁTICA SOB ASPECTOS GENÉTICO-MOLECULARES, (ABAIXO) realizado pelo Núcleo de Pesquisa Replicon da Universidade Católica de Goiás, DECLARO assumir, por espontânea vontade, livre de qualquer coação, a responsabilidade pela participação voluntária e gratuita, no grupo de pacientes integrantes da pesquisa. Estou ciente que o trabalho consiste na análise molecular e citogenética de amostras de sangue periférico e de sêmen, e que o mesmo será armazenado e utilizados em trabalhos posteriores mantendo o objetivo de complementar o meu diagnóstico de infertilidade.

DECLARO que compreendi que a obtenção das amostras citadas acontecerá sob minha total ciência, e sob os procedimentos adequados pela equipe responsável pela pesquisa, sem qualquer prejuízo a minha pessoa e que será mantido o total sigilo dos resultados, que serão entregues apenas a mim ou responsável.

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

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

Anexo III

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

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG nº _____ CPF
nº _____ nº de prontuário _____ nº de matrícula
_____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo

_____,
como sujeito. Fui devidamente informado e esclarecido pelo
pesquisador _____ sobre a pesquisa, os procedimentos
nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha
participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento,
sem e que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu
acompanhamento/assistência/tratamento.

Local e data _____

Nome do sujeito ou
responsável: _____

Assinatura do sujeito ou
responsável: _____

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

Testemunhas (não ligada à equipe de pesquisadores):

Nome: _____

Assinatura: _____

Nome: _____

Assinatura: _____

Observações complementares:

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)