

MAURO BIBANCOS DE ROSA

**ESTUDO MULTICÊNTRICO SOBRE A FREQUÊNCIA DE
MICRODELEÇÕES DO CROMOSSOMO Y ENTRE CASAIS COM
ABORTAMENTOS ESPONTÂNEOS RECORRENTES**

**Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Santa Casa
de São Paulo para a obtenção do
título de Mestre em Medicina**

Área de concentração: Tocoginecologia

São Paulo

Agosto 2010

Livros Grátis

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

Milhares de livros grátis para download.

MAURO BIBANCOS DE ROSA

**ESTUDO MULTICÊNTRICO SOBRE A FREQUÊNCIA DE
MICRODELEÇÕES DO CROMOSSOMO Y ENTRE CASAIS COM
ABORTAMENTOS ESPONTÂNEOS RECORRENTES**

**Tese apresentada ao Curso de
Pós-Graduação da Faculdade de
Ciências Médicas da Santa Casa
de São Paulo para a obtenção do
título de Mestre em Medicina**

Área de concentração: Tocoginecologia

Orientador: Prof.Dr.Tsutomu Aoki

Co-orientador: Prof.Dr.Péricles Assad Hassun Filho

São Paulo

Agosto 2010

DEDICATÓRIA

A minha mãe, pelas orações, mimos, conversas e cuidados extremos.

Ao meu pai, que desde sempre foi o meu sustentáculo, exemplo de decência, força, amor e perseverança.

Ao meu irmão Dario, pelo modelo de força, eficiência, vigor e segurança.

Ao meu irmão Fabio, por mostrar que posso ser um profissional de saúde competente, destacado e também decente.

A minha esposa Fernanda, pelo companheirismo, amor, paciência, dedicação e suporte dados em todos os momentos difíceis.

A Bia por me forçar a ser um modelo de vida a ser seguido.

Por fim ao meu filho Gabriel, que mesmo ainda sem saber, trouxe tantas mudanças na minha vida, mudou todos os meus conceitos e me deu forças para tentar deixar algo que se orgulhe, como esse estudo.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Ao meu orientador Prof.Dr. Tsutomu Aoki, diretor do Departamento de Obstetria e Ginecologia da Santa Casa de São Paulo, minha gratidão pelo exemplo de vida acadêmica e a abertura dessa oportunidade em minha vida.

Ao meu co-orientador Prof.Dr.Periclés Assad Hassun pelo conhecimento e feitura de parte crucial para a realização desse estudo.

Ao meu amigo, Prof.Dr. André Monteiro da Rocha pelo conhecimento, incentivo e paciência que me ajudaram a realizar esse meu estudo.

A Prof.Dra.Lia Mara Rossi pela paciência, amizade e conhecimentos sem os quais não seria possível concluir esse estudo.

Por fim agradeço aos residentes do ambulatório de reprodução humana da Santa Casa de São Paulo e todos os pacientes que foram essenciais para esse estudo.

AGRADECIMENTOS

A Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo e a Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo pelo acolhimento, simpatia e história traduzida nos corredores e em seus estudantes, professores e funcionários que transformaram esse estudo em uma oportunidade única na minha vida profissional.

Ao Prof.Dr.Nilson Donadio, chefe do setor de reprodução humana da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, pelo apoio, confiança, conhecimentos e incentivo que fizeram desse período algo que poderei me orgulhar em ter trabalhado ao lado desse destacado profissional.

Ao Prof.Dr.Adriano Fregonesi, docente da Universidade de Campinas, pelo modelo profissional que sempre segui e pela amizade consolidada nesses anos todos.

Ao Prof.Dr.Paulo César Serafini, chefe do setor de reprodução humana da Universidade de São Paulo, por todos esses anos juntos, de muito trabalho, amizade, ensinamentos, ciência e incentivo, mesmo nos momentos que muitos duvidaram.

Ao Prof.Dr.Eduardo Leme Alves da Motta, chefe da gineco-endocrinologia da Unifesp, pelo exemplo profissional, amizade e confiança, permitindo que usasse toda sua estrutura clínica para a realização desse estudo.

A equipe da clínica de medicina reprodutiva Huntington, pela ajuda, compreensão, carinho e apoio nesses anos desse estudo.

A Genesis Genetics pelo conhecimento e trabalho desenvolvidos.

ABREVIATURAS

18 EIF1AY: *translation –initiation factor 1 A, Y isoform*

AER: *abortamento espontâneo recorrente*

AZF: *azoospermia factor*

DAZ: *deleted in azoospermia*

DAZL1: *DAZ like*

DBY: *Dead-box Y RNA helicase*

DFFRY: *Drosophila fat facets related Y*

DHEA: *dehidroepiandrosterona*

DNA: *deoxyribonucleic acid*

DYS: *DNA Y-chromosome segment*

EDTA: *Ethylenediamine tetraacetic acid*

FSH: *Follicle-Stimulating Hormone*

Ig: *imunoglobulina*

LH: *Luteinizing Hormone*

Mb: *mega-bases*

RBMY: *RNA binding motif on the Y*

RNA: *ribonucleic acid*

RRM: *recognition RNA motif*

SCO: *Sertoli Cell Only*

SPGY1: *spermatogenesis gene on the Y-like autosomal*

SRY: *sex-determining region in Y*

STS: *sequence tagged site*

UV: *ultravioleta*

SUMÁRIO

1-INTRODUÇÃO.....	1 – 4
2-REVISÃO DE LITERATURA.....	5-12
2.1-o cromossomo y.....	7 -8
2.2-microdeleções do cromossomo y.....	9 -11
2.3-microdeleções do cromossomo y e abortamentos de repetição.....	12
3-OBJETIVO.....	13 -14
4-MATERIAIS E MÉTODOS.....	15-22
4.1-casuística.....	16
4.2-investigações das causas de abortamento espontâneo recorrente.....	17
4.2.1-Análise seminal.....	18
4.2.2-Cariótipo.....	18-19
4.2.3-Pesquisa de microdeleções do cromossomo y.....	19 -21
4.3-análise estatística.....	22
5-RESULTADOS.....	23 -29
6-DISCUSSÃO.....	30 -34
7-CONCLUSÃO.....	35 -36
8-ANEXOS.....	37 -39
9-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	40-45
FONTES CONSULTADAS	46-47
RESUMO.....	48-49
ABSTRACT.....	50-51
LISTA	52-53

1 - INTRODUÇÃO

Abortamento espontâneo recorrente (AER) é uma condição caracterizada pela ocorrência de pelo menos 3 abortamentos espontâneos consecutivos (Medicine, 2008, Zegers-Hochschild F. et al, 2009). Apesar de essa entidade nosológica possuir uma definição diferente da de infertilidade (incapacidade de conceber após 12 meses de intercurso sexual desprotegido), elas não são referidas distintamente nos principais relatórios sobre tratamentos de Reprodução Humana Assistida (Services, 2006, Technology, 2009, Zegers-Hochschild Fernando et al, 2006). Porém, estima-se que o AER afete em torno de 3% dos casais em idade reprodutiva (Allison e Schust, 2009, Ford e Schust, 2009).

Uma avaliação extensa que inclua a investigação de AER por fatores imunológicos (Subrt et al, 2008), cromossômicos (Goud et al, 2009, Sierra e Stephenson, 2006), endocrinológicos (Ando et al, 1992, Cocksedge et al, 2009, Potdar e Konje, 2005, Rao et al, 2008), anatômicos (Dendrinis et al, 2005, Propst e Hill, 2000), deficiências de coagulação (Pabinger, 2009, Subrt et al 2008), e até mesmo iatrogênicos (Jauniaux et al, 2006, Stephenson e Kutteh, 2007) deve ser a conduta diagnóstica para casais com histórico de 3 ou mais abortamentos.

Os fatores imunológicos causadores de abortamentos espontâneos recorrentes devem ser investigados por meio da pesquisa de fator anticoagulante lúpico, imunoglobulina (Ig)G e IgM contra cardiolipina, β -glicoproteína-1 (Stephenson e Kutteh, 2007), fosfatidil serina e fosfatidil inositol (Subrt et al 2008). Os fatores imunológicos perfazem de 15% a 20% de todos

os casos de abortamentos espontâneos recorrentes (Stephenson e Kutteh, 2007).

Já as falhas cromossômicas estruturais como as translocações balanceadas correspondem para 2,5% a 8% dos casos de abortamento espontâneo recorrente e podem ser diagnosticados por meio de estudos citogenéticos com bandeamento (Goud et al 2009, Sierra e Stephenson, 2006).

Os fatores endocrinológicos contribuem entre 8% a 12% de todos os casos de abortamento espontâneo recorrente. Dentre os fatores endócrinos causadores de abortamentos espontâneos recorrentes estão a insuficiência lútea que pode ser diagnosticada tanto pela quantificação de progesterona na fase lútea média, quanto pela biópsia endometrial nesse período; a síndrome anovulatória crônica identificada segundo os critérios de Rotterdam(2004); hipotireodismo, identificável por meio de quantificação de hormônio tireoestimulante; e hiperprolactinemia, também facilmente detectável por exames laboratoriais capazes de discernir micro e macro hiperprolactinemia.

Entre 15% e 20% dos casos de abortamento espontâneo recorrente são resultado de anormalidades anatômicas da cavidade uterina (Stephenson e Kutteh, 2007). A investigação desse tipo de etiologia pode ser feita por meio de histerossonografia, histerosalpingografia, ou histeroscopia (Stephenson e Kutteh, 2007). A histeroscopia diagnóstica pode ser convertida em histeroscopia cirúrgica e a correção dos problemas anatômicos que levavam ao abortamento espontâneo produz uma alta taxa de sucesso de gestação quando são corrigidos fatores anatômicos da cavidade uterina e removidos pólipos ou

outros fatores que causam alterações da superfície endometrial (Pabuccu et al, 1997, Preutthipan e Linasmita, 2001).

Distúrbios de coagulação também são responsáveis por entre 8% e 12% dos casos de abortamento espontâneos recorrentes; dentre esses fatores que levam a estados de hipercoagulabilidade estão as mutações G1691A do fator V de Leiden, G20210A da protrombina, e a hipermocisteinemia provocada pela mutação C677T na metilenotetrahidrofolato redutase (Kutteh e Triplett, 2006). Todas essas mutações são detectáveis por meio de testes de genotipificação que incluem reação em cadeia pela polimerase.

A investigação de fatores ambientais, que correspondem a aproximadamente 5% dos casos de abortamentos espontâneos recorrentes (Stephenson e Kutteh, 2007), é mais complexa uma vez que deve incluir a exposição da mulher a uma miríade de substâncias que vão da fumaça do tabaco no ambiente (George et al, 2006) a poluentes como o bisfenol A (Benachour e Aris, 2009).

Apesar do crescente conhecimento sobre as causas de abortamento espontâneo recorrente e do desenvolvimento de ferramentas diagnósticas com maior sensibilidade, especificidade e acurácia, aproximadamente 50% dos casais com abortamentos espontâneos recorrentes não terão identificada a causa de seus abortamentos (Allison e Schust, 2009). Portanto, a investigação de novas etiologias para os abortamentos espontâneos recorrentes, como o envolvimento das microdeleção do cromossomo Y (Dewan et al, 2006, Karaer et al, 2008), beneficiará pacientes sujeitos a essa doença, uma vez que pode indicar novas terapias para que se consiga uma gestação a termo com o nascimento de uma criança saudável.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2 - REVISÃO DE LITERATURA

Recentemente Dewan et al. (2006) e Karaer et al.(2008) demonstraram a existência de associação entre microdeleções do cromossomo Y e abortamentos espontâneos recorrentes, nesse contexto a presente revisão de literatura abordará informações sobre o cromossomo Y, as microdeleções do cromossomo Y e sua associação com abortamentos espontâneos recorrentes.

2.1 O CROMOSSOMO Y

O genoma humano compreende 23 pares de cromossomos, dos quais 22 são cromossomos autossômicos e um par de cromossomos sexuais. Os cromossomos sexuais podem ser X ou Y, que se distinguem por seu tamanho, conseqüentemente, pela quantidade de genes que neles se encontram e por sua função durante o desenvolvimento e a vida adulta (Lewis, 2004).

O cromossomo Y tem 63 mega-bases (Mb) das quais 95% são não-recombinantes e contém eucromatina e heterocromatina; os 5% restantes constituem as extremidades cromossômicas e são regiões pseudoautossômicas chamadas de PAR1 e PAR2. A eucromatina do cromossomo Y é rica em seqüências palindrômicas e seqüências duplicadas que estão próximas aos genes pseudoautossômicos e auxiliam na preservação de sua integridade estrutural (Kirsch et al, 2005).

Os genes pseudoautossômicos apresentam seqüências homólogas no cromossomo X e codificam uma variedade de proteínas funcionais em ambos os sexos, participando ou controlando atividades tais como crescimento ósseo, transdução de sinais, síntese de hormônios, e codificação de receptores, entre outros (Lewis, 2004).

Além dos genes pseudoautossômicos, há no cromossomo Y um segundo grupamento gênico que inclui os homólogos X-Y. Esses genes são expressos em quase todos os tecidos, inclusive os encontrados apenas em homens (Lewis, 2004).

Há também um terceiro grupo gênico que inclui aqueles exclusivos ao cromossomo Y. Dentre esses genes se encontra o principal determinante da diferenciação sexual masculina, chamado de gene sex-

determining region in Y (SRY), que está localizado próximo à região pseudoautosômica do braço curto do cromossomo Y (Yp11.3) (Schlegel, 2002) e cujo produto age como um indutor na determinação sexual masculina (Lopez et al, 1995, McElreavey et al, 1995).

Outra região importante do cromossomo Y foi primeiramente descrita a partir de estudos citogenéticos realizados por Tiepolo e Zuffardi (1976), que identificaram homens inférteis com deleções sub-microscópicas caracterizadas como mutações *de novo*, ou seja, que não estavam presentes nos pais (Kuhnert et al, 2004). Uma vez que essa região estava deletada em indivíduos azoospermicos ela foi batizada como *azoospermia factor* (AZF) e possui genes reguladores da espermatogênese (Sadeghi-Nejad e Oates, 2008, Thielemans et al, 1998).

A região AZF compreende três distintas sub-regiões: AZFa, AZFb, AZFc, localizadas nos segmentos proximal, central e distal do braço q do cromossomo Y, e com tamanho estimado de 1Mb, 1.5Mb e 3Mb, respectivamente (Briton-Jones e Haines, 2000, Gatta et al, 2002, Seifer et al, 1998). Recentemente, uma quarta subdivisão denominada AZFd foi sugerida (Foresta et al, 2001).

A AZF contém um gene ou um conjunto de genes necessários para uma espermatogênese normal e especificamente a sub-região AZFc contém o gene deletado na azoospermia (*deleted in azoospermia* - DAZ), que é essencial para a espermatogênese e está muitas vezes ausente em pacientes azoospermicos (Saxena et al, 1996, Shinka e Nakahori, 1996).

2.2 MICRODELEÇÕES DO CROMOSSOMO Y

Alterações estruturais no cromossomo Y são uma importante etiologia da infertilidade masculina (Vogt, 2004). Em geral, as aberrações envolvem deleções de seqüências de DNA relacionadas com a AZF (Tsujiura et al, 2004).

A freqüência de microdeleções no Yq relacionada à infertilidade masculina varia de 1% a 55,5% a depender da população estudada (Fagerli et al, 1999, Krausz et al, 2001, Quintana-Murci et al, 2001, Vogt, 2004). Estudos realizados em amostras da população brasileira, porém indicam que a prevalência de microdeleções do cromossomo Y em homens inférteis varia de 5,3 a 7,5% (Pina-Neto et al, 2006, SaoPedro et al, 2003).

Levando-se em consideração apenas pacientes com azoospermia as freqüências de microdeleções são 43,4% na região AZFa, 8,6% na região AZFb e 17,4% na região AZFc. Considerando também os pacientes com oligozoospermia grave as freqüências são de 40% para microdeleção em AZFa, 5% em AZFb e 5% em AZFc Arruda (Arruda et al, 2007)

As microdeleções de AZF não estão associadas apenas à azoospermia, mas com uma variedade de perfis histopatológicos testiculares, desde a síndrome de célula de Sertoli (SCO – do inglês, *Sertoli Cell Only*) a hipoespermatogênese (Vogt et al, 1996).

Os genes USP9Y (*Ubiquitin-specific protease-9 Y*), também conhecido como DFFRY (*Drosophila fat facets related Y*), e o DBY (*Dead-box Y RNA helicase*) possuem homólogos no cromossomo X e encontram-se na região AZFa. Quando deletados, esses genes levam ao fenótipo da síndrome de

células de Sertoli, portanto estão implicados na espermatogênese e possuem um provável efeito sinérgico (Arredi et al, 2007, Krausz et al, 2006).

As microdeleções das regiões AZFb e AZFc provocam, respectivamente, interrupção em meiose I e hipoespermatogênese (Ferras et al, 2004). As microdeleções em AZFa são causadas por recombinações não-alélicas entre duas seqüências de retrovírus endógenos humanos (HERV) de aproximadamente 10kb que flanqueiam 780Kb desta região (Bosch e Jobling, 2003).

Dois genes ou famílias, *RBM* e *DAZ/SPGY1* foram identificados no Yq11. Ambos mostram a expressão testicular específica e codificam proteína com domínios de “ligante ao RNA” (Vogt et al 1996, Yen et al, 1996). O gene *RBM* (*RNA binding motif on the Y*), está localizado na região AZFb, junto com outro gene o 18 *EIF1AY* (*translation-initiation factor 1 A, Y isoform*), mas até agora apenas o primeiro foi relacionado com infertilidade. O *RBM* pertence a uma família de 20-50 genes e pseudo-genes (Foresta et al 2001). Este gene está expresso apenas nas células germinativas do tipo espermatogônia, espermátocitos e espermátides redonda (Vogt et al 1996).

O numero exato de genes da família do gene *DAZ* (*Deleted in azoospermia*) ainda não foi elucidado. A família gênica está localizada na região AZFc e microdeleções nesta região estão correlacionadas com defeitos severos na espermatogênese (Chang e Tsai, 1999, Kuhnert et al 2004, Vogt, 2004). *DAZ* é encontrado apenas no cromossomo Y em humanos, macacos do velho mundo e chimpanzés. E todos os outros mamíferos, *DAZ* está localizada apenas em cromossomos autossômicos (Yen et al 1996). O homem possui

uma cópia autossômica deste gene localizado em 3p24, chamado de *DAZL1* (*DAZ like*) (Foresta et al 2001).

Os genes de DAZ são expressos exclusivamente em tecido testicular e codificam proteínas que contêm o sítio RRM (*Recognition RNA Motif*), sugerindo que os produtos dos genes DAZ tenham algum papel no metabolismo de RNAs. O homólogo autossomal *DAZL1* tem 83% de similaridade na região codificante do cDNA e também codifica proteínas ligantes a RNA. Acredita-se que o gene *DAZ* apareceu há 40 milhões de anos atrás durante a evolução dos primatas, proveniente de eventos randômicos de transposição e amplificação (Agulnik et al, 1998).

Teng *et al* em 2002, relataram que o polimorfismo T54A no exon 3 é prevalente em pacientes com falha na espermatogênese, e esta região se localiza dentro do domínio RRM. Apesar de uma porcentagem significativa de indivíduos inférteis com deleções no Y não terem filhos (sob mecanismos naturais de reprodução) alguns trabalhos especulam sobre a possibilidade da transmissão de uma predisposição à infertilidade de pai para filho devido, por exemplo, a eventos de deleção ocorrendo mais freqüentemente associados a certos tipos de haplótipos específicos do cromossomo Y (Foresta et al 2001). Assim como a predisposição de infertilidade ligada a microdeleções do cromossomo Y ser acentuada com a idade, ocasionando alterações progressivas na produção de espermatozóide, onde um homem jovem oligozoospermico leve se tornaria com a idade em um azoospermico (Gatta et al 2002); (Foresta et al 2001).

Segundo Ferras *et al* em 2004, as microdeleções no cromossomo Y resultam de processos de recombinação homóloga entre seqüências de DNA

repetitivas que ocorrem anormalmente dentro do mesmo braço longo. As 19 alterações estruturais do Y decorrem da meiose paterna, mesmo sem história familiar prévia, e constituem mutações *de novo*, que podem ser transmitidas à prole masculina produzida a partir de ICSI (Souza *et al.*, 2000). Uma hipótese que tenta explicar a origem das alterações moleculares da região AZF, levando em conta os processos envolvidos nos padrões de hereditariedade, associados à gametogênese, é a transmissão paterna do cromossomo Y para prole masculina (transmissão vertical). Portanto, em casos de TRA cujo pai é oligozoospermico severo ou azoospermico, a probabilidade destes passarem suas alterações genéticas aos filhos é alta. Uma vez que a mutação em AZF é a principal causa do problema de infertilidade o nascimento de prole masculina perpetua o problema nas gerações subseqüentes na família (Kihaille et al, 2005).

2.3 MICRODELEÇÃO DO CROMOSSOMO Y E ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE

Dewan et al.(2006) demonstraram que uma alteração específica do cromossomo Y (deleção) significativamente presente em 82% dos casos de abortamentos espontâneos recorrentes. Recentemente, outro grupo de pesquisadores (Karaer et al 2008) demonstrou a existência de associação entre a microdeleção de regiões do cromossomo Y e AER, porém a frequência observada (16%) foi bastante inferior àquela reportada por Dewan et al. (2006). Entretanto os mecanismos pelos quais as microdeleções do cromossomo Y podem estar associadas aos casos de abortamento espontâneo ainda são desconhecidos (Dewan et al 2006, Karaer et al 2008).

A confirmação do envolvimento das microdeleções do cromossomo Y em casos de abortamentos espontâneos de repetição constituirá um passo importante no aconselhamento e no delineamento de estratégias terapêuticas desses pacientes. Desse modo, a investigação de microdeleções do cromossomo Y em um grupo selecionado de pacientes com abortamento espontâneo recorrente sem causa aparente permitirá não só a investigação dessa associação, como também trará informações sobre a frequência dessas microdeleções em uma amostra de casais inférteis brasileiros.

3 - OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar a frequência de ocorrência de microdeleções das STS DYS236, DYS235, DYS262 e DYS220 do cromossomo Y em um grupo selecionado de pacientes com abortamentos recorrentes sem causa aparente.

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4 - MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Foram incluídos 30 homens provenientes de casais com abortamentos espontâneos de repetição. Inicialmente, o estudo visava o recrutamento de 34 pacientes, tal tamanho amostral foi obtido para o teste Z de proporções com poder de 80% baseado na frequência de microdeleção do cromossomo Y previamente descrita por Dewan et al (2006); entretanto, a análise inicial dos dados obtidos no estudo permitiram a redução do número de pacientes para 30 com um poder de 100%, quando utilizado o mesmo teste.

A inclusão de pacientes foi subordinada aos seguintes critérios:

a) Critérios de inclusão:

- histórico de, no mínimo, três abortamentos espontâneos consecutivos com os mesmos parceiros

- Mulheres com idade igual ou inferior a 37 anos.

b) Critérios de exclusão

- Etiologia comprovada para abortamento espontâneo recorrente,
- Cirurgias uterinas prévias,
- Alterações anatômicas determinantes para abortamento espontâneo,
- Endometriose profunda detectada por meio de ultrassonografia transvaginal após preparo intestinal (Abrao et al, 2007)

4.2 INVESTIGAÇÕES DAS CAUSAS DE ABORTAMENTO ESPONTÂNEO RECORRENTE

As causas de abortamento espontâneo habitual foram minuciosamente investigadas para que apenas homens provenientes de casais com abortamentos espontâneos recorrentes sem causa aparente fossem incluídos no estudo. A propedêutica para a investigação desse tipo de infertilidade conjugal seguiu compreenderam: 1) o estudo de cariótipo dos casais com a inclusão de pesquisa de bandas G; 2) estudo imunológico na mulher; 3) avaliação hormonal feminina; 4) histerosalpingografia; 6) biópsia de endométrio por histeroscopia cirúrgica para datação segundo os critérios de Noyes; 7) análise seminal; 8) avaliação hormonal masculina (Ando et al 1992, Cocksedge et al 2009, Dendrinos et al 2005, Goud et al 2009, Jauniaux et al 2006, Pabinger, 2009, Potdar e Konje, 2005, Propst e Hill, 2000, Rao et al 2008, Sierra e Stephenson, 2006, Stephenson e Kutteh, 2007, Subrt et al 2008).

Todas as avaliações supracitadas, com exceção das cariotipagens, da avaliação seminal e da pesquisa de microdeleção do cromossomo Y, foram realizadas no Laboratório Salomão & Zoppi, na Genesis Genetics Brasil e no Laboratório Central da Santa Casa de São Paulo seguindo as metodologias empregadas nesses laboratórios prestadores de serviço. As metodologias descritas a seguir foram utilizadas para a análise seminal, a cariotipagem e a pesquisa de microdeleção do cromossomo Y.

4.2.1 Análise seminal

As amostras de sêmen foram coletadas por masturbação após 3-5 dias de abstinência sexual e foram submetida ao protocolo rotineiro para análise seminal, segundo normativa da Organização Mundial da Saúde (2001).

Parâmetros macroscópicos como cor, volume, pH, viscosidade e tempo decorrente até a liquefação foram observados. Após a liquefação das amostras, estas foram mantidas a 37°C por 30 minutos e 10µmL foram retirados e transferidos para câmara do tipo Makler ou *microcell* para contagem espermática e posterior cálculo da concentração e porcentagens de motilidade espermática. A motilidade espermática foi classificada nos seguintes graus: A - motilidade rápida e progressiva; B - motilidade lenta e progressiva; C - motilidade não progressiva; e D - imóvel.

A análise morfológica foi realizada após em esfregações de sêmen por meio da coloração verde-brilhante e/ou Papanicolaou modificado sob aumento de 1000 vezes em microscópio de luz convencional. Os espermatozóides classificados segundo os critérios de morfologia estrita de Kruger et al. (1987) e foram considerados espermatozóides normais aqueles que: possuíam cabeça com comprimento entre 5 e 6 µm ; diâmetro da cabeça entre 2,5 a 3,5 µm; 40 a 70% de cobertura acrossomal sobre a cabeça; e sem defeitos de cauda ou peça intermediária.

4.2.2 Cariótipo

Amostras de sangue total foram obtidas de todos os pacientes por meio de veno-punção em frasco contendo EDTA. Após a colheita de sangue os leucócitos foram separados por meio de centrifugação e semeados em meio de

cultura e mantidos por até 72 horas a 37°C para a proliferação celular. Então foi adicionada colchicina e a incubação sob as mesmas condições prosseguiu por mais 4 horas. As células expostas a colchicina foram separadas por centrifugação e depositadas em um meio hipotônico com solução de cloreto de potássio (0,075M) para a sua posterior fixação em uma mistura de metanol e ácido acético, na proporção 3:1. A suspensão celular obtida foi gotejada em lâminas de microscopia e posteriormente destinada a diferentes técnicas de coloração e de marcação cromossômica.

As metáfases das preparações citológicas foram analisadas e fotografadas ao microscópio para a montagem de um cariograma.

O bandeamento G foi obtido após o tratamento de lâminas ulteriores expostas a tripsina (0,10%) por 5 a 10 segundos com Giemsa por 30 segundos. As lâminas foram lavadas em água bidestilada e as lâminas montadas para identificação dos cromossomos e identificação de possíveis inversões, translocações e macrodeleções.

4.2.3 Pesquisa de microdeleções do cromossomo Y

Os pacientes selecionados para o estudo tiveram amostras de sangue total colhido por meio de veno-punção em tubo coletor contendo EDTA. As amostras de sangue devidamente identificadas foram armazenadas a -80° C até o momento da extração do DNA. A extração do DNA foi realizada por meio do conjunto comercial de extração de *DNA illustra blood genomicPrep Mini Spin* Kit segundo as recomendações do fabricante (GE Healthcare).

Após a extração do DNA genômico foram realizadas as reações em cadeia pela polimerase para a amplificação de 4 seqüências alvo no cromossomo Y, a saber: 1)DYS236; 2) DYS235; 3) DYS262; e 4) DYS220.

Os oligonucleotídeos inicializadores utilizados nas PCRs estão descritos no Quadro 1. As PCRs foram realizadas com a utilização dos conjuntos de amplificação. Sucintamente, as alíquotas de reagentes descritas no Quadro 2 foram depositadas em cada um dos 96 poços de uma placa de polipropileno para reação em cadeia pela polimerase para que fossem submetidas às seguintes condições de amplificação em termociclador:

- 1) Denaturação: 2 minutos a 94°C,
- 2) Anelamento dos oligonucleotídeos inicializadores: 30 segundos a 57°C,
- 3) Extensão das seqüências alvo: 1 minuto a 72°C por 5 minutos.

Todas as reações em cadeia pela polimerase foram realizadas em duplicata.

QUADRO 1 – Seqüências de nucleotídeos dos oligonucleotídeos inicializadores utilizados para a identificação dos alvos DYS220, DYS236, DYS235 e STS DYS262 no cromossomo Y e tamanho em pares de bases (pb) de cada fragmento amplificado.

Primer	Sentido	Seqüência	Tamanho do fragmento amplificado
STS	3'→5'	AAG TGG GAC CTA AGC TAC GA	194 pb
DYS220	5'→3'	AGC TTC AGG AGG TTC AAA AC	
STS	3'→5'	AAG ACA GTC TGC CAT GTT TCA	125 pb
DYS236	5'→3'	ACA GGA GGG TAC TTA GCA GT	
STS	3'→5'	GGG AGA GTC ACA TCA CTT GG	158 pb
DYS235	5'→3'	TTG AAT TAT CTG CCT GAG TGC	
STS	3'→5'	ACC GTG CCT GGC TAT TAT TT	118 pb
DYS262	5'→3'	ACA GCA TCA AGA GCA CAT GA	

Os fragmentos amplificados na PCR foram submetidos à eletroforese em gel de agarose a 3% por 45 minutos sob uma tensão de 110 V e 45 mA. Os géis de eletroforese foram corados com brometo de etídeo (5µg/µL) para visibilização dos fragmentos amplificados em transiluminador UV. Os fragmentos amplificados tiveram o seu tamanho estimado pela comparação com um marcador de tamanho aproximado de 100 pares de base.

QUADRO 2 – Volumes de reagentes utilizados na reação em cadeia pela polimerase.

Reagente	Quantidade
PCR Master Mix (10X)	12,5 µl
Primer F (10 mM)	1 µl
Primer R (10 mM)	1 µl
Água ultra-pura e livre de DNase	8 µl
DNA da amostra	2,5 µl
Volume total da reação	25 µl

4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As variáveis quantitativas discretas e contínuas foram reportadas segundo a medida de tendência central e de dispersão mais apropriadas as suas distribuições, ou seja, média e desvio padrão no caso dos dados com distribuição Gaussiana; e mediana e primeiro e terceiro quartis para aqueles dados cuja distribuição não era Gaussiana.

As proporções de indivíduos com e sem alguma das microdeleções do cromossomo Y estudadas foram comparadas por meio do teste Z para duas proporções e/ou para uma proporção.

5 - RESULTADOS

Foram recrutados para esse estudo 30 casais cujos homens tinham idade de 27 a 53 anos (35 ± 6 anos) e as mulheres de 25 a 36 anos (31 ± 3 anos). Os casais recrutados para esse estudo tiveram uma mediana de 3 abortamentos com no mínimo 3 e no máximo 5 AER.

Uma vez que a presente dissertação tinha por intenção estudar a frequência de microdeleções do cromossomo Y em pacientes com AER sem causas conhecidas foi realizada uma extensa investigação das causas de abortamento espontâneo.

A investigação foi iniciada pela caracterização hormonal das pacientes. O perfil hormonal das pacientes foi verificado e não houve valores discrepantes em relação aos valores de referência esperados para esse grupo. Além disso, apenas uma paciente apresentava irregularidade de ciclos menstruais. Os dados referentes às concentrações hormonais se encontram resumidos na tabela 1.

TABELA 1- Concentrações médias e desvio padrão de FSH, LH, estradiol, progesterona, dihidroepiandrosterona (DHEA), DHEA sulfato (s), testosterona e insulina nas pacientes selecionados devido a abortamento espontâneo recorrente.

Hormônio	Concentração observada na amostra	Valor de referência
FSH (UI/mL)	6,06 ± 1,57	2,4 - 9,3
LH (UI/mL)	3,61 ± 1,05	1,3 - 9,6
Estradiol (pg/mL)	44,78 ± 13,63	12 - 166
Progesterona (ng/mL)	5,98 ± 1,21	0,27 - 1,2
DHEA (mmol/mL)	4,49 ± 1,23	6,6 – 27,8
DHEAs (ng/mL)	198,8 ± 83,4	55 - 370
Testosterona (ng/mL)	0,375 ± 0,18	0,06 – 0,8
Insulina (UI/mL)	8,14 ± 4,13	2,5 - 25

Além da ausência de fatores hormonais que pudessem explicar a ocorrência dos AERs, a avaliação seminal revelou que os indivíduos estudados também se encontravam dentro de padrões compatíveis com a fertilidade. Os dados encontram-se resumidos na tabela 2.

TABELA 2 – Concentração de espermatozóides, motilidade (A+B) e morfologia estrita de Kruger dos pacientes estudados e valores de referência utilizados pelos laboratórios.

	Valores das amostras	Valores de referência
Concentração (10^6 espermatozóides/mL)	$23,8 \pm 8,9$	20
Motilidade (%)	$52,2 \pm 12,1$	50
Morfologia estrita de Kruger (% de espermatozóides normais)	$4,9 \pm 1,9$	8

Possíveis causas cromossômicas paternas e maternas para AER também foram investigadas por meio de cariotipagem com bandeamento G; entretanto não foram encontradas alterações cromossômicas em nenhum dos 30 casais convidados a participar desse estudo.

Fatores relacionados a distúrbios de coagulação também foram descartados como causa de AER (Tabela 3); bem como avaliações morfológicas como histerosalpingografia, a histeroscopia, e a ultrassonografia transvaginal não revelaram achados compatíveis com quadros de AER (Tabela 4).

TABELA 3- Resultados de anticardiolipina, fator anticoagulante lúpico e fator V de Leiden das pacientes com AER.

	Negativo	Positivo	Heterozigose
Anticardiolipina	30	-	-
Fator anticoagulante lúpico	30	-	-
Fator V de Leiden	29	-	1

TABELA 4 – Resultados dos exames para a verificação de causas anatômicas de abortamentos espontâneos recorrentes.

Exame	Achados	Número de pacientes
Histerosalpingografia	Normais	24
	Discreta alteração tubárea	5
	Obstrução tubárea esquerda	1
Histeroscopia	Normais	29
	Pólipo menor que 2 cm	1
Ultrassonografia transvaginal	Normais	24
	Mioma subseroso	2
	Ovário micropolicístico	3

Após a verificação dessas possíveis etiologias de AER os homens foram submetidos à investigação de microdeleções do cromossomo Y por meio da metodologia anteriormente descrita. A amplificação das regiões STS DYS236, STS DYS235 e STS DYS262 foi possível em todos os pacientes. A região STS DYS220 não foi amplificada em apenas 1 paciente, desse modo a frequência de indivíduos afetados ($f_a=0,03$) foi significativamente menor que a de não afetados (f_{na})($n=29;f_{na}=0.97; p<0,001$).

A frequência de indivíduos afetados também foi significativamente menor na amostra estudada que aquela reportada por Dewan et al (2006) ($f_{afetados\ Dewan\ et\ al.}=0,82; p<0.0001$). Além disso, quando esses dados foram confrontados com aqueles observados por Karaer et al.(2008) também houve uma frequência menor de indivíduos portadores de microdeleção do cromossomo Y inferior que a reportada ($f_{afetados\ Karaer\ et\ al.}=0,16; p=0,04$). Entretanto dados recentemente publicados não demonstraram associação entre microdeleções do cromossomo y e abortamentos espontâneos recorrente, de fato nenhuma microdeleção foi detectada nos pacientes desse estudo (Bellver et al, 2010)(Tabela 5).

TABELA 5 – Freqüência de microdeleções do cromossomo Y em pacientes com abortamentos espontâneos recorrentes relatados na literatura e no presente estudo.

Fonte	Freqüência de indivíduos afetados
Dewan et al., 2006	0,82
Karaer et al., 2008	0,16
Bellver et al., 2010	0
Presente estudo	0,03

6 - DISCUSSÃO

Abortamentos espontâneos recorrentes são episódios estressantes na vida de um casal e freqüentemente mulheres que passaram por 3 ou mais abortamentos espontâneos apresentam vulnerabilidade, nervosismo e uma tendência a reações psicossomáticas, além de estados depressivos após os abortamentos (Lapple, 1989, Lapple, 1989). Desse modo a realização do diagnóstico das causas de AER é de fundamental importância não apenas para a profilaxia de abortamentos espontâneos no caso de futuras gestações, mas também para o conforto dos casais e diminuição de seqüelas psicossociais.

Os pacientes convidados a participar do presente estudo foram selecionados em virtude do histórico de abortamentos espontâneos e mediante a sua avaliação para a exclusão de fatores típicos de AER. Desse modo, os pacientes estudados podem ser agrupados junto àqueles casais cuja etiologia dos AER é desconhecida mesmo após extensa investigação, e que representam aproximadamente 50% de todos os casais com AER (Allison e Schust, 2009).

Esses casais cuja etiologia é desconhecida podem ser beneficiados com suplementação lútea, quando as perdas ocorrem até a 13ª semana de gestação; entretanto, a terapêutica mais factível e abrangente é o aconselhamento antenatal e o suporte psicológico aos casais (Ford e Schust, 2009). Portanto, a descoberta e confirmação de novas etiologias para abortamentos espontâneos recorrentes representam a possibilidade de desenvolvimento de novas terapêuticas para AER.

Evidências de que microdeleções do cromossomo Y podem ser uma das causas de AER foram produzidas por Dewan et al. em 2006 e Karaer et al. em 2008. Tal ilação tem como principal argumento favorável a alta frequência de microdeleções do cromossomo Y observada por Dewan et al. em 2006, já que 82% dos pacientes incluídos em seu estudo possuíam microdeleção de ao menos uma das quatro STS da região AZF investigadas (DYF85S, DYF86S, DYS220, e DYS262). Devido a alta frequência de ocorrência de microdeleções do cromossomo Y relatadas nesses casais optou-se pela não utilização de um grupo controle, pois julgava-se que as microdeleções também estariam presentes na amostra desse estudo.

Duas das STS estudadas na presente dissertação (DYS220 e DYS262) também foram investigadas pelo grupo de Chicago (Dewan et al 2006); e, dentre estas, a única STS ausente nos pacientes foi a STS220 ($f_{\text{afetado}} = 1/30$), e apresentou uma proporção significativamente menor que aquela do estudo referido ($f_{\text{Dewan et al}} = 9/14$).

Outro estudo, recentemente publicado por Karaer et al. em 2008, investigou microdeleções de 3 STS também pesquisadas na presente dissertação (DYS220, DYS235, DYS236) além de outra porção da região AZF, a STS DYS237; sendo que a maioria das microdeleções observadas também foi observada na STS DYS220. Esse estudo também evidenciou uma associação entre a microdeleção do cromossomo Y e o AER (Karaer et al 2008).

Ainda que esses estudos apoiem a hipótese de que as microdeleções do cromossomo Y podem ser causadoras de AER, não existem evidências ou comprovação direta de que a ausência desses pequenos trechos de DNA

possuam seqüências gênicas essenciais para o desenvolvimento de um indivíduo, ou que possam estar relacionadas a terminação precoce e espontânea de uma gestação (Sinclair et al, 1990).

A ligação dos AER com microdeleções do cromossomo Y é fundamentada por meio de estudos sobre a propensão de que indivíduos não azoospermicos com microdeleções do cromossomo Y tem de realizar a meiose I de maneira defeituosa, especialmente na inabilidade em desenvolver complexos sinápticos adequados e que permitam uma boa disjunção cromossômica durante a espermatogênese (Geoffroy-Siraudin et al, 2007, Perrin et al, 2006). Portanto, existe a possibilidade de que as falhas na espermatogênese provocadas devido as microdeleções do cromossomo Y gerem espermatozoides aneuplóides, mas com capacidade normal de fertilização e que por conseguinte aumentam as chances de produção de embriões aneuplóides e que resultam em abortamentos espontâneos.

Enquanto essa é uma explicação plausível para a microdeleção do cromossomo Y como etiologia dos AER; nossos dados não apóiam essa hipótese, uma vez que a freqüência de microdeleções do cromossomo Y em uma amostra selecionada de casais brasileiros com AER foi extremamente baixa e não permite a associação entre as duas entidades nosológicas.

Frente a esse resultado, a acepção inicial é a de que se deve refutar a hipótese das microdeleções do cromossomo Y como uma etiologia de AER. Porém, deve-se ter em conta que a presente dissertação foi planejada como um estudo observacional transversal de uma população que apresenta AER, já que esse desenho experimental permite uma abordagem completa da população estudada e cálculos mais precisos de associação entre os eventos

observados, nesse caso, a associação de abortamentos espontâneos recorrentes com as microdeleções do cromossomo Y (Nobre e Bernardo, 2006).

Entretanto, o desenho utilizado pode ser considerado não completo por possuir apenas indivíduos com causas de abortamento espontâneo desconhecidas. A impossibilidade de composição de uma tabela de contingência do tipo 2X2 diminui as chances de avaliação de associação entre as variáveis e pode induzir a algum tipo de vício de seleção. Ademais, uma vez que a coleta de dados é prospectiva para determinadas variáveis, e é retrospectiva para outras, este último tipo de obtenção de dados pode levar a erro de seleção de pacientes (Nobre e Bernardo, 2006).

Uma vez que os critérios e métodos de seleção de paciente podem influenciar nas frequências de microdeleções dos cromossomos Y observadas e ser responsável pela grande variação entre as frequências dos estudos já publicados (Dewan et al 2006, Karaer et al 2008) em relação a presente dissertação, esse pode ser um ponto importante de vício e influenciar os resultados obtidos. Essa potencial desvantagem do desenho empregado na presente dissertação contrapõe-se a restringência imposta pelos critérios de inclusão e que permite a avaliação do equilíbrio entre as proporções de homens com e sem microdeleções do cromossomo Y na amostra utilizada. A proporção de homens sem microdeleção é significativamente maior que a de com microdeleção e essa diferença entre as proporções foi tão acentuada que permitiu uma redução drástica no número de indivíduos incluídos na amostra e garantiu um poder de teste de 100%, enquanto o preconizado é de apenas 80%. Dessa forma a aceção inicial de que a hipótese da microdeleção do

cromossomo Y como uma etiologia de AER sem causa identificada deve ser refutada parece realmente a mais correta e recentemente foi publicado um estudo que apóia os dados encontrados na presente pesquisa, pois em uma amostra de pacientes com abortamentos espontâneos recorrentes não houve nenhum paciente apresentando microdeleção do cromossomo Y.

7 - CONCLUSÃO

7 - CONCLUSÃO

As microdeleções das STS DYS236, DYS235, DYS262 e DYS220 do cromossomo Y não causam abortamentos espontâneos recorrentes.

Tabela Geral de Pacientes - Masculina

	homem	idade	conc sem (milh ml)	motilidade A+B	kruger	deleção	testosterona	FSH	LH
1	x	32	27,3	57%	5	neg	452	4,3	6,2
2	x	28	18	38%	7	neg	533	6,4	2,4
3	x	44	22,7	66%	9	neg	322	3,3	5,4
4	x	33	44,9	88%	3	neg	554	5,4	3,2
5	x	53	15	62%	3	neg	279	8,7	6,7
6	x	27	33,2	53%	7	neg	444	4,7	4,3
7	x	30	25	52%	2	neg	753	4,1	2,3
8	x	33	17,3	44%	6	neg	631	6,2	3,8
9	x	36	37,6	50%	4	neg	322	3,9	5,5
10	x	38	15	49%	4	neg	397	4,7	6,4
11	x	38	26	33%	3	neg	402	5,1	4,8
12	x	36	12,3	54%	5	neg	444	8,3	4,2
13	x	31	19,9	39%	5	neg	321	2,3	7,8
14	x	32	23,5	42%	8	neg	435	4,4	4,2
15	x	31	16	53%	5	neg	444	7,3	3,9
16	x	44	43,1	38%	6	presente	389	6,2	4,1
17	x	43	28	63%	9	neg	401	6,5	4,7
18	x	40	25,9	59%	3	neg	473	4,8	3,7
19	x	39	22	49%	5	neg	475	8,6	5,2
20	x	32	18,7	55%	4	neg	396	4,7	5,7
21	x	39	37	55%	2	neg	766	6,1	3,1
22	x	37	22,7	43%	5	neg	543	3,9	3,8
23	x	36	17,3	44%	6	neg	318	7,3	4,4
24	x	35	29,3	56%	4	neg	378	3,2	5,6
25	x	28	30,7	67%	7	neg	445	4,3	5,7
26	x	29	13	48%	3	neg	418	6,4	3,9
27	x	32	22	44%	7	neg	302	7,3	3,6
28	x	33	25,2	53%	6	neg	503	3,5	4,9
29	x	34	33,7	38%	9	neg	415	4,7	6,2
30	x	34	23,1	63%	9	neg	412	4,9	5,6

Tabela Geral de Pacientes - Masculina

	homem	idade	conc sem (milh ml)	motilidade A+B	kruger	deleção	testosterona	FSH	LH
1	x	32	27,3	57%	5	neg	452	4,3	6,2
2	x	28	18	38%	7	neg	533	6,4	2,4
3	x	44	22,7	66%	9	neg	322	3,3	5,4
4	x	33	44,9	88%	3	neg	554	5,4	3,2
5	x	53	15	62%	3	neg	279	8,7	6,7
6	x	27	33,2	53%	7	neg	444	4,7	4,3
7	x	30	25	52%	2	neg	753	4,1	2,3
8	x	33	17,3	44%	6	neg	631	6,2	3,8
9	x	36	37,6	50%	4	neg	322	3,9	5,5
10	x	38	15	49%	4	neg	397	4,7	6,4
11	x	38	26	33%	3	neg	402	5,1	4,8
12	x	36	12,3	54%	5	neg	444	8,3	4,2
13	x	31	19,9	39%	5	neg	321	2,3	7,8
14	x	32	23,5	42%	8	neg	435	4,4	4,2
15	x	31	16	53%	5	neg	444	7,3	3,9
16	x	44	43,1	38%	6	presente	389	6,2	4,1
17	x	43	28	63%	9	neg	401	6,5	4,7
18	x	40	25,9	59%	3	neg	473	4,8	3,7
19	x	39	22	49%	5	neg	475	8,6	5,2
20	x	32	18,7	55%	4	neg	396	4,7	5,7
21	x	39	37	55%	2	neg	766	6,1	3,1
22	x	37	22,7	43%	5	neg	543	3,9	3,8
23	x	36	17,3	44%	6	neg	318	7,3	4,4
24	x	35	29,3	56%	4	neg	378	3,2	5,6
25	x	28	30,7	67%	7	neg	445	4,3	5,7
26	x	29	13	48%	3	neg	418	6,4	3,9
27	x	32	22	44%	7	neg	302	7,3	3,6
28	x	33	25,2	53%	6	neg	503	3,5	4,9
29	x	34	33,7	38%	9	neg	415	4,7	6,2
30	x	34	23,1	63%	9	neg	412	4,9	5,6

8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

[Laboratory manual of the WHO for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction]. *Ann Ist Super Sanita*. 2001; 37(1):I-XII, 1-123.

Revised 2003 consensus on diagnostic criteria and long-term health risks related to polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*. 2004; 81(1):19-25.

Abrao M. S., Goncalves M. O., Dias J. A., Jr., Podgaec S., Chamie L. P. and Blasbalg R. Comparison between clinical examination, transvaginal sonography and magnetic resonance imaging for the diagnosis of deep endometriosis. *Hum Reprod*. 2007; 22(12):3092-7.

Agulnik A. I., Zharkikh A., Boettger-Tong H., Bourgeron T., McElreavey K. and Bishop C. E. Evolution of the DAZ gene family suggests that Y-linked DAZ plays little, or a limited, role in spermatogenesis but underlines a recent African origin for human populations. *Hum Mol Genet*. 1998; 7(9):1371-7.

Allison J. L. and Schust D. J. Recurrent first trimester pregnancy loss: revised definitions and novel causes. *Curr Opin Endocrinol Diabetes Obes*. 2009; 16(6):446-50.

Ando N., Gorai I., Hirabuki T., Onose R., Hirahara F. and Minaguchi H. [Prolactin disorders in patients with habitual abortion]. *Nippon Sanka Fujinka Gakkai Zasshi*. 1992; 44(6):650-6.

Arredi B., Ferlin A., Speltra E., Bedin C., Zuccarello D., Ganz F. et al. Y-chromosome haplogroups and susceptibility to azoospermia factor c microdeletion in an Italian population. *J Med Genet*. 2007; 44(3):205-8.

Arruda J. T., Bordin B. M., Santos P. R., Mesquita W. E., Silva R. C., Maia M. C. et al. Y chromosome microdeletions in Brazilian fertility clinic patients. *Genet Mol Res*. 2007; 6(2):461-9.

Bellver J., Meseguer M., Muriel L., Garcia-Herrero S., Barreto M. A., Garda A. L. et al. Y chromosome microdeletions, sperm DNA fragmentation and sperm oxidative stress as causes of recurrent spontaneous abortion of unknown etiology. *Hum Reprod*. 2010;

Benachour N. and Aris A. Toxic effects of low doses of Bisphenol-A on human placental cells. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2009; 241(3):322-8.

Bosch E. and Jobling M. A. Duplications of the AZFa region of the human Y chromosome are mediated by homologous recombination between HERVs and are compatible with male fertility. *Hum Mol Genet*. 2003; 12(3):341-7.

Briton-Jones C. and Haines C. J. Microdeletions on the long arm of the Y chromosome and their association with male-factor infertility. *Hong Kong Med J*. 2000; 6(2):184-9.

Chang S. Y. and Tsai M. Y. Detection of azoospermic factor genes in Chinese men with azoospermia or severe oligozoospermia. *J Assist Reprod Genet.* 1999; 16(5):259-62.

Cocksedge K. A., Saravelos S. H., Metwally M. and Li T. C. How common is polycystic ovary syndrome in recurrent miscarriage? *Reprod Biomed Online.* 2009; 19(4):572-6.

Dendrinou S., Makrakis E., Botsis D., Chassiakos D., Baka S. and Creatsas G. A study of pregnancy loss in 352 women with recurrent miscarriages. *Arch Gynecol Obstet.* 2005; 271(3):235-9.

Dewan S., Puscheck E. E., Coulam C. B., Wilcox A. J. and Jeyendran R. S. Y-chromosome microdeletions and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril.* 2006; 85(2):441-5.

Fagerli J., Schneck F. X., Lee P. A., Bellinger M. F. and Witchel S. F. Absence of microdeletions in the Y chromosome in patients with a history of cryptorchidism and azoospermia or oligospermia. *Fertil Steril.* 1999; 71(4):697-700.

Ferras C., Fernandes S., Marques C. J., Carvalho F., Alves C., Silva J. et al. AZF and DAZ gene copy-specific deletion analysis in maturation arrest and Sertoli cell-only syndrome. *Mol Hum Reprod.* 2004; 10(10):755-61.

Ford H. B. and Schust D. J. Recurrent pregnancy loss: etiology, diagnosis, and therapy. *Rev Obstet Gynecol.* 2009; 2(2):76-83.

Foresta C., Ferlin A., Moro E., Marin P., Rossi A. and Scandellari C. [Microdeletion of chromosome Y in male infertility: role of the DAZ gene]. *Ann Ital Med Int.* 2001; 16(2):82-92.

Gatta V., Stuppia L., Calabrese G., Morizio E., Guanciali-Franchi P. and Palka G. A new case of Yq microdeletion transmitted from a normal father to two infertile sons. *J Med Genet.* 2002; 39(6):E27.

Geoffroy-Siraudin C., Akin-Seiffer I., Metzler-Guillemain C., Ghalamoun-Slaimi R., Bonzi M. F., Levy R. et al. Meiotic abnormalities in patients bearing complete AZFc deletion of Y chromosome. *Hum Reprod.* 2007; 22(6):1567-72.

George L., Granath F., Johansson A. L., Anneren G. and Cnattingius S. Environmental tobacco smoke and risk of spontaneous abortion. *Epidemiology.* 2006; 17(5):500-5.

Goud T. M., Mohammed Al Harassi S., Khalfan Al Salmani K., Mohammed Al Busaidy S. and Rajab A. Cytogenetic studies in couples with recurrent miscarriage in the Sultanate of Oman. *Reprod Biomed Online.* 2009; 18(3):424-9.

Jauniaux E., Farquharson R. G., Christiansen O. B. and Exalto N. Evidence-based guidelines for the investigation and medical treatment of recurrent miscarriage. *Hum Reprod.* 2006; 21(9):2216-22.

Karaer A., Karaer K., Ozaksit G., Ceylaner S. and Percin E. F. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and recurrent pregnancy loss. *Am J Obstet Gynecol.* 2008; 199(6):662 e1-5.

Kihaile P. E., Yasui A. and Shuto Y. Prospective assessment of Y-chromosome microdeletions and reproductive outcomes among infertile couples of Japanese and African origin. *J Exp Clin Assist Reprod.* 2005; 2(9).

Kirsch S., Weiss B., Miner T. L., Waterston R. H., Clark R. A., Eichler E. E. et al. Interchromosomal segmental duplications of the pericentromeric region on the human Y chromosome. *Genome Res.* 2005; 15(2):195-204.

Krausz C., Degl'Innocenti S., Nuti F., Morelli A., Felici F., Sansone M. et al. Natural transmission of USP9Y gene mutations: a new perspective on the role of AZFa genes in male fertility. *Hum Mol Genet.* 2006; 15(18):2673-81.

Krausz C., Rajpert-De Meyts E., Frydelund-Larsen L., Quintana-Murci L., McElreavey K. and Skakkebaek N. E. 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; 86(6):2638-42.

Kruger T. F., Acosta A. A., Simmons K. F., Swanson R. J., Matta J. F., Veeck L. L. et al. New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. *Urology.* 1987; 30(3):248-51.

Kuhnert B., Gromoll J., Kostova E., Tschanter P., Luetjens C. M., Simoni M. et al. Case report: natural transmission of an AZFc Y-chromosomal microdeletion from father to his sons. *Hum Reprod.* 2004; 19(4):886-8.

Kutteh W. H. and Triplett D. A. Thrombophilias and recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med.* 2006; 24(1):54-66.

Lapple M. [Diagnosis, counseling and psychotherapy in spontaneous abortion and recurrent spontaneous abortion and habitual abortion]. *Z Klin Psychol Psychopathol Psychother.* 1989; 37(3):277-90.

Lapple M. [Pilot study on assessing medical, psychological and psychosocial factors in stillbirth and spontaneous abortion and recurrent abortion]. *Wien Klin Wochenschr.* 1989; 101(19):666-73.

Lopez M., Torres L., Mendez J. P., Cervantes A., Alfaro G., Perez-Palacios G. et al. SRY alone can induce normal male sexual differentiation. *Am J Med Genet.* 1995; 55(3):356-8.

McElreavey K., Barbaux S., Ion A. and Fellous M. The genetic basis of murine and human sex determination: a review. *Heredity*. 1995; 75 (Pt 6):599-611.

Medicine P. C. o. t. A. S. f. R. Definitions of infertility and recurrent pregnancy loss. *Fertil Steril*. 2008; 90(5 Suppl):S60.

Pabinger I. Thrombophilia and its impact on pregnancy. *Thromb Res*. 2009; 123 Suppl 3(S16-21).

Pabuccu R., Atay V., Orhon E., Urman B. and Ergun A. Hysteroscopic treatment of intrauterine adhesions is safe and effective in the restoration of normal menstruation and fertility. *Fertil Steril*. 1997; 68(6):1141-3.

Perrin J., Metzler-Guillemain C., Karsenty G., Grillo J. M., Mitchell M. J. and Guichaoua M. R. Meiotic arrest at the midpachytene stage in a patient with complete azoospermia factor b deletion of the Y chromosome. *Fertil Steril*. 2006; 85(2):494 e5-8.

Pina-Neto J. M., Carrara R. C., Bisinella R., Mazzucatto L. F., Martins M. D., Sartoratto E. et al. Somatic cytogenetic and azoospermia factor gene microdeletion studies in infertile men. *Braz J Med Biol Res*. 2006; 39(4):555-61.

Potdar N. and Konje J. C. The endocrinological basis of recurrent miscarriages. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2005; 17(4):424-8.

Preutthipan S. and Linasmita V. Reproductive outcome following hysteroscopic treatment of the septate uterus: a result of 28 cases at Ramathibodi Hospital. *J Med Assoc Thai*. 2001; 84(2):166-70.

Propst A. M. and Hill J. A., 3rd. Anatomic factors associated with recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med*. 2000; 18(4):341-50.

Quintana-Murci L., Krausz C., Heyer E., Gromoll J., Seifer I., Barton D. E. et al. The relationship between Y chromosome DNA haplotypes and Y chromosome deletions leading to male infertility. *Hum Genet*. 2001; 108(1):55-8.

Rao V. R., Lakshmi A. and Sadhnani M. D. Prevalence of hypothyroidism in recurrent pregnancy loss in first trimester. *Indian J Med Sci*. 2008; 62(9):357-61.
Sadeghi-Nejad H. and Oates R. D. The Y chromosome and male infertility. *Curr Opin Urol*. 2008; 18(6):628-32.

SaoPedro S. L., Fraietta R., Spaine D. and Porto C. S. Prevalence of Y chromosome deletions in a Brazilian population of non-obstructive azoospermic and severely oligozoospermic men. *Braz J Med Biol Res* 2003; 36(6).

Saxena R., Brown L. G., Hawkins T., Alagappan R. K., Skaletsky H., Reeve M. P. et al. The DAZ gene cluster on the human Y chromosome arose from an autosomal gene that was transposed, repeatedly amplified and pruned. *Nat Genet*. 1996; 14(3):292-9.

Schlegel P. N. The Y chromosome. *Reprod Biomed Online*. 2002; 5(1):22-5.
Seifer I., Amat S., Delgado-Viscogliosi P., Boucher D. and Bignon Y. J. [Search for microdeletions in the long arm of chromosome Y in 48 infertile men]. *C R Seances Soc Biol Fil*. 1998; 192(4):725-32.

Shinka T. and Nakahori Y. The azoospermic factor on the Y chromosome. *Acta Paediatr Jpn*. 1996; 38(4):399-404.

Sierra S. and Stephenson M. Genetics of recurrent pregnancy loss. *Semin Reprod Med*. 2006; 24(1):17-24.

Sinclair A. H., Berta P., Palmer M. S., Hawkins J. R., Griffiths B. L., Smith M. J. et al. A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature*. 1990; 346(6281):240-4.

Stephenson M. and Kutteh W. Evaluation and management of recurrent early pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol*. 2007; 50(1):132-45.

Subrt I., Ulcova-Gallova Z., Bibkova K., Micanova Z., Hejnalova M., Cerna M. et al. Recurrent pregnancy loss and frequency of eight antiphospholipid antibodies and genetic thrombophilic factors in Czech women. *Am J Reprod Immunol*. 2008; 59(3):193-200.

Thielemans B. F., Spiessens C., D'Hooghe T., Vanderschueren D. and Legius E. Genetic abnormalities and male infertility. A comprehensive review. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 1998; 81(2):217-25.

Tiepolo L. and Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet*. 1976; 34(2):119-24.

Tsujimura A., Matsumiya K., Takao T., Miyagawa Y., Koga M., Takeyama M. et al. Clinical analysis of patients with azoospermia factor deletions by microdissection testicular sperm extraction. *Int J Androl*. 2004; 27(2):76-81.
Vogt P. H. Genomic heterogeneity and instability of the AZF locus on the human Y chromosome. *Mol Cell Endocrinol*. 2004; 224(1-2):1-9.

Vogt P. H., Edelmann A., Kirsch S., Henegariu O., Hirschmann P., Kiesewetter F. et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet*. 1996; 5(7):933-43.

Yen P. H., Chai N. N. and Salido E. C. The human autosomal gene DAZLA: testis specificity and a candidate for male infertility. *Hum Mol Genet*. 1996; 5(12):2013-7.

Zegers-Hochschild F., Adamson G. D., de Mouzon J., Ishihara O., Mansour R., Nygren K. et al. International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertil Steril*. 2009; 92(5):1520-4.

FONTES CONSULTADAS

FONTES CONSULTADAS

Windows Vista, Excel 2008

Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, Pós-Graduação.
Normatização para apresentação de dissertações e teses, São Paulo:
Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, Pós-Graduação;
2004.

Bibancos MR, Estudo multicêntrico sobre a frequência de microdeleções do cromossomo y entre casais com abortamentos espontâneos recorrentes 2010

Tese de Mestrado, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo

O abortamento espontâneo recorrente é definido como 3 ou mais perdas consecutivas. A investigação desses casos são muito focadas no fator feminino. Recentes trabalhos mostraram a importância do cromossomo Y na implantação e placentação embrionária. A frequência de deleções apresenta-se presente de 16 a 82%. Devido à literatura escassa e a discrepância de resultados resolvemos verificar a frequência encontrada. Todos os casais foram submetidos a avaliação dos mais variados fatores abortivos conhecidos como: anatômicos, distúrbios de coagulabilidade, hormonal e genético e os homens a espermogramas e dosagens hormonais. Amostras de DNA foram extraídas e purificadas e submetidas a PCR para sequenciamento dos sequence tagged sites (STS) DYS236, STS DYS235, STS DYS262 e STS DYS220 (as amostras foram testadas 2 vezes). Trinta casais tiveram histórico 3 a 5 abortos consecutivos e foram incluídos no nosso estudo. Mulheres de 25 a 36 anos (30 ± 3 anos) e homens de 27 a 53 anos (35 ± 6 anos). Todos os casais tiveram cariótipo com banda G normal. Mulheres com níveis séricos basais FSH (6 ± 1.5 IU/mL), LH (3.6 ± 1.1 IU/mL), estradiol (44.8 ± 13.6 ng/dL) e progesterona (5.9 ± 1.2 ng/mL); dihidroepiandrosterona (4.5 ± 1.2 ng/dL) dihidroepiandrosterona sulfato (198.8 ± 83.4 ng/dL) e testosterona (0.4 ± 0.2 ng/dL); glicemia (89 ± 7 mg/dL) e insulina (8.1 ± 4.1 mIU/L) foram normais. Todas as mulheres com ciclos menstruais normais e foram negativas para trombofilia e protrombina US com discreta adenomiose. As concentrações seminais entre 13.3×10^6 to 44.9×10^6 spz/mL ($24.6 \pm 8.7 \times 10^6$), motilidade entre 33% a 88% ($52 \pm 11\%$) e Kruger entre 2% a 9% ($5 \pm 1.9\%$). A frequência (f) of affected men (n=1; DYS 220; f afetados=0.04) foi significativamente menor que a frequência de não afetados (n=29; não afetados= 0.1; $p < 0.0001$). Nossa estatística foi conclusiva em não associar a presença de microdeleção nos casais abortadores recorrentes.

Recurrent pregnancy loss (RPL), defined as 3 or more consecutive abortions. Investigation of RPL causes are mainly focused on female factors; yet, recent reports implied microdeletions of Y-chromosome (MYC) to influence embryo development, implantation, and RPL. The frequencies of MYCs of sequence tagged sites of the AZF region in these reports varied from 16% to 82%. The limited number of studies and the discrepancy in the frequencies of MYC raises questions about the associative and causal relation of MYC to RPL. Our study aimed to determine the frequency and type of MYCs in a selected sample of couples suffering RPL in population to investigate the Y-chromosome involvement in these cases.

Materials and Methods: All couples were ruled out for anatomical, hormonal, inherited thrombophilias, and phospholipids syndrome. Also, we investigated karyotypes with G bands. All men were submitted to semen analysis and MYC test. DNA samples were extracted and purified with Illustra blood genomic-prep mini-spin kit (GE Healthcare, UK) and submitted to PCR for sequence tagged sites (STS) DYS236, STS DYS235, STS DYS262, and STS DYS220 yielding. Quantitative data were described as mean±standard deviation. Two- and one-sample Z tests were performed to compare the proportions of men presenting MYC to the proportion of men without microdeletion and to the proportion of affected men reported in the literature. Significance was attained at $p < 0.05$.

Results – Thirty couples who suffered from 3 to 5 consecutive abortions (3 ± 1 abortions) were included in this study. Women's age ranged from 25 to 36 years (30 ± 3 years) and men's age ranged from 27 to 53 years (35 ± 6 years). All couples had normal karyotypes with G banding. Women's basal serum FSH (6 ± 1.5 IU/mL), LH (3.6 ± 1 IU/mL), estradiol (44.8 ± 13.6 ng/dL) and progesterone (5.9 ± 1.2 ng/mL); dihydroepiandrosterone (4.5 ± 1.2 ng/dL) dihydroepiandrosterone sulphate (198.8 ± 83.4 ng/dL) and testosterone (0.4 ± 0.2 ng/dL); glycaemia (89 ± 7 mg/dL) and insulin (8.1 ± 4.1 mIU/L) were normal. All women had regular cyclic menses. All women were negative for thrombophilia and prothrombin transvaginal ultrasound diagnosed one patient with discrete adenomyosis. Sperm concentrations ranging from 13.3×10^6 to 44.9×10^6 spermatozoa/mL ($24.6 \pm 8.7 \times 10^6$), sperm motility ranged from 33% to 88% ($52 \pm 11\%$) and Kruger morphology ranged from 2% to 9% ($5 \pm 1.9\%$). The frequency (f) of affected men ($n=1$; DYS 220; $f_{affected}=0.04$) was significantly lower than the frequency of unaffected men ($n=29$; $f_{unaffected}=0.1$; $p < 0.0001$). The frequency of affected men was significantly lower than one reported frequency ($f_{reported1} = 0.82$; $p < 0.0001$) and tended to be lower than the other ($f_{reported2}=0.16$; $p=0.07$).

Conclusion: Microdeletions of Y-chromosome were not associated to recurrent pregnancy loss in this selected group of patients. Our findings are in disagreement with those reported in the literature regarding any association of Y-chromosome microdeletions with recurrent pregnancy loss.



IRMANDADE DA SANTA CASA DE MISERICÓRDIA DE SÃO PAULO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA EM SERES HUMANOS
 Rua Santa Isabel, 305 - 4º andar Santa Cecília CEP 01221-010 São Paulo -SP
 Fone Fax: 3337-0188 E-mail: eticamed@santacasasp.org.br

São Paulo, 26 de julho de 2007.

Projeto nº 075/07
 Informe este número para
 identificar seu projeto no CEP

Ilmo.(a).Sr.(a).

Dr.(a). Mauro Bibancos de Rosa
 Departamento de Obstetrícia e Ginecologia

O Comitê de Ética em Pesquisa da ISCMSP em reunião ordinária, dia **28/03/2007** e no cumprimento de suas atribuições, após revisão do seu projeto de pesquisa: **"Microdeleção do cromossomo Y e abortamento habitual"**, emitiu parecer inicial em pendência e nesta data enquadrando-o na seguinte categoria:

- Aprovado (inclusive o TCLE);**
- Com pendências** (há modificações ou informações relevantes a serem atendidas em 60 dias. Enviar as alterações em duas cópias);
- Retirado**, (por não ser reapresentado no prazo determinado);
- Não aprovado: e**
- Aprovado** (inclusive TCLE -Termo de Consentimento Livre e Esclarecido). e encaminhado para apreciação da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - MS -CONEP, a qual deverá emitir parecer no prazo de 60 dias. Informamos, outrossim, que, segundo os termos da Resolução 196/96 do Ministério da Saúde a pesquisa só poderá ser iniciada após o recebimento do parecer de aprovação da CONEP.

Prof. Dr. Daniel R. Muñoz
 Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa - ISCMSP

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](#)