



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu
Mestrado em Genética

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DA GLUTATIONA
S-TRANSFERASE M1 E T1 EM HOMENS COM
INFERTILIDADE IDIOPÁTICA**

Goiânia-GO

2009



UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu
Mestrado em Genética

**ANÁLISE DO POLIMORFISMO DA GLUTATIONA
S-TRANSFERASE M1 E T1 EM HOMENS COM INFERTILIDADE IDIOPÁTICA**

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

Orientanda: Ana Carolina Franco Finotti

Orientadora: Prof^ª. Dra. Katia Karina Verolli de Oliveira Moura

Goiânia-GO

2009

- F515a Finotti, Ana Carolina Franco.
Análise do polimorfismo da Glutathione S-Transferase M1 e T1 em homens com infertilidade idiopática / Ana Carolina Franco Finotti. – 2009.
90 f. : il.
- Dissertação (mestrado) – Universidade Católica de Goiás, Departamento de Biologia e Biomédicas, 2009.
“Orientadora: Prof^ª. Dra. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura”.
1. Infertilidade masculina. 2. Gene GSTM1. 3. Gene GSTT1. 4. Xenobiótico. 5. Polimorfismo gênico. I. Título.
CDU: 575.17:616.697(043.3)



UNIVERSIDADE
Católica
DE GOIÁS

PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 3946.1071 • Fax: (62) 3946.1073
www.ucg.br • prope@ucg.br

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM GENÉTICA
DEFENDIDA EM 19 DE JUNHO DE 2009 E APROVADA
PELA BANCA EXAMINADORA COM A NOTA

10,0 (dez inteiros —)

Dr^a. Kátia Karina Verolli de Oliveira Moura / MGene - UCG
(presidente orientadora)

Dr. Breno de Faria Vasconcellos – MGene – UCG
(membro interno)

Dr. Mauri Felix de Sousa - UFG
(membro externo)

*Ao meu eterno companheiro,
Bruno*

Agradecimentos

*Agradeço a **Deus** por sempre guiar as minhas escolhas, muitas vezes minha fonte de fé e persistência para enfrentar as dificuldades da vida;*

*Aos meus queridos pais **Hélio** e **Marta**, tenham certeza que parte desta vitória devo a vocês, que sempre me instruíram que somente os estudos me fariam alcançar os meus sonhos. **Mãe**, companheira, amiga tenho certeza que juntas sonhamos em alcançar mais esta vitória, então, a você só me resta eterna gratidão e orgulho de poder estar ao seu lado sempre! Obrigada por ser esta mãe tão especial e dedicada, tudo que tenho de bom nessa vida eu devo à você! Em breve estarei torcendo pela vitória do seu Doutorado e sei que vai ser brilhante. Te amo!!! ... **Pai**, somos muito iguais, mas ao mesmo tempo tão diferentes, obrigada por me distrair quando estive estressada e cansada de estudar, tenho muito orgulho de você e tenha certeza parte dessa longa jornada eu devo à você que jamais me deixou faltar nada.*

*Aos meus irmãos **Ana Paula** e **Tiago**, que muitas vezes tiveram que se adaptarem a minha maneira de estudar para que tudo desse certo. Você minha irmã, só me enche de orgulho, pois sempre tão dedicada em tudo o que faz e muitas vezes deixa de viver a sua própria vida para se dedicar aos estudos e aos seus pacientes. E você “brother”, parabéns pela sua conquista esse ano, você mereceu, muito obrigada por fazer de meus dias mais alegres e cheio de histórias estranhas, encantadoras, de um mundo em que só você conhece.*

*Ao meu marido, **Bruno**, meu amor, minha eterna gratidão, sempre muito amigo e companheiro. Nos momentos mais difíceis somente a sua voz e os seus conselhos me serviam de consolo. Quantas vezes caí e você me orientou que levantar, limpar a sujeira e seguir em frente seria a melhor opção e é por isso que hoje estou aqui concluindo mais uma etapa da minha vida. Recentemente iniciamos uma das etapas mais importante de nossas vidas, ou melhor a nossa família! Muito obrigada de coração, tenho certeza que você estará ao meu lado em outros grandes desafios. À você o meu amor incondicional!!!*

*Aos meus avos **Ana** e **Hélio**, pois foram os primeiros a me darem apoio de iniciar o mestrado. Sempre me ajudaram a acreditar que no final haveria uma recompensa e somente as conquistas árduas nos fazem crescer. A minha avó **Tereza**, que de uma forma humilde e carinhosa fazia as refeições mais gostosas para que eu pudesse dar continuidade aos meus estudos e sempre me fez acreditar que eu seria capaz de seguir em frente e alcançar os meus sonhos.*

*A **Bisa**, aí que saudades de você, da sua doce e delicada voz! Sei que você esta em um mundo melhor, acompanhada por anjos, e com certeza torcendo por mim, pela minha vitória, tudo que sou nesta vida devo a você que sempre nos educou de uma forma rígida, mas ao mesmo tempo tão amável. Reze por mim e ilumine os meus passos. Mais cedo ou mais tarde nós vamos nos encontrar, tenho certeza!*

*Aos meus sogros **José Roberto** e **Maria Amélia**, sempre muito calmos e preocupados com o meu bem estar, tentavam me acalmar e*

me mostrar que eu seria capaz de alcançar os meus objetivos. Vários foram os almoços de sábado regados a conselhos e brincadeiras do Zezão. Muito obrigada por me tratarem com tanto carinho e acreditarem no meu potencial.

A Prof.^a Kátia Karina Verolli de O Moura, primeiramente pela amizade adquirida ao longo desses dois anos de mestrado. Muito obrigada por me orientar e ao mesmo tempo me despertar o gosto pela pesquisa, pois sempre muito amiga e “maezona” de todos, me fez conduzir o mestrado de uma forma tranqüila. Espero ter novas oportunidades de trabalhar ao seu lado, pois tenho muito orgulho de você e a admiro como profissional e pessoa. Eternamente grata!

A Jalsi, pela amizade que foi construída ao longo de tardes e tardes nas bancadas. Vários foram os nossos acertos e também os erros. Muito obrigada por me deixar mais confiante quando acreditava que nada daria certo.

*Aos amigos que fiz durante o mestrado e outros que já faziam parte do meu ciclo de amizade; **Circuncisto Júnior, Constanza, Cristiano, Bárbara Mariotto, Rosângela, Gerusa, Rodrigo Egídio**; com certeza de uma forma ou de outra vocês contribuíram para a realização deste sonho.*

A todos vocês muito obrigada!

*“Existem apenas duas maneiras de ver a vida.
Uma é pensar que não existem milagres
e a outra é que tudo é um milagre”*

Albert Einstein

Resumo

A infertilidade é um problema significativo na população mundial, afetando mais de 15% dos casais em idade reprodutiva. Isoladamente o homem contribui com 50% na infertilidade conjugal. As causas genéticas são responsáveis por 60% dos casos de infertilidade idiopática. O polimorfismo em genes que codificam enzimas detoxificantes de fase II pode alterar sua expressão ou função, modificando o biometabolismo de compostos tóxicos ao sistema reprodutor masculino. Os genes *GSTM1* e *GSTT1* codificam enzimas de mesmo nome, são fundamentais no processo de detoxificação dos xenobióticos endógenos ou exógenos, facilitando sua excreção. O objetivo principal do presente estudo foi detectar o polimorfismo dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em homens com infertilidade idiopática pelo Serviço de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas de Goiânia (HC), segundo o laudo dos espermogramas. Ao total foram avaliadas 304 amostras de pacientes com idade entre 15 e 69 anos, diagnosticados com infertilidade idiopática, no período de 2004 a 2006. Os resultados observados em amostras de DNA de sêmen, freqüências genotípicas de 28,6% (30/105) para o genótipo *GSTM1/T1*(nulo) em indivíduos normais e 50% (6/128) para o *GSTM1/T1*(nulo) em indivíduos alterados, demonstrando significativa relação estatística entre o polimorfismo do gene *GSTM1* e *GSTT1* com a infertilidade masculina idiopática. A alteração seminal associada ao genótipo polimórfico de maior freqüência *GSTM1/T1* (nulo) é a alteração de número (oligozoospermia) possuindo maior freqüência tanto para *GSTM1* (nulo) (78,9%) quanto *GSTT1* (nulo) (73,7%), apesar de não ser significativa. Analisando as freqüências genotípicas das amostras de sangue não encontramos associações estatísticas com a infertilidade masculina, já que 46,6% (34/76) são *GSTM1/T1* (nulo) em indivíduos normais e 58,4% (73/125) são *GSTM1/T1* (nulo) em indivíduos alterados. Não foi encontrada influência significativa do consumo de álcool, cigarro, caxumba e uso de xenobióticos analisados nos parâmetros básicos dos espermogramas analisados. Indivíduos polimórficos para os genes *GSTM1* e *GSTT1* estão mais susceptíveis a redução na qualidade seminal e possivelmente infertilidade, sendo que indivíduos oligospermicos são os mais afetados pelo polimorfismo gênico.

Palavras-chave: *GSTM1*, *GSTT1*, infertilidade, masculina, xenobióticos

Abstract

The infertility is a significant problem in the world-wide population, more than affecting 15% of the couples in reproductive age. Separately the man contributes with 50% in the conjugal infertility. The genetic causes are responsible for 60% of the cases of idiopathic infertility. The polymorphisms in genes that codify enzymes of phase II detoxificant can modify its expression or function, modifying the biometabolism of toxic composites to the male reproductive system. Genes *GSTM1* and *GSTT1* they codify enzymes of same name, they are basic in the process of detoxification of the endogenous or exogenous xenobiotics, facilitating its excretion. The aim of the present study was to detect the polymorphism of genes *GSTM1* and *GSTT1* in men with idiopathic infertility for the Service of Reproduction Human being of the Hospital das Clínicas de Goiânia (HC), according to finding of the spermograms. To the total 304 samples of patients with age between 15 had been evaluated - 69 years, diagnosis with idiopathic infertility, in the period of 2004 - 2006. The results had observed in samples of DNA of semen gen frequencies of 28,6% (30/105) for genotype *GSTM1/T1* (null) in normal individuals and 50,0% (6/128) for the *GSTM1/T1* (null) in abnormal individuals, demonstrating to significant relation statistics enters the polymorphism of gene *GSTM1* and *GSTT1* with the idiopathic male infertility. The seminal alteration associate to the polymorphic genotype of higher frequency *GSTM1/T1* (null) does the number alteration (oligozoospermia) possessing bigger frequency in such a way for *GSTM1* (78.9%) as well as for *GSTT1* (73.7%), although not to be significant. Analyzing the genotype frequencies of the samples of blood we do not find statistical associations with male infertility, since 46.6% (34/76) are *GSTM1/T1* (null) in normal individuals and 58, 4% (73/125) are *GSTM1/T1* (null) in abnormal individuals. Significant influence of the consumption of alcohol, cigarette, mumps and use of xenobiotics analyzed in the basic parameters of the analyzed spermogram was not found. Polymorphic individuals for genes *GSTM1* and *GSTT1* are susceptible the reduction in the seminal quality and infertility, possibly being that oligospermic individuals are affected by the genic polymorphism.

Keywords: *GSTM1*, *GSTT1*, infertility, male, xenobiotics

Lista de Figuras

Figura 1: Desenho esquemático mostrando as fases da espermatogênese e seus diferentes tipos celulares (Fonte: Moreira., 2002).....	22
Figura 2: Representação das duas fases de detoxificação dos xenobióticos. Compostos lipofílicos passam pela ativação metabólica através das enzimas de fase I, na qual introduz um centro reativo na molécula, em seguida ocorre à reação de conjugação de fase II, resultando em um produto solúvel em água. A formação de grandes quantidades de reativos metabólicos intermediários produz efeitos citotóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e imunopatológicos (Fonte: Schuppe et al., 2000).....	37
Figura 3: Localização dos genes da família GST classe Mu, no cromossomo 1, representação do alelo selvagem e deleção completa do gene <i>GSTM1</i> (Fonte: Parl., 2005).....	42
Figura 4: Localização dos genes da família GST classe Teta, no cromossomo 22, representação do alelo selvagem e deleção completa do gene <i>GSTT1</i> (Fonte: Parl., 2005).....	44
Figura 5: Conceito para avaliação das desordens quimicamente induzidas na função reprodutiva masculina. Os xenobioticos podem reagir isoladamente e ter efeito direto via interação covalente com macromoléculas celulares ou se ligarem a receptores hormonais e agirem como disruptores endócrinos. Efeitos indiretos podem ocorrer através de dois mecanismos, ou seja, reações bioquímicas no metabolismo de xenobioticos ou respostas imunes adquiridas específicas e inatas, e também através da interação entre os dois sistemas (Fonte: Schuppe et al., 2000).....	47
Figura 6: Gel de agarose a 1,5% indicando resultado da genotipagem do gene <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> . 01: <i>GSTT1</i> positivo; 02: <i>GSTM1</i> / <i>GSTT1</i> nulos; 03: <i>GSTM1</i> / <i>GSTT1</i> positivos; 04: <i>GSTM1</i> positivo; M: ladder (50 pb) RH92600: controle endógeno da reação.....	52

Lista de Tabelas

Tabela I- Valores referênciais de normalidade seminal.....	23
Tabela II- Principais causas e Incidências da Infertilidade Masculina.....	25
Tabela III- Protocolo referente à composição química e concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR - NPR 2008.....	51
Tabela IV- Características moleculares dos primers RH92600, GSTM 1 e GSTT1- NPR 2008.....	51
Tabela V- Protocolo de ciclagem das reações de PCR Multiplex - NPR 2008.....	52
Tabela VI- Comparação entre a média de idade dos pacientes normais e pacientes alterados - Laboratório de Reprodução Humana do HC 2004 – 2006.....	54
Tabela VII- Distribuição fenotípica entre os pacientes estudados baseado no laudo do espermograma - Laboratório de Reprodução Humana do HC 2004 – 2006.....	54
Tabela VIII- Distribuição da frequência genotípica das amostras de sêmen dos pacientes do grupo normal e alterado – NPR 2008.....	55
Tabela IX- Distribuição da frequência genotípica das amostras de sangue dos pacientes do grupo normal e alterado - NPR 2008.....	56
Tabela X- Comparação entre o polimorfismo <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> das amostras pareadas de sangue e sêmen dos pacientes normal e alterado - NPR 2008.....	56
Tabela XI - Comparação entre o polimorfismo <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> das amostras	

de sangue e sêmen dos pacientes normais - NPR 2008.....	57
Tabela XII - Comparação entre o polimorfismo <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> das amostras de sangue e sêmen dos pacientes alterados – NPR 2008.....	57
Tabela XIII – Relação entre o genótipo das amostras de sêmen dos pacientes alterados e os resultados dos exames de espermograma – NPR 2008.....	58
Tabela XIV - Relação entre o genótipo das amostras de sangue dos pacientes alterados e os resultados dos exames de espermograma – NPR 2008.....	59
Tabela XV – Distribuição independente do genótipo <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> de pacientes do grupo alterado, tanto para amostras de sêmen como de sangue – NPR 2008.....	60
Tabela XVI – Distribuição independente do genótipo <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> de pacientes do grupo alterado, para amostras de sangue – NPR 2008.....	61
Tabela XVII - Comparação das variáveis nos grupos estudados – NPR 2008.....	62

Lista de Siglas, Símbolos e Abreviaturas

α	Alpha
μ	Mi
π	Pi
θ	Theta
σ	Sigma
ζ	Zeta
+	Mais
<	Menor
>	Maior
±	Mais ou Menos
≥	Maior ou igual
°C	Graus Celsius
A	Arginina
AZF	Fator de azoospermia (<i>Azoospermia Factor</i>)
C	Citosina
CBAVD	Ausência Congênita Bilateral dos Vasos Deferentes (<i>Congenital Bilateral Absence of the Vas Deferens</i>)
CFTR	Gene regulador da condutância transmembrana da fibrose cística (<i>Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene</i>)
cm	Centímetro
CEP	Comitê de Ética em Pesquisas
CUAVD	Ausência Congênita Unilateral dos Vasos Deferentes (<i>Congenital Unilateral Absence of the Vas Deferens</i>)
CYP	Citocromo P450
DDT	Dicloro-Difenil-Tricloroetano
DAZ	Gene Deleted in Azoospermia
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
dNTP	Deoxi-nucleotídeo trifosfato
DP	Desvio Padrão
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético (<i>Ethylenediamine Tetracetic Acid</i>)
EtBR	Brometo de etídio

EUA	Estados Unidos da América
FC	Fibrose Cística
FSH	Hormônio Folículo Estimulante
G	Guanina
GnRH	Hormônio liberador de gonadotrofinas
GSH	Glutathiona reduzida
GST	Glutathiona S-transferase
H₂O	Água
HC	Hospital das Clínicas de Goiânia
HPA	Hidrocarbonetos Policíclicos Aromáticos
HPV	Papilomavírus Humano (<i>Human Papilloma Virus</i>)
kb	Kilo base (1kb = 1000)
LH	Hormônio luteinizante
MgCl	Cloreto de Magnésio
mL	Mililitro
mM	Milimolar
N	Número amostral
NAT	N-Acetil transferase
NPR	Núcleo de Pesquisas Replicon
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Braço cromossômico longo
<i>p</i>	Valor probabilístico de significância
pb	Par de base
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PGH	Projeto Genoma Humano
pH	Potencial de Hidrogênio Ionizável
pMol	Picomol
q	Braço cromossômico curto
RA	Reprodução Assistida
r.p.m	Rotação por minuto
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SIA	Síndrome de Instabilidade aos Andrógenos
SNP	Polimorfismo de Único Nucleotídeo (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>)

T	Tirosina
Taq	Enzima Taq Polimerase
TBE	Tris Borato EDTA
TRA	Técnicas de Reprodução Assistida
U	Unidade de atividade enzimática
UCG	Universidade Católica de Goiás
UFG	Universidade Federal de Goiás
V	Volts
ng	Nanograma
SPTZ	Espermatozóides
□2	Teste Qui-Quadrado

Índice

Dedicatória.....	v
Agradecimentos.....	vi
Epígrafe.....	ix
Resumo.....	x
Abstract.....	xi
Lista de Figuras.....	xii
Lista de Tabelas.....	xiv
Lista de Siglas, Símbolos e Abreviaturas.....	xvii
1. Introdução.....	20
1.1 Anatomia e Fisiologia do Aparelho Reprodutor Masculino.....	21
2. Espermograma.....	23
3. Causas da Infertilidade Masculina.....	23
4. Genética da Infertilidade.....	28
4.1 Alterações Cromossômicas.....	29
4.2 Mutações Gênicas.....	31
4.3 Microdeleções do cromossomo Y.....	33
5. Xenobióticos e Infertilidade.....	34
5.1 Fases da biotransformação.....	36
5.2 Metabolismo e Polimorfismo Gênico.....	38
5.3 Superfamília da Glutathione S-Transferase (GST).....	40
5.4 ROS, GST, Infertilidade.....	45
6. Objetivos.....	49

6.1 Geral.....	49
6.2 Específicos.....	49
7. Metodologia	50
7.1 Grupo Amostral.....	50
7.2 Coleta e Armazenamento das amostras.....	50
7.3 Espermograma.....	50
7.4 Extração de DNA das amostras em estudo.....	50
7.5 Genotipagem dos <i>GSTM1</i> e <i>GSTT1</i> pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR.....	51
7.6 Análise Estatística.....	53
8. Resultados.....	54
9. Discussão.....	63
10. Conclusão.....	70
11. Referências Bibliográficas.....	71
Anexo I. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	86
Anexo II. Consentimento da participação da pessoa como sujeito.....	88
Anexo III. Questionário Informativo.....	89
Anexo IV. Parecer Comitê de Ética.....	91
Anexo VI. Laudo de Espermograma.....	92;;

Introdução

Um número crescente de casais tem procurado os serviços de Reprodução Assistida (RA) para avaliação e tratamentos de infertilidade, especialmente porque muitos casais adiam o sonho de terem um filho a fim estabelecer primeiro suas carreiras (Quallich., 2006).

As técnicas modernas de fertilização *in vitro* renovaram a inquietude dos pesquisadores sobre a eficiência da reprodução humana normal. Pôde ser demonstrado que a taxa de concepção em um casal jovem e são, com relações sexuais frequentes, sem medidas contraceptivas, é de aproximadamente 45%. Mas a taxa de gestações viáveis reduz-se a 25% por ciclo se considerarmos que 10% das concepções se perdem de forma inaparente com a menstruação e outros 10% com o aborto clínico. Desta maneira, em condições normais, um casal pode conseguir uma gestação que culmine em um filho vivo “bebe em casa” em somente 25% das tentativas, o que é uma porcentagem baixa (Samrsla et al., 2007).

A infertilidade é definida como a falta de gestação clínica ou hormonal após 12 ou 24 meses de relações sexuais normais, sem o uso de métodos contraceptivos (Jardim et al., 2003; Shefi., 2006). Ela é um fenômeno universal e suas estimativas não são muito precisas e atualizadas e variam muito em uma região geográfica, independentemente dos fatores socioeconômicos ou culturais (Pasqualotto., 2007). Aproximadamente de 10 a 15% dos casais experimentam algum problema de infertilidade durante sua vida fértil. Extrapolando para a população mundial, representam entre 50 e 80 milhões de pessoas afetadas pela infertilidade (OMS., 1999; Hruska et al., 2000; Pasqualotto ., 2007).

Apesar de a infertilidade ser causada por diferentes fatores, a causa maior de infertilidade se deve à anormal produção de espermatozóides e/ou oócitos, defeitos tubários ou endometriose. Mesmo assim, ainda há uma significativa quantidade de infertilidade inexplicável ou infertilidade idiopática (Shefi et al., 2006). Recentes estudos demonstram que fatores ambientais possuem potencial para alterar tecidos reprodutivos masculinos e femininos e conseqüentemente afetam a capacidade reprodutiva do indivíduo (Hruska et al., 2000). O crescente desenvolvimento industrial e tecnológico dos centros urbanos tem contribuído para produção e o manuseio de muitos destes compostos tóxicos ao aparelho reprodutor (De Carvalho et al., 2002).

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS., 2001) a infertilidade masculina acomete aproximadamente 14% dos casais. O homem participa como fator causal, isolado e conjugal, em metade dos casos. Assim a chance de um homem ter problemas de fertilidade é da ordem de 7% dos casais em idade reprodutiva (De Kretser et al., 1999). Segundo a OMS, a taxa média de infertilidade masculina na população mundial é de 5,6% a 6,4% (ASRM., 2004).

Isoladamente o homem contribui com 50% na infertilidade conjugal (Devoto et al., 2000; Nudell et al., 2001; Maduro et al., 2002; Ferrás et al., 2004; Shefi et al., 2006). O fator masculino na infertilidade tem se tornado cada vez mais importante na investigação de casais inférteis. Tal fato representa uma queda considerável na qualidade do sêmen entre indivíduos saudáveis e jovens nos últimos anos em diferentes regiões no mundo (Schuppe et al., 2000). A infertilidade masculina não consiste em uma doença, mas sim em uma síndrome multifatorial que abrange uma grande variedade de desordens, que podem ser congênitas ou adquiridas (Maegawa et al., 2000).

1.1 Anatomia e Fisiologia do Aparelho Reprodutor Masculino

O aparelho reprodutor masculino é constituído das seguintes estruturas: pênis, uretra, 2 testículos (alojados no interior de uma bolsa denominada escroto), 2 canais deferentes, túbulos seminíferos, túbulos retos, túbulos eferentes, epidídimos e glândulas acessórias incluindo a próstata, glândulas bulbouretrais, 2 vesículas seminíferas (Kerr., 1992; Gooren., 1998; Moore., 2000).

A função endócrina do testículo é regulada pelo eixo hipotálamo-hipofisário através da interação do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH) com a hipófise e desta com o testículo (FSH e LH) fechando-se o circuito endócrino com a produção de testosterona, inibina e espermatozóides (Achermann et al., 2002). Como a mulher, o homem produz dois tipos de gonadotrofinas: FSH - hormônio folículo estimulante e LH - hormônio luteinizante. Assim, estes dois hormônios participam diretamente do controle endócrino da espermatogênese (De Carvalho et al., 2002).

A espermatogênese é o processo de diferenciação e maturação da espermatogônia (célula indiferenciada situada na porção basal dos túbulos seminíferos) em espermatozóides (Devoto et al., 2000). Na fase inicial as espermatogônias são submetidas a sucessivas divisões mitóticas dando origem ao “pool” de espermatócitos primários e

secundários. Os espermatócitos primários sofrem duas divisões meióticas e originam os espermatócitos secundários; estes dão origem às espermátides, que possuem um conjunto haplóide de cromossomos (Houillon, 2001). Segundo Cooke et al., (2002) as espermátides sofrem maturação posterior a (espermiogênese) o que envolve alterações nucleares, formação do acrossoma, desenvolvimento flagelar e redistribuição citoplasmática até formar o espermatozóide (Figura 1). A espermatogênese, desde a origem das espermatogônias até a formação dos espermatozóides, passando pela espermiogênese, ocorre em aproximadamente dois meses (De Araujo et al., 2007).

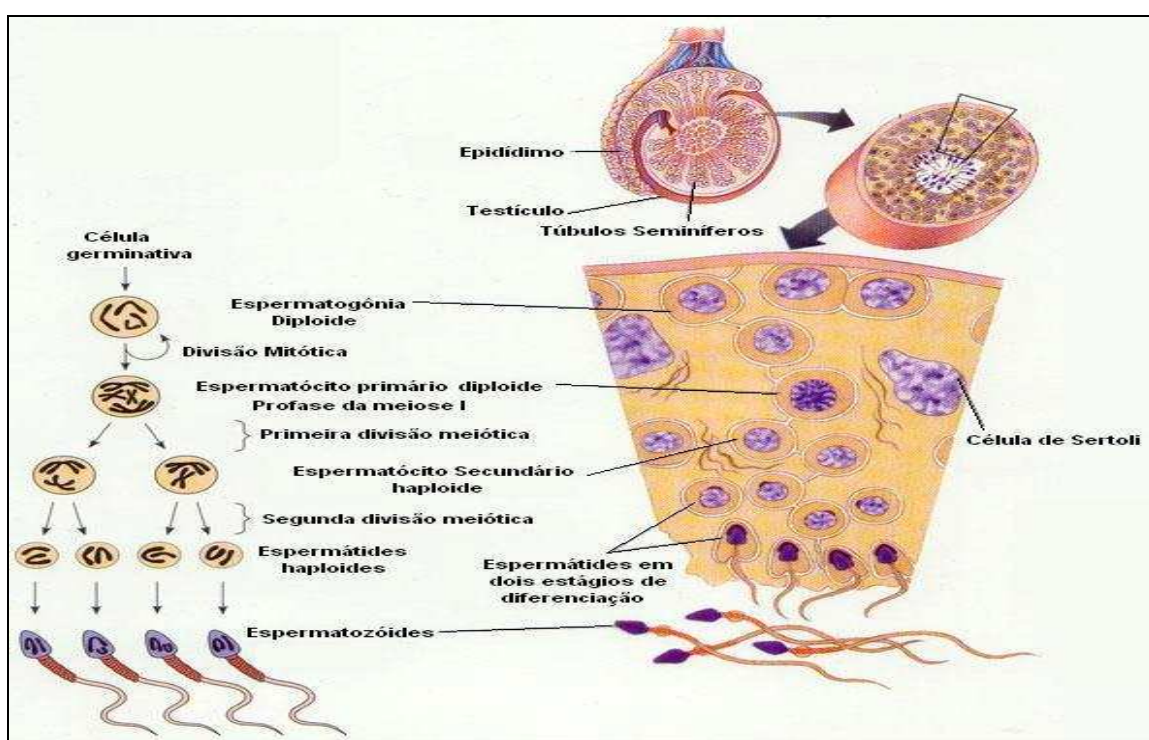


Figura 1: Desenho esquemático mostrando as fases da espermatogênese e seus diferentes tipos celulares. (Fonte: Moore., 2000)

A espermatogênese ocorre em todos os tubos seminíferos, durante a vida sexual ativa, iniciando-se, em média, aos 13 anos, em consequência do estímulo dos hormônios gonadotróficos adeno-hipofisários e prosseguindo durante todo resto da vida (Wassarman et al., 2001; Huynh et al., 2002).

A infertilidade masculina está relacionada com a produção de espermatozóides e é constatada inicialmente através de alterações encontradas no espermograma (Huynh et al., 2002). A avaliação do sêmem é importante para a detecção de várias alterações (Arruda et al., 2007). Segundo Pasqualotto., (2007), a fertilidade de um homem não necessariamente é

mensurada pelo resultado de um espermograma, mas caso a análise seminal esteja alterada, este exame permite a conclusão de que a fertilidade está inferior em relação aos parâmetros de normalidade seminal.

2. Espermograma

A análise seminal (espermograma) é geralmente o primeiro e o mais comum teste realizado na investigação da infertilidade masculina (Bolarine et al., 2003) e avaliação da toxicidade reprodutiva de agentes ambientais ou terapêuticos (Guzick et al., 2001). Este teste baseia-se nos parâmetros seminais estabelecidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS., 1999). Alguns autores defendem a idéia de que a análise do sêmen fornece informações prognósticas limitadas sobre a fertilidade (Branigan et al., 1999; Tomlinson et al., 1999; Guzick et al., 2001). A análise ideal da fertilidade masculina deverá fornecer dados concretos a respeito da avaliação funcional do espermatozóide, assim como a concentração, motilidade e morfologia (Oehninger et al., 2000).

Os critérios de normalidade para avaliação seminal, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS., 1999), baseiam-se na experiência clínica de muitos investigadores que estudaram populações de homens férteis saudáveis. Abaixo seguem os valores referenciais segundo a OMS., (1999) [Tabela I]:

Tabela I- Valores referenciais de normalidade seminal

Parâmetros	Valores Referenciais
Volume	2,0 – 5,0 mL
pH	> 7,2
Concentração	≥ 20 milhões/mL
Motilidade	≥ 50% com motilidade A + B ou ≥ 25% exibindo progressão rápida (grau A) após 60 minutos da ejaculação
Vitalidade	≥ 75% vivos, excluindo os mortos
Morfologia (Estrita Krugüer)	≥ 14% com morfologia normal
Viscosidade	< 3 (escala 0-4)
Leucócitos	< 1 x 10 ⁶ / mL
Aglutinação espermática	< 2 (escala 0-3)

(Fonte: OMS., 1999)

3. Causas da Infertilidade Masculina

A infertilidade masculina é considerada o maior problema de saúde em todo o mundo, correspondendo a 20% e com prevalência nos países ocidentais, (Vogt., 2004).

Antes de se discutir a propedêutica do fator masculino, é importante considerar as principais causas que acarretam a infertilidade do homem e sua fisiopatologia (Hirsh., 2003). A maioria dos indivíduos inférteis são saudáveis, assintomáticos e têm poucas alterações no exame físico. No entanto, a infertilidade pode ser a manifestação inicial de uma doença sistêmica, pois os homens inférteis podem apresentar oligozoospermia (redução no número de espermatozóides, inferior a 20×10^6 espermatozóides/mL), astenozoospermia (motilidade inadequada), teratozoospermia (espermatozóides com morfologia anormal), azoospermia (falta de espermatozóides no ejaculado) ou necrozoospermia (vitalidade dos espermatozóides alterada) (Maegawa et al., 2000; Huynh et al., 2002; Queiroz et al., 2006). Em aproximadamente metade dos casos de casais inférteis uma destas alterações seminais está presente, e elas acometem 90% dos homens inférteis (Huynh et al., 2002).

Acredita-se que alguns destes defeitos possam ser causados pela deficiência de gonadotropinas, aberrações cromossômicas, desordens genéticas, drogas, infecções genitais e doenças auto-imunes, entre outras (De Carvalho et al., 2002).

Anatomicamente as causas da infertilidade masculina podem ser categorizadas em 5 grupos (Abdelmassih., 2003):

- **Causas Pré-Testiculares:** constituem a maioria das enfermidades, tendo como conseqüência as alterações no eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal e são de origem hereditária. Alguns exemplos: Síndrome de Kallman, Deficiência isolada de LH, Deficiência isolada de FSH, Cirrose hepática, Diabetes Mérito;

- **Causas Testiculares:** são conseqüentes de alterações na espermatogênese propriamente dita, ou seja, na produção dos espermatozóides e seu amadurecimento e também enfermidades nas células e órgãos responsáveis pelo correto funcionamento da produção de espermatozóides (falência testicular primária). Alguns exemplos: Síndrome de Klinefelter, Síndrome de XYY, Miscelânia (mosaico genético), Anorquia bilateral, Síndrome de Noonan, Varicocele, Distrofia miotômica, Orquite, Criptorquidia, Aplasia germinal (Síndrome de solo de células de Sertoli);

- **Causas Pós-Testiculares:** são devido aos distúrbios no transporte espermático, tais como: obstrução mecânica, infecção, cirurgias, impotência, distúrbios na ejaculação usualmente envolvendo deleções ou mutações de genes específicos, tipicamente autossômicos. Na maioria das vezes esses transtornos são hereditários, ainda que possam surgir mutações espontâneas. Também podem ser causada por distúrbios na função

espermática, tais como: deficiência na maturação, anormalidades bioquímicas no plasma seminal, defeitos genéticos na cauda do espermatozóide. E ainda podem ser causadas por alterações da motilidade espermática. Alguns exemplos: CFTR, Síndrome de Young;

- **Causas Imunológicas:** seu mecanismo de ação se caracteriza por atuação de macrófagos, de citotoxicidade espermática, do decréscimo da concentração e motilidade espermáticas. Alguns exemplos: leucocitospermia, auto-imunidade (anticorpos anti-espermatozoides), estresse oxidativo, estes processos podem ser adquiridos quando ocorrem traumas, infecções, cirurgias;

- **Causas por infecções genitourinárias:** a infecção do trato masculino por bactérias influi principalmente no quadro quantitativo e qualitativo do espermograma. Exemplo: uretrites causadas por infecção através das bactérias gram-negativas, *Chlamydia trachomatis* e *Ureaplasma urealyticum*.

Segundo Taitson (2007), tais alterações na produção dos espermatozoides podem estar relacionadas, por sua vez, a uma das 16 principais causas preconizadas pela Organização Mundial de Saúde (1999), na tentativa de explicar a infertilidade em homens (Tabela II).

Tabela II- Principais causas e Incidências da Infertilidade Masculina

Causas	Incidências
Varicocele	49 %
Oligospermia idiopática	15 %
Infecções das glândulas sexuais acessórias	10 %
Causas sistêmicas	3 %
Causas endócrinas	1 %
Inadequação sexual / ejaculatória	2 %
Astenozoospermia idiopática	3 %
Anormalidades congênitas	2 %
Anormalidades genéticas	1 %
Teratozoospermia idiopática	6 %
Fator imunológico	2 %
Anormalidades do plasma seminal	2 %
Causa iatrogênicas	1 %
Azoospermia obstrutiva	1,5 %
Necrozoospermia idiopática	1,2 %
Outras causas	0,3 %

** O estudo da OMS envolveu seis países europeus (Fonte: Taitson., 2007)

Varicocele é considerada a causa mais freqüente de infertilidade masculina. É um grande exemplo de que uma patologia pode alterar a qualidade seminal com o passar dos anos (Jarow., 2001). Apesar de estar presente em 15% a 23% da população em geral, ela acomete 30% a 41% dos homens que procuram um serviço de medicina reprodutiva com infertilidade primária e até 80% dos homens com infertilidade secundária (Saleh et al., 2002; Pasqualotto et al., 2006; Wu et al., 2008); sendo definida como uma anormal dilatação das veias testiculares ou conjunto de veias do plexo pampiniforme (Rao et al., 2004). Um outro fator associado a pacientes com varicocele é o aumento de espécies reativas de oxigênio (ROS) no plasma seminal, devido à redução da capacidade antioxidante e como consequência aumento dos danos ao DNA espermático (ex. fragmentação espermática) [Naughton et al., 2001; Chen et al., 2002; Saleh et al., 2002].

Apesar de estar associada á anormalidades testiculares há vários anos, a varicocele ainda possui um papel incerto na infertilidade masculina. Indivíduos com varicocele apresentam alterações nos parâmetros seminais definidos pela OMS, tais como: azoospermia, oligozoospermia ou astenozoospermia (Jarow., 2001). Em contraste, é considerada como a causa reversível mais comum de infertilidade masculina. A correção cirúrgica da varicocele em homens inférteis tem demonstrado melhoras nos parâmetros seminais em 50-80% dos pacientes (Naughton et al., 2001; Rao et al., 2004).

A criptorquidia constitui a anomalia congênita mais freqüente observada em crianças recém nascidas (4-5%) e sua incidência parece estar aumentando nos últimos anos (Smith et al., 2007). Esta patologia se caracteriza pelo fato de um ou ambos os testículos não descerem para a bolsa escrotal durante o desenvolvimento fetal, mesmo unilateral, pode levar a diminuição da qualidade e quantidade global do sêmen em relação ao homem normal. Aproximadamente 50% dos homens têm criptorquidia unilateral e 75% criptorquidia bilateral, em ambos os casos a concentração espermática é inferior a 20 milhões/ml, mesmo tratados antes da puberdade. Estes maus índices de fertilidade podem ser evitados se a criptorquidia for corrigida antes dos dois anos de idade (Smith et al., 2007).

Muitos estudos têm demonstrado interesse a respeito do potencial de substâncias xenobióticas sobre o sistema endócrino humano (Fan et al., 2007). A ênfase inicial está relacionada às substâncias que mimetizam o estrógeno e são capazes de interferir na função normal do sistema endócrino. Dentre os agentes químicos que afetam o sistema

reprodutor humano via sistema endócrino, incluem: pesticidas (DDT e seus metabólicos), dioxinas, fitoestrogênios e micotoxinas (Pasqualotto et al., 2004).

Já está bem estabelecida que a excessiva produção de ROS (do inglês, *reactive oxygen species*) no plasma seminal, entre eles o óxido nítrico, pode ser considerada um dos fatores etiológicos da infertilidade idiopática (Aydemir et al., 2007). O estresse oxidativo resulta em sérios danos aos espermatozóides, como diminuição da motilidade e da viabilidade e comprometimento da capacitação e da reação acrossômica (De Carvalho et al., 2002). Em condições normais, as células somáticas contêm substâncias antioxidantes em seu citoplasma. Porém o espermatozóide, durante o período de maturação, perde a maioria de seu citoplasma, e, com isto, perde parte dos antioxidantes endógenos, ficando vulnerável a ação dos ROS (Gracia et al., 2005). Estudos recentes mostraram que entre 40% e 88% dos homens com baixa fertilidade apresentam elevados níveis de ROS no plasma seminal (Aydemir et al., 2007).

Segundo Benoff et al. (2000), o uso abusivo do álcool é capaz de ocasionar a redução de testosterona, causada pela diminuição da produção testicular e aumento da liberação deste hormônio pelo fígado. Também, acredita-se que a oxidação do álcool compete com a produção testicular de testosterona (Fan et al., 2007). As gonadotoxinas afetam diretamente a produção testicular de espermatozóides, resultando em uma densidade, maturação, motilidade e morfologia espermática inferiores àquelas definidas como maioria pela OMS (Pasqualotto et al., 2004). O uso abusivo de álcool está associado à atrofia testicular e conseqüentemente redução espermática (Hruska et al., 2000).

O cigarro pode ser considerado uns dos mais deletérios agentes oxidantes exógenos ao DNA espermático, possuindo grande contribuição na infertilidade masculina (Shen et al., 1999; Pasqualotto et al., 2008). Embora esta afirmação seja controversa na literatura (Hruska et al., 2000; Pasqualotto et al., 2006; Mehrannia., 2007). O hábito de fumar está associado a homens subinférteis, resultando no decréscimo da concentração espermática, baixa motilidade, redução na porcentagem de espermatozóides morfológicamente normais e até mesmo a fragmentação do DNA espermático (Mehrannia., 2007). Uma meta-análise demonstra que pacientes fumantes apresentam decréscimo médio de 10% na motilidade espermática, 13% na concentração e 3% na morfologia (Pasqualotto et al., 2006). Estudos revelam que indivíduos fumantes possuem maior quantidade de 8-OHdG, biomarcador do estresse oxidativo, no DNA espermático (Queiroz et al., 2006). Liu et al., (2006),

demonstra que o aumento da genotoxicidade em indivíduos está intimamente relacionado ao aumento no risco de câncer e toxicidade reprodutiva.

O crescimento explosivo de técnicas de reprodução assistida (TRA), e principalmente dos excelentes resultados obtidos a partir da utilização da injeção intracitoplasmática de espermatozóide (do inglês, *intracytoplasmic sperm injection* - ICSI), contribuiu para o desenvolvimento de pesquisas genéticas nesta área nos últimos anos (Kleiman et al., 1999). Muitas das causas de infertilidade masculina idiopática têm sido atribuídas a fatores ambientais e genéticos, sendo este último responsável por cerca de 60% dos casos. Dentre as causas genéticas podem ser encontradas as aberrações cromossômicas, mutações gênicas e microdeleções do cromossomo Y (Nudell et al., 2001; Farah et al., 2003; Vogt., 2004).

4. Genética da Infertilidade

Uma análise dos casos de infertilidade na população mundial permitiu a conclusão de que uma grande porcentagem de pacientes é acometida pela infertilidade idiopática (Diemer et al., 1999). Nestas condições, pacientes oligozoospermicos e azoospermicos são frequentemente observados. Defeitos genéticos macroscópicos (detectados por citogenética) e defeitos genéticos microscópicos (detectados por biologia molecular) permitem esclarecer as causas da infertilidade, especificamente no nível dos genes, particularmente os que estão associados aos cromossomos X e Y (Kleiman et al., 1999; Diemer et al., 1999).

Experimentos de *knock-out* gênico em ratos e drosófilas permitiram a conclusão de que o produto de mais de 3000 genes estão envolvidos na regulação gênica e expressão da fertilidade masculina e feminina. Desta maneira, conclui-se que o genoma contenha inúmeros genes que, caso sofram alguma alteração, podem causar infertilidade nos pacientes (Vogt., 2004). Existe atualmente um aumento no diagnóstico de anormalidades genéticas que estão sendo identificadas como causadoras da infertilidade masculina (Oates., 2008).

Embora a injeção intracitoplasmática de espermatozóide represente um dos principais avanços na abordagem do fator masculino da infertilidade, existem considerações importantes relativas ao potencial de transmissão de anormalidades genéticas para a prole, uma vez que os processos de seleção natural dos espermatozóides foram ultrapassados (Tesarik et al., 2007).

As causas genéticas são responsáveis por 60% dos casos de infertilidade idiopática (Farah et al., 2003). Alterações genéticas podem afetar a cascata de sinalização envolvida na produção de células germinativas (espermatogênese), e muitas vezes as conseqüências são negativas (Maduro et al., 2002). Alterações genéticas têm papel determinante nos defeitos da espermatogênese, incluindo função e liberação espermática (Diemer et al., 1999). Afastadas causas obstrutivas como varicocele ou criptorquidia, a etiologia mais comum da azoospermia é genética: 10 a 15% dos pacientes apresentam alterações dos 2 cromossomos sexuais (Síndrome de Klinefelter - 47, XXY; ou 46, XX) e outros 10 a 20% dos pacientes apresentam microdeleções do braço longo do cromossomo Y, que só podem ser diagnosticadas por análises moleculares (Vogt et al., 1996).

Dentre as causas genéticas, destacam-se as alterações cromossômicas, mutações gênicas e microdeleções do cromossomo Y (Maegawa et al., 2000; Farah et al., 2003; Ferrás et al., 2004; Arruda et al., 2007).

4.1 Alterações Cromossômicas

A possível associação entre alterações cromossômicas e infertilidade masculina se tornou evidente a partir dos resultados da primeira grande análise do cariótipo de 6982 homens subinférteis (Chandley, 1979). Quando comparados com a população geral (0,6% apresentavam algum tipo de anomalia cromossômica), estes indivíduos inférteis possuíam uma prevalência de 5,3% de terem alguma anomalia cromossômica.

Alterações cromossômicas são comuns em homens inférteis e subinférteis (Maduro et al., 2002). Na população de homens inférteis, a incidência varia de 6% a 9% (Farah et al., 2003), aumentando à medida que diminui a concentração espermática, podendo alcançar 16% em homens azoospermicos e 6% em oligozoospermicos (Arruda et al., 2007) representando um dos mais comuns defeitos genéticos no homem infértil (Nudell et al., 2001). Destas alterações 92% acontecem nos cromossomos sexuais e aproximadamente 8% nos cromossomos autossômicos (Maduro et al., 2002).

Estas alterações são definidas pela perda, ganho ou anormal rearranjo do material genético a nível cromossomal (Nudell et al., 2001).

As alterações cromossômicas associadas à infertilidade masculina podem ser subdivididas em duas categorias: alterações numéricas ou estruturais (Huynh et al., 2002).

A síndrome de Klinefelter é a mais freqüente alteração cromossômica associada à infertilidade masculina e hipogonadismo primário (Oates., 2008), afetando 1:500/700

recém nascidos do sexo masculino (Huynh et al., 2002; Maduro et al., 2002). A síndrome é caracterizada em sua forma clássica pelo cariótipo 47,XXY e cerca de 20% podem ser mosaicos 47,XXY/46,XY; sendo que 4,6% dos homens inférteis possuem esta síndrome (Arruda et al., 2007; Oaets., 2008). Aproximadamente 90% dos homens com esta síndrome apresentam o cariótipo 47,XXY, enquanto os 10% são mosaicos e possuem um fenótipo menos severo. Embora pacientes com a síndrome sejam usualmente azoospermicos (14% dos pacientes), indivíduos com baixa quantidade de espermatozoides podem ser encontrados (0,7% oligozoospermicos) (Huynh et al., 2002; Maduro et al., 2002).

Pacientes mosaicos para a síndrome de Klinefelter são menos afetados, a maioria possui tamanho normal dos testículos, e até a puberdade, são capazes de realizar a espermatogênese (Diemer et al., 1999). Após a puberdade a capacidade reprodutiva destes pacientes se torna temporária, pois há uma pequena e progressiva deteriorização dos túbulos seminíferos resultando numa eventual infertilidade (Huynh et al., 2002). Homens Klinefelter mosaicos possuem variável produção espermática (Pasqualotto., 2007).

Indivíduos com a Síndrome 47,XYY, são encontrados numa frequência de 1: 1000 homens (Maegawa et al., 2000). A maioria destes homens são azoospermicos ou possuem oligozoospermia severa, a análise histopatológica dos testículos comprova uma pequena maturação de células de Sertoli (Nudell et al., 2001). Outra síndrome, a de Noonan, afeta 1: 2500 homens. Também conhecida como a Síndrome de Turner masculina, estes homens apresentam hipogonadismo juntamente com baixos níveis de testosterona, criptorquidia e consequentemente infertilidade por afetar a produção de espermatozoides (Nudell et al., 2001).

Segundo Oates (2008), indivíduos mosaicos 45, X0/46,XX, possuem características gonadais e sexualmente fenotípicas femininas, mas seus testículos estão retidos intra-abdome e geralmente unilateral. Estes homens são inférteis devido à instabilidade genética nas gônadas (Arruda et al., 2007). Tanto a espermatogênese quanto as células de Leydig são funcionalmente estagnadas logo após a puberdade (Diemer et al., 1999).

Nudell et al (2001), demonstraram que há uma crescente associação entre homens identificados previamente com infertilidade idiopática e translocações cromossômicas ou inversões. Em homens oligozoospermicos, alterações estruturais são observadas em 2 a 4% (Maduro et al., 2002). As alterações estruturais envolvem cromossomos autossomos e sexuais (Arruda et al., 2007). A frequência de translocações equilibradas em homens inférteis é cerca de dez vezes maior do que a observada em indivíduos normais (Farah et

al., 2003). Particularmente as inversões que envolvem o cromossomo 9 estão associadas à azoospermia e severa oligoastenoteratozoospermia (Maduro et al., 2002). As translocações recíprocas ocorrem em 0,6% e as Robertsonianas, em 0,8% dos homens inférteis (Farah et al., 2003), sendo encontradas em 14% dos homens azoospermicos e 5% dos oligozoospermicos (Arruda et al., 2007).

A causa do comprometimento da espermatogênese nos casos de aberrações não é completamente conhecida. As anomalias no pareamento e segregação dos cromossomos e os diversos processos moleculares necessários à meiose propiciam inúmeros alvos, tanto para o dano genético como para a introdução de defeitos estruturais que levam a suspensão do desenvolvimento da espermatogênese (Farah et al., 2003).

4.2 Mutações Gênicas

As mutações gênicas ou desordens mendelianas são causadas pela mutação em um único locus gênico. Estes defeitos podem ocorrer através de uma mutação “*de novo*” ou através de herança autossômica dominante, recessiva ou herança ligada ao X (Mak et al., 1996). Dentre as desordens mendelianas comumente observadas em homens inférteis podemos observar: a fibrose cística (FC) que é uma doença autossômica recessiva com incidência de 1:2500. Na Dinamarca esta doença corresponde a uma frequência de portadores (heterozigotos) de 3% (Maegawa et al., 2000) e em homens inférteis geralmente ocorre na frequência de 1-2% (Maduro et al., 2002). Causada por mutações no gene regulador da condutância transmembrana da fibrose cística (*CFTR – Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator Gene*) afetando a proteína correspondente (Pieri et al., 2007). Até o presente momento mais de 800 mutações já foram identificadas no gene *CFTR* (Nudell et al., 2001).

As mutações no gene *CFTR* podem resultar em anormalidades do desenvolvimento das estruturas derivadas dos ductos de Wolff e, secundariamente, em agenesia renal unilateral e aplasia ou hipoplasia das vesículas seminais, ocasionando uma redução no volume seminal e conseqüentemente infertilidade (Bernardino et al., 2003).

Mais de 95% dos homens com FC são também inférteis, primeiramente devido à ausência congênita bilateral dos vasos deferentes (CBAVD), que por sua vez, contribui com 2% de toda a infertilidade masculina (Viana et al., 2003).

Em pacientes com fibrose cística, os vasos deferentes, a cauda e cabeça do epidídimo e vesícula seminal são atrofiados, fibrosados ou completamente ausentes (Bernardino et al., 2003). Geralmente, homens com CBAVD devem ser rastreados para mutações no gene *CFTR*. Entretanto, este rastreamento é muito complexo, já que mais de 500 tipos diferentes de mutações têm sido detectada em pacientes com FC (Casals et al., 2000, Oates., 2008).

A CBAVD é geneticamente heterogênea é uma desordem complexa, que envolve mutações e variantes do gene *CFTR* (Huynh et al., 2002). Aproximadamente 80% dos homens com ausência dos vasos deferentes são portadores de mutações no gene *CFTR* (Shefi et al., 2006). A azoospermia obstrutiva está presente na maioria dos homens inférteis (Lemos et al., 2004).

Mutações que causam a fibrose cística estão envolvidas em muitas formas de azoospermia obstrutiva (Oates., 2008). Podem ser verificados casos de azoospermia com ausência congênita bilateral dos vasos deferentes (CBAVD), ocorrendo numa frequência de 6% dos casos de azoospermia obstrutiva e 1% de infertilidade masculina (Oates., 2008), ausência congênita unilateral dos vasos deferentes (CUAVD) e outras condições congênitas como a obstrução bilateral dos ductos ejaculatórios e azoospermia obstrutiva epididimal (Shefi et al., 2006). A CBAVD é diagnosticada em 1,5% dos casos de infertilidade masculina e representa 60% de mutações heterozigóticas no gene *CFTR*, na forma de “heterozigoto confusos”, ou seja, mutações diferentes em cada alelo do gene (Arruda et al., 2007).

A Síndrome de Kallmann ou hipogonadismo hipogonadotrófico idiopático, é uma desordem com herança familiar em 1/3 dos casos (Nudell et al., 2001). Esta desordem pode estar relacionada a uma herança ligada ao X ou até mesmo a uma herança autossômica (Oates., 2008), e independentemente do tipo de herança, ambas estão relacionadas com a infertilidade masculina e acometendo 1: 30000 homens (Arruda et al., 2007). Deleções intragênicas no gene *KAL-1* ou mutações pontuais incluindo também elementos funcionais de outros genes próximos como o *DAX-1* (Shefi et al., 2006), como consequência ocorre uma falência na região posterior da pituitária acarretando em danos na estimulação testicular e conseqüentemente na espermatogênese (Nudell et al., 2001). Os pacientes podem ser tratados com terapia de reposição hormonal, porém geralmente são oligozoospermicos (Arruda et al., 2007).

A Síndrome de Instabilidade aos Andrógenos (SIA), é uma doença com herança ligada ao cromossomo X que afeta pacientes com cariótipo normal, 46,XY nos quais há prejuízo total ou parcial do processo de masculinização intra-uterina (Maegawa et al., 2000). Segundo Nudell et al., (2001), mais de 300 mutações já foram descritas para os receptores de andrógeno. O gene *AR* (receptor de andrógeno) está localizado no cromossoma X e esta desordem ocorre numa frequência de 1: 6000. Devido a grande variedade de mutações, o fenótipo da doença depende da severidade do defeito; sendo assim homens afetados podem apresentar baixos, normais ou elevados níveis de testosterona (Huynh et al., 2002). A concentração de andrógeno em cada indivíduo depende da integridade funcional dos receptores de andrógeno, intimamente com a pituitária e o hipotálamo (Nudell et al., 2001). As mutações podem ser causadas por substituições, deleções totais do gene ou por aumentos das repetições CAG (polimorfismos) localizadas em diferentes regiões do receptor, acarretando no fenótipo azoospermico (Arruda et al., 2007). As repetições CAG estão comumente associadas aos casos de infertilidade idiopática (Nudell et al., 2001).

4.3 Microdeleções do cromossomo Y

No braço longo do cromossomo Y, um gene ou um complexo de genes chamado de fator de azoospermia (*AZF – Azoospermia Factor*) tem sido localizado, aí residem múltiplos genes responsáveis por diferentes etapas da espermatogênese normal (São Pedro et al., 2003). Estes genes são expressos nos testículos (Farah et al., 2003). Segundo Ferrás et al., (2004), o estudo molecular de pacientes masculinos inférteis levou a observação de microdeleções intersticiais na região *AZF*. Nesta região podem ocorrer deleções em três sub-regiões não sobrepostas, que causam azoospermias (38%) ou oligozoospermias graves (23%) (Tim Jr et al., 2005). Apesar de ainda não existir uma concordância definitiva entre o tipo de microdeleção e a gravidade do defeito espermatogênico, as microdeleções em *AZF-a* condicionam a síndrome de células de Sertoli, em *AZF-b* provocam parada na meiose I da espermatogênese e em *AZF-c* condicionam a hipoespermatogênese que leva a oligozoospermia ou azoospermia (Ferrás et al., 2004).

As microdeleções do cromossoma Y têm sido descritas em mais de 5% dos pacientes com infertilidade idiopática (Castro et al., 2000). A frequência de microdeleções das regiões *AZF-a* e *AZF-b* é, claramente, inferior à frequência de microdeleções da região *AZF-c* (Vogt., 2005). Estudos relatam uma incidência de 3-55% de microdeleções em *AZF*

e são mais frequentes em pacientes com azoospermia (Huynh et al., 2002). Nem todos os homens com estas deleções do cromossomo Y são inférteis (Maegawa et al., 2000). Recentemente foi demonstrado que as microdeleções em *AZF-c* condicionam um quadro evolutivo que se inicia com oligozoospermia, progredindo para azoospermia (Arruda et al., 2007). É esta situação evolutiva que permite explicar como homens com microdeleções podem ter filhos (Castro et al., 2000).

O gene *SRY*, presente no braço curto do cromossomo Y, é fundamental para o desenvolvimento testicular (Oates., 2008). O gene *DAZ* (do inglês, *Deleted in Azoospermia*), localizado na região *AZF-c*, esta ausente em 10% a 15% de homens cromossomicamente normais com azoospermia não-obstrutiva e oligospermia grave (Pina-Neto et al., 2006). Quando comparadas com outras causas da infertilidade, as microdeleções do cromossomo Y são relativamente comuns (7% a 10%), e sua frequência aumenta com o grau de comprometimento da espermatogênese (16% em azoospermicos) (Carrara et al., 2004). A correlação entre as microdeleções do cromossomo Y e a infertilidade comparada à ausência relativa de tais alterações nos homens férteis sugere uma estreita relação de causa-efeito entre esse achado e a infertilidade masculina (Pina-Neto et al., 2006).

5. Xenobióticos e Infertilidade

Os seres humanos estão constantemente expostos a uma variedade de xenobióticos ou substâncias químicas exógenas não-nutrientes ao organismo (Taspinar et al., 2008). Os xenobióticos podem ser de origem natural ou sintética e incluem fármacos, aditivos alimentares, drogas, pesticidas, toxinas, carcinógenos, substâncias químicas de uso industrial e poluentes ambientais de diversos tipos (Gandolfi & Sipes., 1991; Parkinson., 2001; Taspinar et al, 2008).

Durante a evolução, a espécie humana se tornou capaz de metabolizar um grande número de compostos químicos que se acumulam nas células e podem causar danos para a saúde. O metabolismo é o principal mecanismo para manter a homeostasia durante a exposição dos organismos aos xenobióticos. O equilíbrio das taxas de absorção e eliminação dos mesmos tem um papel importante na prevenção de danos no DNA (Schuppe., 2000; Hatagima et al., 2002).

A ligação covalente de um composto químico (xenobióticos ou de seus metabólitos) ao DNA ou proteína, forma os aductos. Tendo em vista que os aductos

constituem a própria substância química ligada ao sítio alvo, os mesmos são também considerados como biomarcadores de exposição ou dose interna. (Losi-Guembarovski et al., 2001). O sistema de reparo de DNA pode detectar e reparar este DNA e voltarmos a ter uma célula normal. Outra situação é que este aducto fará com que a célula entre em apoptose. Outra possibilidade é que esta lesão no DNA passe a ser permanente, e isto significa que será transmitida à descendência. Os níveis de aductos no DNA formados em diferentes células ou tecidos, frequentemente dependem da eficiência de enzimas metabolizadoras de agentes mutagênicos e suas formas ativas (Habdous et al., 2004).

A biotransformação dos xenobióticos consiste na modificação das propriedades fisiológicas destas moléculas, originalmente pouco reativas, em produtos mais eletrofílicos, tornando-as mais vulneráveis a ligação com o centro nucleofílico das células, como proteínas e o DNA (Hatagima et al., 2002; Huber et al., 2008). Consequentemente pode ocorrer a formação de aductos, potencializando os efeitos mutagênicos dos agentes xenobióticos (Parkinson, 2001; Soya et al., 2007). Os aductos tendem a ser eliminados por enzimas de reparo. Caso a célula se divida antes que o reparo seja devidamente efetuado, esses aductos provavelmente levarão ao surgimento de mutações (Coughlin et al., 2002).

A eliminação de xenobióticos ocorre pela urina, bile, fezes, ar expirado e transpiração e, no caso de compostos não voláteis, depende em grande parte da solubilidade aquosa da molécula (Liu et al., 2006).

A biotransformação é um processo bioquímico catalisado por uma ampla diversidade de enzimas distribuídas em diferentes tecidos e encontradas tanto dentro como fora das células, onde estão localizadas em vários compartimentos subcelulares (Parkinson., 2001). Nos vertebrados, estas enzimas existem em quase todos os órgãos, mas o fígado é o órgão onde se encontra a maior abundância e diversidade de enzimas de biotransformação (Losi-Guembarovski et al., 2001) e também naqueles tecidos estrategicamente situados nas portas de entrada do organismo, tais como trato gastrointestinal (ex. intestino), pele, pulmão e mucosa nasal. Órgãos como os rins, o pâncreas, o coração, o cérebro, os testículos, a placenta, os ovários e vários outros também exibem importante capacidade metabólica em termos de biotransformação de xenobióticos (Parkinson., 1996). Como a biotransformação, de modo geral, facilita a eliminação dos xenobióticos lipofílicos que podem causar efeitos adversos, ela é considerada um processo de desintoxicação (Hatagima., 2002; Linhares et al., 2006).

A exposição ambiental a xenobióticos faz com que este se ligue covalentemente ao DNA, causando alterações cromossômicas, e assim este possa ser o gatilho para o desenvolvimento de uma carcinogênese química (Benoff et al., 2000). Indivíduos polimórficos para os genes de metabolização e expostos a agricultura se adequam a esta situação (Liu et al., 2006).

A inativação de xenobióticos e de toxinas endógenas possibilita a preservação da integridade celular, além da inibição dos eventos de citotoxicidade provocados por estas substâncias e que podem ser a causa de algumas doenças, como por exemplo, disfunções no desenvolvimento e função do trato reprodutor masculino (Schuppe et al., 2000; Rohr et al., 2004).

5.1 Fases da biotransformação

Muitas enzimas evoluíram para detoxificação de compostos xenobióticos e a expressão gênica das mesmas é induzida em resposta à presença de determinado composto. O sistema de metabolização xenobiótica humano compreende duas classes de enzimas: as de metabolismo oxidativo mediado ou de fase I e as enzimas conjugadas ou de fase II (Nakata et al., 2004). O objetivo final de ambas as fases da metabolização xenobiótica é aumentar a solubilidade em água dos compostos, facilitando assim sua excreção do organismo (Huang et al., 2006; Marques et al., 2006; Quiñones et al., 2006), como mostra a Figura 2:

Segundo Nakata et al., 2004 os xenobióticos são convertidos a metabólitos altamente reativos pelas enzimas oxidativas de fase I, principalmente enzimas da superfamília do citocromo P450 (CYPs). As CYPs inserem um átomo de oxigênio no xenobiótico a fim de torná-lo altamente eletrofílicos e reativo (Rohr et al., 2004). Estas enzimas são capazes de promoverem reações de oxidação, de redução ou de hidrólise, assim as drogas podem ser ativadas, inativadas ou terem inalterada suas atividades (Duarte et al., 2006; Joseph et al., 2006).

Em contraposição, as reações da fase II envolvem a conjugação (ligação não covalente) com um substrato endógeno (ex. glicose, ácido glicurônico, glutathione, acetatos, sulfatos inorgânicos e aminoácidos), por meio das glutathione S-transferases (GSTs), UDP-glucuroniltransferases e N-acetiltransferases (NATs), que agem como enzimas inativadoras dos produtos da fase I, tornando os metabólitos hidrofílicos e possíveis de excreção (Rossit et al., 2000; Hatagima et al., 2002; Huang et al., 2006). Durante a fase II, quase sempre

ocorre à inativação total do xenobiótico, caso este ainda não tenha sido inativado na fase I (Nakata et al., 2004; Do Vale Bossso et al., 2006). De fato, a fase II do metabolismo de xenobióticos compreende um importante passo para a eliminação destas espécies do meio celular, podendo em alguns casos envolver a participação de transportadores (Huber et al., 2008). Em resumo, a fase I é também chamada de fase de ativação e a fase II é chamada de fase de detoxificação.

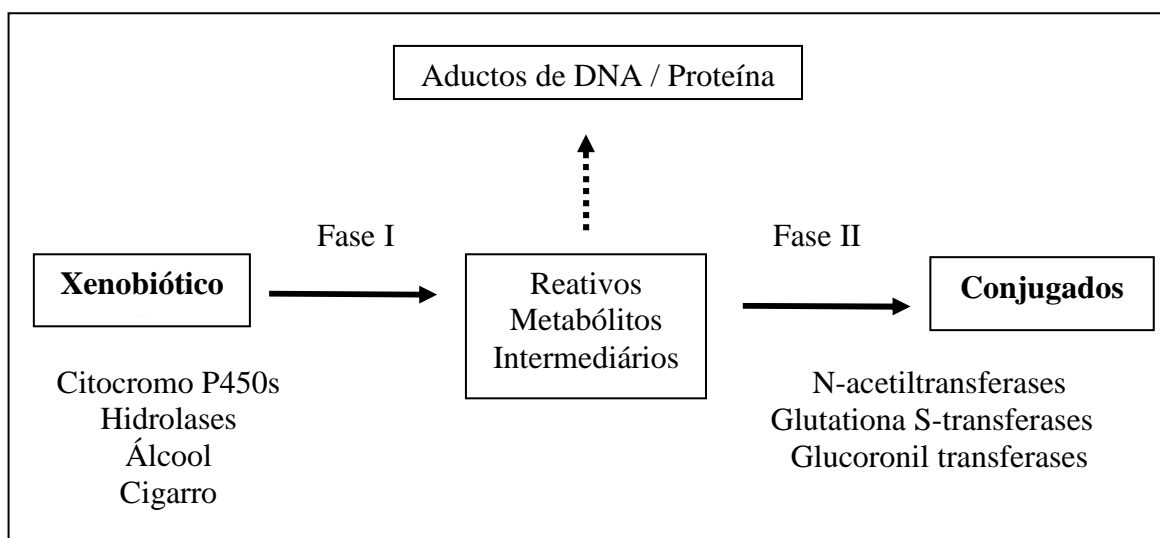


Figura 2: Representação das duas fases de detoxificação dos xenobióticos. Compostos lipofílicos passam pela ativação metabólica através das enzimas de fase I, na qual introduz um centro reativo na molécula, em seguida ocorre à reação de conjugação de fase II, resultando em um produto solúvel em água. A formação de grandes quantidades de reativos metabólicos intermediários produz efeitos citotóxicos, mutagênicos, carcinogênicos e imunopatológicos. (Fonte: Schuppe et al., 2000)

Quantitativamente a formação de conjugados com a glutaciona é a principal reação observada para muitos xenobióticos durante a fase II (Sheehan et al., 2001). De fato, os níveis celulares (em condições normais) de glutaciona reduzida (GSH) são altamente elevados (~10 mM), indicando que o mecanismo de detoxificação via glutaciona pode representar uma adaptação biológica fundamental para a sobrevivência e garantia da perpetuação de muitas espécies (Prabhu et al., 2004).

No entanto, quando os produtos formados na fase I não sofrem inativação ou são ativados a substâncias mais reativas pelas enzimas de fase II, estes intermediários reativos podem se ligar covalentemente ao DNA e causar diversas formas de dano ao organismo, pois agirão como agentes mutagênicos e/ou carcinogênicos (Hadfield et al., 2001; Louro et al., 2002).

5.2 Metabolismo e Polimorfismo Gênico

A forma pela qual o organismo humano responde ao consumo de uma determinada droga representa uma variação interindividual. Isto se deve em parte a variações no próprio metabolismo (Santiago et al., 2002).

Variações no metabolismo têm sido relacionadas a variantes alélicas de genes que codificam enzimas envolvidas na ativação e detoxificação de compostos químicos (Taspinar et al., 2008). Tais variações são atribuídas à presença de polimorfismos genéticos, os quais, muitas vezes, estão correlacionados à suscetibilidade a determinados tipos de enfermidades (Gajecka et al., 2005; Ho et al., 2006).

Os polimorfismos podem ser definidos como variações na seqüência do DNA dos genes que codificam determinadas enzimas e estas devem estar presentes numa frequência $\geq 1\%$ na população (Joseph et al., 2006). Essas variações na seqüência originam proteínas com atividades variáveis e com diferentes capacidades metabólicas, por parte de subgrupos de populações ou por indivíduos isolados (Linhares et al., 2006). Estima-se que há uma variação polimórfica a cada 1000 pares de bases dentre os 3 milhões que configuram o genoma humano (Iniesta et al., 2005).

Os polimorfismos mais freqüentes são os que afetam um único nucleotídeo, e denomina-se SNP (do inglês, *single nucleotide polymorphism*) (Torrades 2002; Iniesta et al., 2005). Mais de 1,4 milhões de SNPs foram identificados ao final do Projeto Genoma Humano (PGH), sendo 60.000 desses polimorfismos localizados em éxons de genes de interesse clínico (Lima et al., 2006).

Segundo Iniesta et al., (2005), muitos pesquisadores estão centrando seus estudos em variantes que conferem susceptibilidade genética a uma determinada enfermidade, e para que essa variante genética seja expressa é necessária à participação de uma exposição. Um bom exemplo são as variantes nulas (assim chamadas porque anulam a função) em genes que codificam enzimas glutatona S-transferases (*GSTM1* e *GSTT1*). Indivíduos fumantes e portadores de uma variante nula poderiam ter risco aumentado de pulmão, possivelmente por serem incapazes de metabolizar os carcinógenos do tabaco (Duarte et al., 2006).

As novas tecnologias em genética molecular estão trazendo para esta área de estudo uma verdadeira revolução no conhecimento dos mecanismos etiológicos, como também na

conduta terapêutica, abrindo perspectivas para a descoberta de medidas de prevenção no futuro (Palli et al., 2007).

Atualmente, vem se demonstrando, cientificamente, a não homogeneidade da população, o que pode ser verificado em relação a alguns índices de suscetibilidade a uma dada exposição, em que a relação entre o metabolismo de xenobióticos e o dano genético apresenta variações entre indivíduos de uma mesma população (Linhares et al., 2006). A biologia molecular vem sendo relevante para a avaliação desse risco pessoal, com potencial de construir uma arma de prevenção e advertência (Rossit et al., 2000; Ruiz et al., 2008).

Um grande número de genes que codificam enzimas envolvidas nas vias de biotransformação de xenobióticos e na defesa celular foi identificado e clonado, aumentando assim, o conhecimento sobre as variantes alélicas desses genes que tornam a susceptibilidade às doenças variável (Thier et al., 2003).

Dentre os genes polimórficos da via de metabolização, merecem destaque as enzimas CYP, as GSTs e as NAT-s (N-acetyltransferases), estes polimorfismos resultam na falta da proteína funcional ou causam aumento ou redução da atividade metabólica (Schuppe et al., 2000). O polimorfismo das enzimas da superfamília da glutathione S-transferase está presente em 50% dos caucasianos (Klautau-Guimarães et al., 2005). Polimorfismos nos genes *GSTM1*, *GSTM3* e *GSTM5* vêm sendo associados à infertilidade masculina (Aydemir et al., 2007).

Segundo Joseph et al., (2006), isto tem sido demonstrado pelo aumento das evidências de estudos epidemiológicos envolvendo o polimorfismo genético de enzimas de metabolização de xenobióticos, na qual tem demonstrado ter um importante papel tanto na indução química da carcinogênese como na susceptibilidade de outras doenças não malignas, assim como a infertilidade masculina (Fritsche et al., 1998; Schuppe et al., 2000; Chen et al., 2002).

Recentes estudos relatam um significativo declínio na qualidade seminal humana (Fritsche et al., 1998) ou até mesmo a deterioração da espermatogênese com o passar das décadas (Pajarinem et al., 1996). A real causa deste declínio ainda não foi esclarecida, apesar de que os compostos químicos ambientais exercem efeitos adversos ao sistema reprodutor masculino (Benoff et al., 2000; Pasqualotto et al., 2004). Em particular, os distúrbios endócrinos, produção de reativos de oxigênio (ROS), o consumo de álcool, cigarro, manipulação de agrotóxicos ou materiais pesados e até mesmo o uso de terapias

médicas, são muitas vezes os xenobióticos de maior impacto na fertilidade masculina (Fritsche et al., 1998; Shen et al., 1999; Benoff et al., 2000; Pasqualotto et al., 2004; Queiroz et al., 2006; Cocuzza et al., 2007; Smith et al., 2007).

Esses polimorfismos são freqüentes e, tanto o tipo quanto a freqüência, étnico-dependentes. Os polimorfismos avaliados em populações brasileiras até agora mostram muitas vezes freqüências diferentes das obtidas em etnias semelhantes presentes em outros países, provavelmente reflexo da intensa miscigenação que caracteriza a população brasileira (Amorim et al., 2002; Rossini et al., 2002).

5.3 Superfamília da Glutathione S-Transferase (GST)

As GSTs estão amplamente distribuídas na natureza, encontradas desde a bactéria até o homem (Souza et al., 2008). Estima-se que existam pelo menos 20 GSTs na espécie humana, estando estas presentes no citoplasma microsomal e mitocôndrias (Hemachand et al., 2003). Sua maior expressão é no tecido hepático (fígado), mas também pode ser expressa em tecidos extra-hepáticos (testículos, ovários, pulmão e intestino delgado) (Chen et al., 2002; Nakata et al., 2004).

A família das GSTs é composta por proteínas diméricas solúveis (Rossit et al., 2000). As GSTs são enzimas multifuncionais, pois são responsáveis pela detoxificação de uma grande variedade de compostos eletrofílicos através da reação de conjugação (Soya et al., 2007; Xiao et al., 2007). Estas enzimas multifuncionais catalisam o ataque nucleofílico da glutathione reduzida (GSH) a compostos que apresentam um carbono, um nitrogênio ou um átomo de enxofre eletrofílicos e tem a função de tornar os produtos da reação de fase II menos tóxicos e mais solúveis em água, facilitando a excreção (Schuppe et al., 2000; Huber et al., 2008).

A glutathione reduzida (GSH) é um tripeptídeo composto de glicina, ácido glutâmico e cisteína, possui papel central na biotransformação e eliminação de xenobióticos e na defesa das células contra o estresse oxidativo (Joseph et al., 1997), sendo encontrado intracelularmente em altas concentrações, essencialmente em todos os organismos aeróbicos (Huber et al., 2008). A depleção da GSH está relacionada a estados patológicos; incluindo câncer, doenças neurodegenerativas e cardiovasculares. Devido a importante função da GSH na proteção contra o estresse oxidativo e detoxificação de xenobióticos, sua disponibilidade na forma reduzida pode ser um fator essencial para a manutenção da

saúde. Conseqüentemente, sua determinação em eritrócitos humanos é necessária (Alvarez et al., 2006).

Segundo Gattás et al., (2004), a grande maioria das reações catalisadas entre a glutathione e compostos eletrofílicos resultam em produtos de detoxificação, apesar de que em alguns casos o produto metabólico pode ser mais reativo que o original. Caso isso aconteça há possibilidade da formação de aductos de DNA em sítios gênicos importantes (Linhares et al., 2006).

As GSTs constituem um importante sistema enzimático com capacidade de detoxificar os metabólitos reativos, como os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos (HPA), prevenindo que eles reajam com o DNA (Duarte et al., 2006), e também atuam na proteção contra produtos do estresse oxidativo (Alkan et al., 1997; Zendeheb-Boodi et al., 2008). Segundo Do Vale Bosso et al., (2006), em humanos, uma substancial variabilidade na resposta biológica aos HPAs é esperada, desde que há diferenças inter-individuais na taxa e vias de metabolização destes compostos determinados pelos polimorfismos genéticos das enzimas de fase I e II.

Recentemente, as GST, têm sido utilizadas como importantes moléculas envolvidas na ativação de genes citoprotetores (Linhares et al., 2006). Costa et al., (2006), também verificaram que detoxificação dos pesticidas e seus reativos é feita via enzimas de metabolização.

Além disso, as GSTs têm um importante papel no metabolismo do estrogênio (Morais et al., 2008). Elas agem na metabolização de esteróides e radicais livres que podem indiretamente serem produzidos pelo metabolismo do estrogênio, reduzindo sua genotoxicidade. Assim, polimorfismos nos genes GSTs podem modificar o risco de desenvolver câncer de mama relacionado ao estrogênio (Morais et al., 2008). Estudos recentes têm demonstrado que as GSTs possuem um relevante papel na proteção da espermatogênese (Chen et al., 2002).

Os polimorfismos nos genes responsáveis pela produção das GST, têm sido bem caracterizados e a sua frequência encontra-se relacionada a fatores étnicos. Existem três genes principais envolvidos com esses polimorfismos: *GSTM1*, *GSTT1* e *GSTP1* (Do Vale Bosso et al., 2006).

Segundo Klautau-Guimarães et al., (2005), as GSTs humanas estão localizadas em diferentes cromossomos humanos. Baseada na similaridade da seqüência de aminoácidos, sete classes (designadas pelas letras do alfabeto grego) de glutathione transferases (GSTs)

citossólicas solúveis de mamíferos são descritas: Alpha (α) no cromossomo 6, Mi (μ) no cromossomo 1, Pi (π) no cromossomo 11, Theta (θ) no cromossomo 22, Zeta (ζ) no cromossomo 14, Sigma (σ) e a mais recente descoberta Omega (Ω) (Coughlin et al., 2002). A expressão de enzimas desta família em humanos parece ser uniforme e independente do tipo celular (Aydemir et al., 2007; Huber et al., 2008). Em adição as diferenças tecido-específicas e propriedades catalíticas, as enzimas xenobióticas de metabolização (ex.GSTs) podem exibir uma considerável variabilidade inter-individual (Boccia et al., 2008).

As GSTs são encontradas em todos os mamíferos vivos e constituem mais de 4% do total de proteínas solúveis (Hatagima., 2002). Dentre os genes desta superfamília os mais conhecidos são os genes *GSTM1* e *GSTT1* (Habdous et al., 2003).

A classe μ é talvez a mais extensa, cinco genes (*GSTM* de 1 a 5) foram mapeados no cromossomo 1 (1p13.3). Os genes estão separados por aproximadamente 20 kb e localizados na seguinte ordem: 5'....*GSTM4* – *GSTM2* – *GSTM1* – *GSTM5*...3'. O gene *GSTM3* localiza-se após o *GSTM5*, porém numa orientação 3'- 5' (Klautau-Guimarães et al., 2005) [Figura 3].

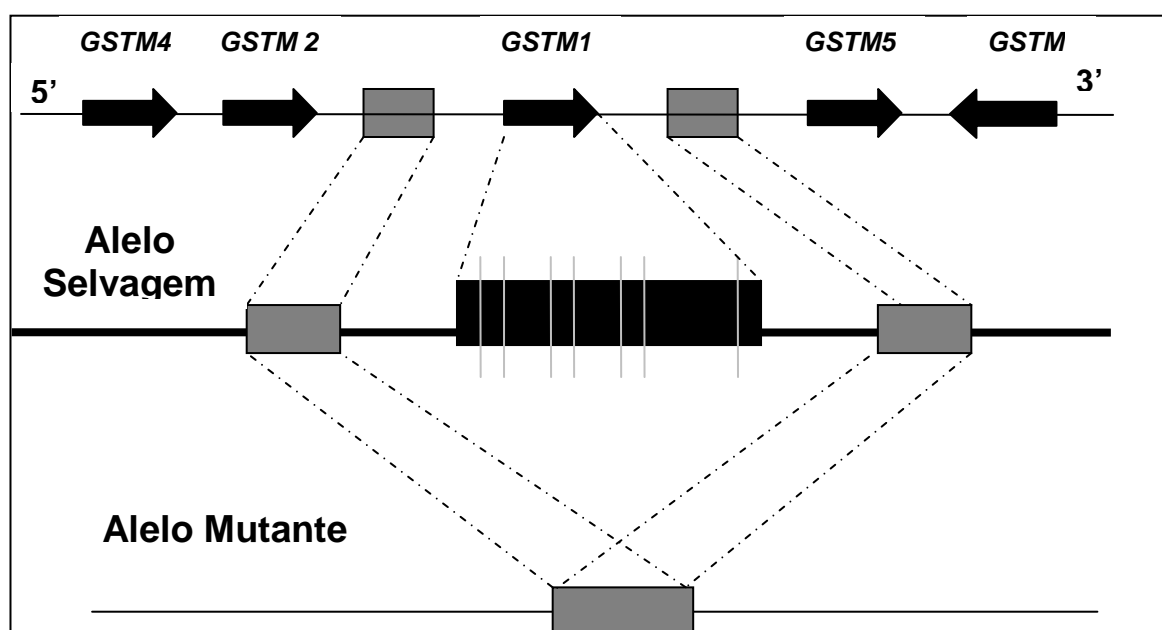


Figura 3: Localização dos genes da família GST classe Mu, no cromossomo 1, representação do alelo selvagem e deleção completa do gene *GSTM1*. (Fonte: Parl., 2005)

Os genes da superfamília citocromo P450 e glutaciona S-transferases, envolvidos na ativação e detoxificação de xenobióticos, são conhecidos pelos seus polimorfismos (Hatagima., 2002; Joseph et al., 2006).

O gene *GSTM1* é polimórfico, ou seja, três diferentes alelos foram identificados no mesmo loco, dentre eles dois alelos funcionais (*GSTM1**A e *GSTM1**B) e um alelo com atividade nula por deleção (*GSTM1**0), sendo que os alelos funcionais possuem a mesma eficácia de detoxificação (Coughlin et al., 2002). Os alelos funcionais se diferem pela substituição da base C por G na posição 534 (Gattás et al., 2004). Pacientes homocigotos para o alelo *GSTM1**0 são incapazes de produzirem a proteína correspondente ao gene *GSTM1* (Hadfield et al., 2001).

Indivíduos com pelo menos um dos dois alelos funcionais para *GSTM1* (*GSTM1**A e *GSTM1**B) são chamados de *GSTM1* presente e apresentam a mesma eficiência metabólica (Sata et al., 2003).

Recentes estudos demonstram que indivíduos *GSTM1*(nulo) exibem ausência da atividade enzimática e sugerem que eles possuam um risco aumentado para efeitos de uma grande variedade de carcinógenos ambientais (Huang et al., 2006; Quiñones et al., 2006; Rubes et al., 2007; Taspinar et al., 2008).

O genótipo *GSTM1*(nulo) foi positivamente associado com níveis altos de aductos no DNA, sugerindo que este possa influenciar na carcinogênese (Losi-Guembarovski et al., 2001). Sendo que algumas variantes dos genes CYPs e GSTs foram encontradas associadas a diversos tipos de câncer (Manfredi et al., 2007).

A frequência do genótipo GST (nulo) em humanos varia entre 30-50% dependendo da origem étnica do indivíduo. A maior prevalência para o genótipo nulo observada pelos autores ocorreu entre os caucasianos estudados (55%), seguida pelos negros (33%) e indígenas (20%) (Linhares et al., 2006).

Dentre os tipos de tumores frequentemente associados à ausência do gene *GSTM1*, destaca-se o câncer de pulmão, pelo fato de que o *GSTM1a* e *GSTM1b* são ativos na detoxificação de certos epóxidos dos hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (HPA) encontrados na fumaça do cigarro e em outros produtos de combustão (Ford et al., 2000).

O gene *GSTT1* tem 8,1 kb, foi mapeado no cromossomo 22 (22q11.2), e assim como o *GSTM1*, é polimórfico; dois diferentes alelos funcionais foram descritos para o locus do *GSTT1* (Kim et al., 2007).

Indivíduos com pelo menos um alelo funcional para *GSTM1* e *GSTT1* são agrupados em tipos conjugação positivos, sendo chamados de *GSTM1*(positivo) e *GSTT1*(positivo), respectivamente (Gattás et al., 2004). O locus do gene *GSTT1* também possui um único alelo que pode estar presente ou ausente, dando origem ao fenótipo nulo

por deleção. A deleção do *GSTT1* é causada por uma recombinação homóloga envolvendo duas seqüências altamente repetitivas que flanqueiam o gene (HA3 e HA5), resultando na perda de 54kb do gene inteiro. Os indivíduos com deleção em homozigose dos genes, conseqüentemente a ausência ou a forma inativa das enzimas, são denominados pelo genótipo GSTM1(nulo) ou (GSTM*0) e GSTT1 (nulo) ou (GSTT*0), respectivamente (Xiao et al., 2007) (Figura 4).

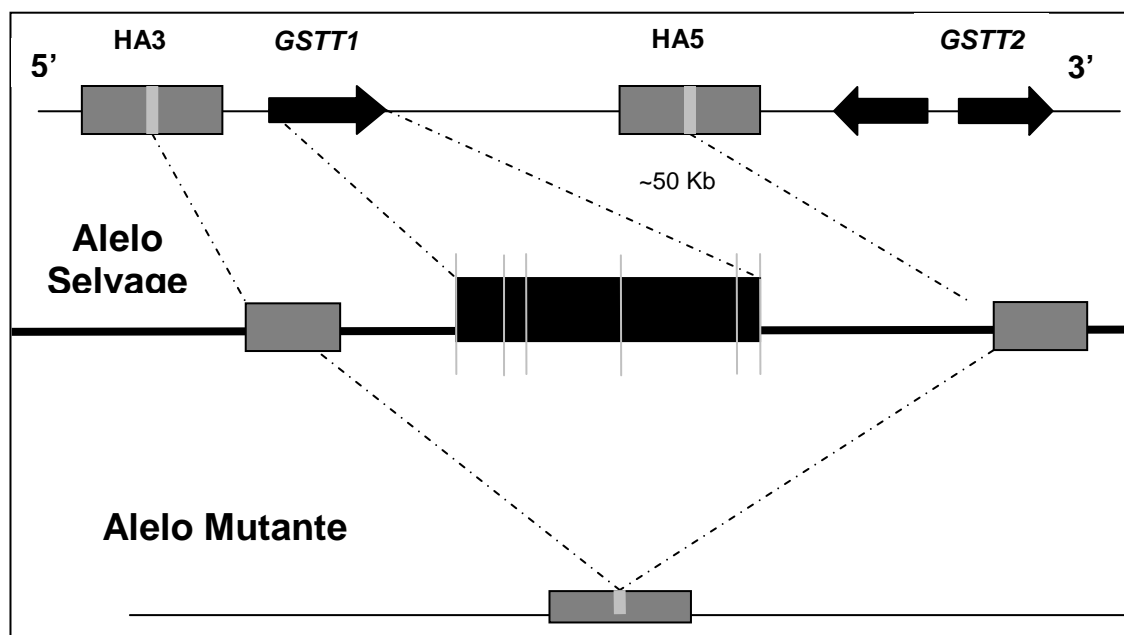


Figura 4: Localização dos genes da família GST classe Teta, no cromossomo 22, representação do alelo selvagem e deleção completa do gene *GSTT1*. (Fonte: Parl., 2005)

A deleção em homozigose do gene *GSTM1* é observada em frequências que variam de 20 a 70% nas diferentes populações, enquanto que para o gene *GSTT1* esta variação é de 11 a 38% (Arruda et al., 1998). O polimorfismo de *GSTT1* assim como de *GSTM1* é causado por deleção, resultando na ausência do produto gênico (Do Vale Bosso et al., 2006). O genótipo GSTT (nulo) tem sido associado ao aumento no risco de desenvolver câncer de boca e de pulmão (Sreelekha et al., 2001; Sorensen et al., 2004).

Indivíduos australianos expostos á pesticidas e que apresentavam genótipo GSTT (nulo), possuíam maior chance de desenvolver mal de Parkinson's (Menegon et al., 1998). Joseph et al (2006), demonstrou que mulheres indianas com deleção de ambos os genes *GSTM1* e *GSTT1* possuem maior chance de desenvolverem HPV (Papilomavírus Humano – do inglês, *human papilloma virus*).

O polimorfismo nos genes *GSTM1* e *GSTT1* é capaz de influenciar na frequência de aberrações cromossômicas nos linfócitos de trabalhadores rurais expostos a pesticidas (Liu et al., 2006).

Segundo Soya et al (2007), o polimorfismo dos genes de codificação das enzimas de detoxificação de carcinógenos apresentam variações entre diferentes grupos étnicos e raciais. Aproximadamente 10-65% dos indivíduos de diferentes grupos étnicos apresentam genótipo nulo para *GSTM1* ou *GSTT1*.

5.4 ROS, GST, Infertilidade

Acredita-se que o estresse oxidativo esteja envolvido na etiologia de muitas doenças humanas. Os organismos são submetidos ao estresse oxidativo através de fontes endógenas e exógenas, incluindo a exposição a solventes, e outros poluentes do meio ambiente (Aydemir et al., 2007). Os ROS (do inglês, reactive oxygen species) são componentes capazes de induzir vários danos macromoleculares, celulares e até mesmo a nível tecidual, isto pode ocorrer através de efeitos citotóxicos diretos, promoção de eventos genotóxicos primários ou geração de reativos intermediários de oxigênio (Shen et al., 1999).

Recentes estudos relatam um significativo declínio na qualidade seminal humana nas últimas 4 ou 5 décadas (Panjarinen et al., 1996; Chen et al., 2002, Hemachand et al., 2002; Aydemir et al., 2007; Lucchese et al., 2007).

Dentre as possíveis causas da infertilidade masculina, muitos pesquisadores, acreditam na hipótese de que fatores ambientais (xenobióticos) possam estar envolvidos na deterioração na função e desenvolvimento do trato reprodutor masculino (Shuppe et al., 2000).

A infertilidade idiopática pode ser causada pela excessiva produção de espécies reativas de oxigênio no plasma seminal, levando ao estresse oxidativo (Lucchese et al., 2007). As espécies reativas de oxigênio tais como peróxido de hidrogênio, ânion superóxido e radical hidroxil, podem ser produzidas pelos espermatozoides humanos (Alkan et al., 1997., Aydemir et al., 2007).

O DNA e a membrana fosfolipídica dos espermatozoides são as duas estruturas mais danificadas pelos ROS e seus metabólitos (Shen et al., 1999). Segundo Alvarez et al (2006), os espermatozoides são susceptíveis a danos peroxidativos por apresentarem, em suas membranas, grandes quantidades de ácidos graxos polinsaturados. A membrana

plasmática dos espermatozóides humanos é extremamente sensível aos danos causados pelos ROS (Aydemir et al., 2007), sendo o peróxido de hidrogênio o mais tóxico ao espermatozóide humano (Ochsendorf et al., 1998). Recentes estudos demonstram que os danos causados pelo peróxido de hidrogênio na membrana dos espermatozóides humanos, o caracterizam como um importante mecanismo fisiopatológico na infertilidade masculina (Agarwal et al., 2003). Os ROS possuem efeitos deletérios nas funções dos espermatozóides, tais como a motilidade e axonemas (Shen et al., 1999).

Estudos têm demonstrado que os espermatozóides humanos possuem capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio quando incubados em ambiente aeróbio, sendo que as maiores fontes de espécies reativas de oxigênio no sêmen são os leucócitos, espermatozóides com citoplasma residual e espermatozóides imaturos (Fritsche et al., 1998; Schuppe et al., 2000; Chen et al., 2002; Lucchese et al., 2007).

Estudando sêmen de homens inférteis, Pajarinen et al (1996), observaram que a produção elevada de ROS reduz a motilidade espermática. Irvine (1996), também demonstrou que a fusão entre o espermatozóide e o óvulo em fertilizações *in vitro*, é prejudicada quando há uma elevada produção de ROS.

Os espermatozóides humanos e o plasma seminal possuem vários sistemas anti-oxidantes para eliminar os ROS e minimizar os danos celulares causados por esses compostos químicos (Agarwal et al., 2003). Os processos de anti-oxidação dos ROS é feita através da detoxificação dos excessos de ROS, assim qualquer deficiência neste processo de defesa, resulta em um significativo dano oxidativo, incluindo enzimas de inativação, degradação de proteínas, aductos de DNA, peroxidação lipídica (Saleh et al., 2002).

O sistema de defesa anti-oxidante, na qual envolve uma variedade de reações de detoxificação (Hemachand et al., 2003), baseia-se em assegurar a manutenção do equilíbrio entre a produção e remoção dos ROS endógenos e outros pró-oxidantes (Aydemir et al., 2007).

Em 1978, Mukhtar et al., observaram uma quantidade significativa de glutathione S-transferase (GST) no sêmen humano, esta enzima possui a capacidade de atenuar a toxicidade causada pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) presentes no sêmen. Os genes da família GST produzem uma importante isoenzima capaz de proteger contra o estresse oxidativo (Ochsendorf et al., 1998), o aumento de ROS está associado à redução da atividade da GST, ocasionando danos na membrana espermática (Chen et al., 2002).

Chen et al (2002), demonstrou que as bases desoxirribonucléicas são susceptíveis ao estresse oxidativo e que vários danos oxidativos em nível de DNA espermático estão envolvidos na etiologia da infertilidade masculina. Como mostra a Figura 5:

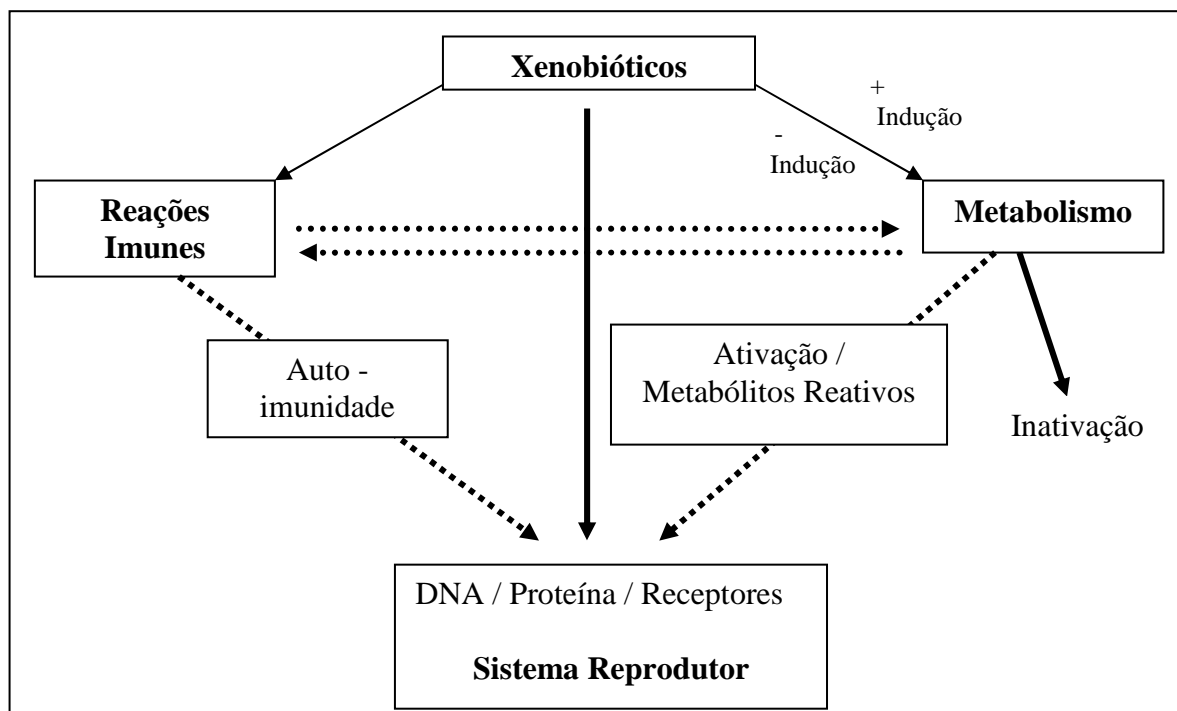


Figura 5: Conceito para avaliação das desordens quimicamente induzidas na função reprodutiva masculina. Os xenobióticos podem reagir isoladamente e ter efeito direto via interação covalente com macromoléculas celulares ou se ligarem a receptores hormonais e agirem como disruptores endócrinos. Efeitos indiretos podem ocorrer através de dois mecanismos, ou seja, reações bioquímicas no metabolismo de xenobióticos ou respostas imunes adquiridas específicas e inatas, e também através a interação entre os dois sistemas. (Fonte: Schuppe et al., 2000)

Alvarez et al (2006), descreve que 40% dos homens inférteis têm quantidades detectáveis de ROS no sêmen, e não foi detectável atividade de ROS no sêmen de homens férteis. Em humanos, várias observações em clínicas de fertilização demonstraram que a glutathiona está presente no plasma seminal e o nível deste anti-oxidante não enzimático é significativamente menor no sêmen de indivíduos inférteis quando comparado com os normais (Hemachand et al., 2002).

Até o momento, a variabilidade genética na capacidade de metabolização dos xenobióticos no trato reprodutor masculino, ainda não foi extensamente estudada. Pajarinen et al (1996), analisou a relação entre o polimorfismo da GSTM1 e os danos causados pela ingestão de álcool na espermatogênese; indivíduos GSTM1 (nulo) estariam mais propensos a desenvolver danos testiculares, comparado com os que possuíam GSTM1 funcional.

Vários estudos epidemiológicos têm demonstrado que o genótipo nulo de GSTM1 está correlacionado com o aumento da susceptibilidade de doenças associadas ao estresse oxidativo e propõe que a GSTM1 seja uma isoenzima de extrema importância na detoxificação dos produtos resultantes do estresse oxidativo (Alvarez et al., 2006). Chen et al (2002), demonstrou que o esperma de indivíduos com varicocele e genótipo GSTM1 (nulo) são mais propensos aos danos oxidativos. Este mesmo autor observou que o plasma seminal e os espermatozóides de homens com infertilidade idiopática possuíam maior quantidade de ROS em relação a homens férteis (Naughton et al., 2001).

Se a deficiência enzimática das isoformas GSTM/GSTT está correlacionada ao aumento do risco de certas doenças associadas aos danos oxidativos, assim será possível a associação entre os diferentes genótipos das GST e a infertilidade idiopática. Apesar dos diferentes potenciais dos mecanismos de detoxificação da catalase, peroxidase GSH, superóxido e GSH já serem investigados em indivíduos com infertilidade idiopática (Lewis et al., 1995; Alkan et al., 1997), não se tem muitos artigos relacionando o polimorfismo das GSTs e a infertilidade idiopática. Por essa razão, o objetivo do presente estudo será detectar se o genótipo polimórfico GST possa estar associado aos diferentes laudos de espermograma de homens com infertilidade idiopática.

6. Objetivos

6.1. Geral

- Detectar o polimorfismo dos genes *GSTM1* e *GSTT1* em homens diagnosticados com infertilidade idiopática pelo Serviço de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas de Goiânia (HC), segundo o laudo dos espermogramas.

6.2. Específicos

- Analisar as frequências gênicas e genotípicas dos grupos estudados;
- Estabelecer uma relação entre o polimorfismo gênico e o tipo de alteração encontrada no espermograma;
- Determinar a distribuição polimórfica dos genes *GSTM1* (nulo) e *GSTT1* (nulo) na população em estudo;
- Confrontar e identificar possíveis associações entre os genótipos *GSTM1* (nulo) e *GSTT1* (nulo) e fatores ambientais (tabagismo e etilismo).

7. Metodologia

7.1 Grupo Amostral

Amostras de sangue periférico (10 mL) e/ou sêmen foram obtidas de 304 pacientes encaminhados ao Laboratório de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas de Goiânia–GO (Bordim et al., 2005; Approbato et al, 1999). Os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido (Anexos 1 e 2). Estes pacientes tinham idade entre 15 - 69 anos, e foram diagnosticados com infertilidade idiopática, no período entre 2004 - 2006. Indivíduos com azoospermia obstrutiva, tumores ou filhos foram excluídos do estudo. Dados relativos aos pacientes, incluindo nome, idade na época do diagnóstico, tabagismo, etilismo, atividade profissional, antecedentes familiares e número de filhos ou não foram colhidos de questionários dos respectivos pacientes e anotados em formulários apropriados (Anexo 3). O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisas da Universidade Católica de Goiás, Goiânia – GO e Registrado no CEP/UCG sob o parecer número 150/2004, de 11 de novembro de 2004 (Anexo 4).

7.2 Coleta e Armazenamento das amostras

Foram coletados 10 mL de sangue periférico heparinizado, colhidos em tubo Falcon de 12 mL e preservados a - 20°C, para posterior extração de DNA.

As amostras de sêmen foram coletadas por masturbação, em coletores de plástico, com período de abstinência de no mínimo 3 e máximo 5 dias. A liquefação do material ocorreu por volta de 30 minutos após a coleta em temperatura ambiente (37°C) e em seguida o material foi armazenado em microtubos, rótulados e preservados a - 20°C, para posterior extração de DNA.

7.3 Espermograma

O sêmen foi analisado pela técnica estabelecida como padrão pela Organização Mundial da Saúde (OMS, 1999), no Laboratório de Reprodução Humana HC-UFG (Anexo 5).

7.4 Extração de DNA das amostras em estudo

Para a extração de DNA foi utilizado sangue total e/ou sêmen. A extração e purificação de DNA das amostras seguiram as instruções do kit Illustra Blood Genomic DNA (Amersham Pharmacia Biotech), de acordo com o protocolo sugerido pelo

fabricante. As amostras extraídas foram rotuladas e armazenadas a -20°C para utilização posterior nas reações de PCR.

7.5 Genotipagem dos *GSTM1* e *GSTT1* pela Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

As amostras foram submetidas à PCR em 25µL de reação, tendo a seguinte composição química (Tabela III):

Tabela III- Protocolo referente à composição química e concentrações dos reagentes utilizados nas reações de PCR - NPR 2008

REAGENTES	[] UTILIZADA	VOL. P/ 1 AMOSTRA
Tampão	1X	2,5 µL
MgCl ₂ (50mM)	1,5 mM	1,0 µL
dNTPs	1,25 mM de cada	0,5 µL de cada = 2 µL
Taq polimerase 5 U/µL	2,5 U/µL	0,3 µL
Primer sense	20 pMol	1 µL
Primer antisense	20 pMol	1 µL
H ₂ O Mili Q	---	13,2 µL
DNA amostra	200 ng/µL	4 µL
Volume final		25 µL

NPR: Núcleo de Pesquisas Replicon

Os fragmentos genômicos das amostras foram amplificados utilizando-se *primers* específicos para os genes *GSTM1*, *GSTT1* e RH92600 para PCR, nas seguintes condições (Tabela IV):

Tabela IV- Características moleculares dos primers RH92600, *GSTM 1* e *GSTT1*- NPR 2008

PRIMER	SEQÜÊNCIA	TAMANHO MOLECULAR
RH92600	F: 5' TCATATGCAAAACAGCTTCCC 3' R: 5' CTGGTCCTTCAAGCCTGTATG 3'	135pb
GSTM 1	F: 5' GAACTCCCTGAAAAGCTAAAGC 3' R: 5' GTTGGGCTAAATATACGGTGG 3'	215pb
GSTT 1	F: 5' TTCCTTACTGGTCCTCACATCTC 3' R: 5' TCACCGGATCATGGCCAGCA 3'	480pb

NPR: Núcleo de Pesquisas Replicon Fonte: Rohr et al., 2004

A amplificação da seqüência do DNA de interesse foi submetida por 35 ciclos que seguem a seguinte seqüência (Tabela V):

Tabela V- Protocolo de ciclagem das reações de PCR Multiplex - NPR 2008

TEMPERATURA	TEMPO	Nº. CICLOS
94°C	5 minutos	1
94°C	1 minuto	
56°C	90 segundos	35
72°C	1 minuto	
72°C	7 minutos	1
4°C	∞	---

NPR: Núcleo de Pesquisas Replicon

Para análise dos produtos obtidos pela PCR, o volume total da reação (25µL) foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 2,0 % em solução tampão Tris-borato de EDTA (TBE) a 1x. O gel foi submetido a um campo elétrico constante de 8 V/cm por um período de 2 horas aproximadamente. Posteriormente, o gel foi corado com brometo de etídio (EtBR) 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), para análise da amplificação. A amplificação do fragmento de 135pb refere-se ao primer RH92600, sendo este usado como controle endógeno da reação. Quando visualizados fragmentos de 215pb e 480pb, atribuiu-se genótipo positivo para *GSTM1* e *GSTT1*, respectivamente. Os genótipos *GSTM/TI*(nulo) foram identificados pela ausência dos fragmentos de amplificação de 215pb e 480pb, respectivamente para um gene ou para ambos, desde que o controle interno fosse visualizado (Figura 6).

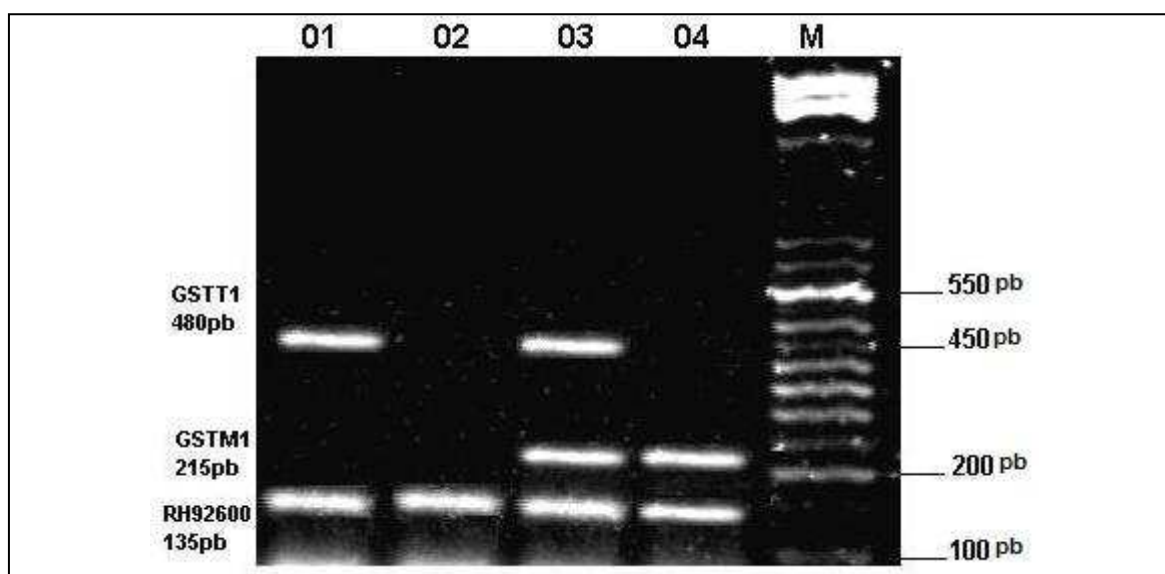


Figura 6: Gel de agarose a 2% indicando resultado da genotipagem do gene *GSTM1* e *GSTT1*. Amostra de sêmen; 01: *GSTT1* positivo; 02: *GSTM1* / *GSTT1* nulos; 03: *GSTM1* / *GSTT1* positivos; 04: *GSTM1* positivo; M: ladder (50 pb). RH92600: controle endógeno da reação.

7.6 Análise Estatística

Os dados da genotipagem, tanto dos casos como dos controles, foram tabulados em planilhas do software Excel® (2003). Posteriormente o teste qui-quadrado foi utilizado para verificação de possíveis associações entre a análise molecular e a infertilidade idiopática masculina. O programa BioEstat® 3.0 (Sociedade Civil Mamirauá / MCT-CNPq) foi utilizado para realização dos testes.

8. Resultados

A média de idade observada entre os pacientes com alteração, segundo laudo de espermograma foi de 34,66 (DP±7,46), próxima da média observada para os pacientes normais de 33,38 (DP ±10,01). A utilização do teste de normalidade de variáveis permitiu a comprovação da homogeneidade entre os grupos pacientes normais e pacientes alterados ($P = 0,096$) [Tabela VI].

Tabela VI- Comparação entre a média de idade dos pacientes normais e pacientes alterados - Laboratório de Reprodução Humana do HC 2004 - 2006

GRUPO	N	MÉDIA	DP	<i>p</i>
Idade				
Normais	134	33,38	10,01	
Alterados	170	34,66	7,46	0,096

Legenda: HC: Hospital das Clínicas

Teste: U Mann Whitney;

As frequências fenotípicas baseadas nos laudos de espermograma foram normais em 44,1% (134/304) e alterados 58,9% (170/304). Sendo que 27,1% (46) dos pacientes alterados são oligozoospermicos, 22,4% (38) astenozoospermicos, 24,7% (42) teratozoospermicos e 25,9% (44) azoospermicos. Pelo teste do χ^2 , a diferença estatística entre os grupos de pacientes mostrou-se significativa para o grupo de pacientes alterados ($P < 0,001$) [Tabela VII].

Tabela VII- Distribuição fenotípica entre os pacientes estudados baseado no laudo do espermograma - Laboratório de Reprodução Humana do HC 2004 - 2006

GRUPO	N	%	<i>p</i>
Espermograma			
Normal	134	44,1	
Oligo	46	27,1	
Asteno	38	22,4	< 0,001
Terato	42	24,7	
Azoo	44	25,9	
Total	304	100,0	

Legenda: Oligo: oligozoospermia, Asteno: astenozoospermia, Terato: teratozoospermia, Azoo: azoospermia; HC: Hospital das Clínicas

Teste qui-quadrado

Dentre as amostras de DNA de sêmen analisadas, verificou-se que a frequência do genótipo nulo para ambos os genes *GSTM1* e *GSTT1* foi de 28,6% (30/105) dentre os pacientes normais. O genótipo nulo para ambos os genes *GSTM1* e *GSTT1* se mostrou o

mais freqüente dentre os pacientes alterados 50,0% (64/128). Na avaliação do genótipo *GSTMI* (positivo) e *GSTTI* (nulo) respectivamente, os pacientes do grupo normal apresentaram 9,5% (10) e 7,8% (10) eram do grupo alterado. A freqüência genotípica *GSTMI* (nulo) e *GSTTI* (positivo) dentre os pacientes normais é a mais significativa 32,4% (34), já os pacientes alterados apresentam freqüência genotípica *GSTMI* (nulo) e *GSTTI* (positivo) de 18,8% (24). O genótipo positivo para ambos os genes *GSTMI* e *GSTTI* corresponde a 29,5% (31) entre os normais e 23,4% (30) entre os alterados. Quando analisada a freqüência genotípica dentro de cada um dos grupos de pacientes normais e alterados, verifica-se a significativa relação estatística entre o polimorfismo do gene *GSTMI* e *GSTTI* com a infertilidade masculina idiopática ($P = 0,008$) [Tabela VIII].

Tabela VIII- Distribuição da freqüência genotípica das amostras de sêmen dos pacientes do grupo normal e alterado – NPR 2008

GRUPO	NORMAL		ALTERADO		<i>p</i>
	N	%	N	%	
SÊMEN					
<i>GSTMI / GSTTI</i>					
0 0	30	28,6	64	50,0	
1 0	10	9,5	10	7,8	
0 1	34	32,4	24	18,8	0,008
1 1	31	29,5	30	23,4	
Total	105	100,0	128	100,0	

Legenda: 0- genótipo nulo; 1- genótipo positivo; NPR; Núcleo de Pesquisas Replicon
Teste qui-quadrado

Ao serem analisadas as freqüências genotípicas das amostras de sangue tanto de pacientes normais e alterados, observou-se diferenças quando comparada as amostras de sêmen. Nenhuma relação significativa entre o polimorfismo dos genes *GSTMI* e *GSTTI* e a infertilidade masculina idiopática ($P = 0,429$). As freqüências gênicas nas amostras de sangue se distribuem: genótipo nulo para ambos os genes *GSTMI* e *GSTTI*, este se mostrou o mais freqüente dentre os dois grupos de pacientes normais 46,6% (34) e 58,4% (73) alterados. O genótipo *GSTMI* (positivo) e *GSTTI* (nulo) representam 16,4% (12) dos normais e 11,2% (14) dos alterados. A freqüência genotípica *GSTMI* (nulo) e *GSTTI* (positivo) representa 19,2% (14) em pacientes normais e 16,0% (20) em pacientes alterados, enquanto que a freqüência genotípica para ambos os genótipos positivos *GSTMI/TI* (positivo) representam 17,8% (13) dos pacientes normais e 14,4% (18) dos pacientes alterados. A distribuição das respectivas freqüências encontra-se na Tabela IX.

Tabela IX- Frequência genotípica das amostras de sangue dos pacientes do grupo normal e alterado - NPR 2008

GRUPO	NORMAL		ALTERADO		<i>p</i>
	N	%	N	%	
Sangue					
<i>GSTMI / GSTTI</i>					
0 0	34	46,6	73	58,4	0,429
1 0	12	16,4	14	11,2	
0 1	14	19,2	20	16,0	
1 1	13	17,8	18	14,4	
Total	73	100,0	125	100,0	

Legenda: 0- genótipo nulo; 1- genótipo positivo; NPR: Núcleo de Pesquisas Replicon
Teste qui-quadrado

Para verificar se a presença do polimorfismo dos genes *GSTMI* e *GSTTI* era encontrada em uma mesma frequência quando analisadas amostras de sangue e sêmen de um mesmo paciente, foi realizado o teste estatístico χ^2 entre as variáveis apresentadas na Tabela X. Sendo assim, do total de 127 pacientes que tiveram amostras de sangue e sêmen concomitantemente analisadas; a maioria 57,1% (40) dos pacientes apresentou genótipo *GSTMI/TI* (nulo) tanto para as amostras de sangue quanto para as de sêmen e o genótipo que aparece em menor frequência é *GSTMI* (nulo) e *GSTTI* (positivo) no sangue e *GSTMI* (positivo) e *GSTTI* (nulo) no sêmen sendo 0,0% (0,0). A diferença polimórfica encontrada entre as amostras de sangue e sêmen destes pacientes mostrou-se significativa ($P= 0,022$) [Tabela X].

Tabela X- Comparação entre o polimorfismo *GSTMI* e *GSTTI* das amostras pareadas de sangue e sêmen dos pacientes normal e alterado - NPR 2008

SANGUE									
<i>GSTMI / GSTTI</i>	N	%	N	%	N	%	N	%	<i>p</i>
Sêmen									
<i>GSTMI / GSTTI</i>									
0 0	40	57,1	6	35,3	5	29,4	8	34,8	0,022
1 0	6	8,6	4	23,5	0	0,0	1	4,3	
0 1	10	14,3	3	17,6	6	35,3	3	13,0	
1 1	14	20,0	4	23,5	6	35,3	11	47,8	
Total	70	100,0	17	100,0	17	100,0	23	100,0	

Legenda: 0- genótipo nulo; 1- genótipo positivo; NPR: Núcleo de Pesquisas Replicon
Teste qui-quadrado

As mesmas amostras de sangue e sêmen foram analisadas separadamente dentro dos grupos normal e alterado. Sendo assim verificamos que o polimorfismo dos genes *GSTMI* e *GSTTI* dentro o grupo de pacientes normais nada alteram ($P= 0,715$) e a

freqüência genotípica de maior expressão é *GSTM1/T1* (nulo) tanto para o sangue quanto para o sêmen 36,4% (8) [Tabela XI].

Tabela XI - Comparação entre o polimorfismo *GSTM1* e *GSTT1* das amostras de sangue e sêmen dos pacientes normais - NPR 2008

SANGUE									
<i>GSTM1 / GSTT1</i>	0 0	%	1 0	%	0 1	%	1 1	%	<i>p</i>
Sêmen									
<i>GSTM1 / GSTT1</i>									
0 0	8	36,4	2	28,6	4	57,1	1	12,5	0,715
1 0	2	9,1	1	14,3	0	0,0	0	0,0	
0 1	5	22,7	2	28,6	1	14,3	2	25,0	
1 1	7	31,8	2	28,6	2	28,6	5	62,5	
Total	22	100,0	7	100,0	7	100,0	8	100,0	

Legenda: 0- genótipo nulo; 1- genótipo positivo; NPR: Núcleo de Pesquisas Replicon
Teste qui-quadrado

Quando analisadas as amostras do grupo alterado separadamente, tanto de sangue como de sêmen, foi verificada uma associação entre o genótipo *GSTM1/T1* (nulo) polimórfico e uma das possíveis causas da infertilidade idiopática masculina ($P= 0,002$). O polimorfismo gênico mais freqüente neste grupo de amostras foi o *GSTM1/T1* (nulo) tanto para o sangue quanto para o sêmen 66,7% (32) [Tabela XII]. Foi realizado o teste de equilíbrio de Hardy-Weinberg para saber se a população estudada encontra-se em equilíbrio e o resultado aponta que não está em equilíbrio ($P < 0,0001$).

Tabela XII - Comparação entre o polimorfismo *GSTM1* e *GSTT1* das amostras de sangue e sêmen dos pacientes alterados – NPR 2008

SANGUE									
<i>GSTM1 / GSTT1</i>	0 0	%	1 0	%	0 1	%	1 1	%	<i>p</i>
Sêmen									
<i>GSTM1 / GSTT1</i>									
0 0	32	66,7	4	40,0	1	10,0	7	46,7	0,002
1 0	4	8,3	3	30,0	0	0,0	1	6,7	
0 1	5	10,4	1	10,0	5	50,0	1	6,7	
1 1	7	14,6	2	20,0	4	40,0	6	40,0	
Total	48	100,0	10	100,0	10	100,0	15	100,0	

Legenda: 0- genótipo nulo; 1- genótipo positivo; NPR: Núcleo de Pesquisas Replicon Teste qui-quadrado

Analisando as quatro alterações no espermograma, verificou-se que o genótipo nulo *GSTM1/T1* (nulo) foi o mais freqüente em todos os tipos de alterações e o genótipo menos freqüente dentre as alterações encontra-se o *GSTM1* (positivo) e *GSTT1* (nulo) em pacientes azoospermicos 10,0% (1). Já em relação à alteração no espermograma mais

relevante quando apresentado genótipo nulo para ambos os genes a oligozoospermia representa 39,1% (25), seguida da teratozoospermia 26,6% (17), astenozoospermia 21,9% (14) e por fim a azoospermia 12,5% (8). A relação estabelecida entre o genótipo das amostras de sangue dos pacientes alterados e o tipo de alteração seminal encontrada, não teve significância quando comparadas ($P= 0,434$) [Tabela XIII].

Considerando o genótipo positivo para ambos os genes como selvagem, os pacientes astenozoospermicos mostram ser os menos polimorficamente alterados dentre o grupo amostral de sêmen 36,7% (11) [Tabela XIII]. Sendo o genótipo nulo para ambos os genes observa-se que pacientes oligozoospermicos 39,1% (25) possuem uma maior chance de serem acometidos pela infertilidade idiopática e possivelmente atribuírem a fatores genéticos a causa desta patologia [Tabela XIII].

Tabela XIII– Relação entre o genótipo das amostras de sêmen dos pacientes alterados e os resultados dos exames de espermograma – NPR 2008

SÊMEN	M1 / T1		M1 / T1		M1 / T1		M1 / T1		<i>p</i>
	0-0	%	1-0	%	0-1	%	1-1	%	
Grupo alterado									
Exame									
Oligo	25	39,1	3	30,0	5	20,8	5	16,7	
Asteno	14	21,9	2	20,0	5	20,8	11	36,7	
Terato	17	26,6	4	40,0	11	45,8	9	30,0	0,434
Azoo	8	12,5	1	10,0	3	12,5	5	16,7	
Total	64	100,0	10	100,0	24	100,0	30	100,0	

Legenda: 0- genótipo nulo; 1- genótipo positivo; Oligo: oligozoospermia, Asteno: astenozoospermia, Terato: teratozoospermia, Azoo: azoospermia; NPR: Núcleo de Pesquisas Replicon
Teste qui-quadrado

Feita à mesma análise genotípica entre as amostras de sangue de pacientes alterados, verificou-se que dentre as 125 amostras analisadas, 58,4% (73) possuíam genótipo nulo para ambos os genes (Tabela XIV); concordando com os resultados encontrados nas amostras de sêmen apresentada anteriormente (Tabela XIII). O restante das amostras de sangue representa 11,2% (14) *GSTMI* (positivo) e *GSTTI* (nulo), 16,0% (20) são *GSTMI* (nulo) e *GSTTI* (positivo) e os 14,4% (18) restante possuem os dois genes mutados, *GSTMI/TI* (nulo) [Tabela XIV].

Com base na análise do exame e sua genotipagem foi observado que o genótipo nulo de ambos os genes era predominante e sendo assim se subdividia em: 32,9% (24) pacientes azoospermicos, seguido de 28,8% (21) olizoospermicos, 21,9% (16) teratozoospermicos e 16,4% (12) astenozoospermicos. A mesma relação estatística de não

significância entre o genótipo das amostras analisadas e a alteração semial, foi verificada nas amostras de sangue ($P= 0,738$) [Tabela XIV].

Considerando o genótipo positivo para ambos os genes como selvagem, os pacientes oligozoospermicos mostram ser os menos polimorficamente alterados dentre o grupo amostral de sangue 38,9% (7) [Tabela XIV].

Tabela XIV- Relação entre o genótipo das amostras de sangue dos pacientes alterados e os resultados dos exames de espermograma – NPR 2008

SANGUE	M1 / T1		M1 / T1		M1 / T1		M1 / T1		<i>p</i>
	Grupo alterado	0-0	%	1-0	%	0-1	%	1-1	
Exame									
Oligo	21	28,8	4	28,6	4	20,0	7	38,9	
Asteno	12	16,4	3	21,4	3	15,0	5	27,8	
Terato	16	21,9	4	28,6	5	25,0	1	5,6	0,738
Azoo	24	32,9	3	21,4	8	40,0	5	27,8	
Total	73	100,0	14	100,0	20	100,0	18	100,0	

Legenda: 0- genótipo nulo; 1- genótipo positivo; Oligo: oligozoospermia, Asteno: astenozoospermia, Terato: teratozoospermia, Azoo: azoospermia; NPR: Núcleo de Pesquisas Replicon
Teste qui-quadrado

A fim de verificar a predominância polimórfica de um dos dois genes dentro do grupo amostral, foram individualizados os genes *GSTMI* e *GSTTI* para cada uma das amostras estudadas e feita à análise estatística através do teste χ^2 entre as variáveis alteração no exame do espermograma e genótipo da amostra. Em 128 amostras de sêmen analisadas 29,7% (38) são oligozoospermicas, 25,0% (32) são astenozoospermicas, 32,0% (41) são teratozoospermicas e 13,3% (17) são azoospermicas. Os pacientes oligozoospermicos são predominantes em relação ao genótipo *GSTMI* (nulo) 78,9% (30), pois o genótipo *GSTMI* (positivo) em pacientes azoospermicos é o menos freqüente e representa apenas 35,3% (6) das amostras (Tabela XV). O gene *GSTTI* (nulo) está mais freqüente entre os pacientes oligozoospermicos 73,7% (28) assim como o gene *GSTMI*; igualmente ao *GSTMI* o gene *GSTTI* (positivo) também se encontra menos freqüente 47,1% (8) em pacientes azoospermicos. Tanto as frequências genotípicas do gene *GSTMI* e *GSTTI* não se mostraram significantes estatisticamente quando analisadas separadamente, ($P=0,350$) e ($P= 0,132$) respectivamente (Tabela XV).

Tabela XV– Distribuição independente do genótipo *GSTMI* e *GSTTI* de pacientes do grupo alterado, para amostras de sêmen – NPR 2008

Exame										
Grupo alterado	Oligo	%	Asteno	%	Terato	%	Azoo	%		<i>p</i>
SÊMEN										
<i>GSTMI</i>										
0	30	78,9	19	59,4	28	68,3	11	64,7		
1	8	21,1	13	40,6	13	31,7	6	35,3		0,350
Total	38	100,0	32	100,0	41	100,0	17	100,0		
<i>GSTTI</i>										
0	28	73,7	16	50,0	21	51,2	9	52,9		
1	10	26,3	16	50,0	20	48,8	8	47,1		0,132
Total	38	100,0	32	100,0	41	100,0	17	100,0		

Legenda: 0- genótipo nulo; 1- genótipo positivo; Oligo: oligozoospermia, Asteno: astenozoospermia, Terato: teratozoospermia, Azoo: azoospermia; NPR: Núcleo de Pesquisas Replicon. Teste qui-quadrado

A tabela XVI nos mostra a distribuição polimórfica de cada um dos genes em estudo dentro do grupo amostral sangue; sendo assim as 125 amostras de sangue se distribuem da seguinte maneira: 28,8% (36) são oligozoospermicos, 18,4% (23) são astenozoospermicas, 20,8% (26) são teratozoospermicas e 32,0% (40) são azoospermicas. Valores idênticos foram encontrados para as amostras de sangue dos pacientes oligozoospermicos e polimórficos tanto para os genes *GSTMI/TI* (nulo) 69,4% (25) e *GSTMI/TI* (positivo) 30,6% (36). Os pacientes astenozoospermicos também apresentaram resultados idênticos em relação à distribuição polimórfica dos genes *GSTMI* (nulo) e *GSTTI* (positivo), 65,2% (15) e 34,8% (8) respectivamente.

Com uma maior representatividade entre o grupo amostral sangue, os pacientes azoospermicos 32,0% (40) possuem predominantemente genótipo *GSTMI* (nulo) 80,0% (32) e quando se refere ao gene *GSTTI* há predominância também do genótipo nulo 67,5% (27). Apesar das diferenças estatísticas encontradas entre os grupos de pacientes teratozoospermicos *GSTMI* (nulo) 80,8% (21) e *GSTMI* (positivo) 19,2% (5), *GSTTI* (nulo) 76,9% (20) e *GSTTI* (positivo) 23,1% (6) e azoospermicos *GSTMI* (nulo) 80,0% (32) e *GSTMI* (positivo) 20,0% (8), *GSTTI* (nulo) 67,5% (27) e *GSTTI* (positivo) 32,5% (13), quando analisados os resultados referentes à distribuição genotípica independente de cada um dos genes não houve significância estatística quando comparados ao tipo de alteração no exame de espermograma ($P= 0,441$ para o gene *GSTMI* e $P= 0,813$ para o gene *GSTTI*); mostrando que independente do gene *GSTMI* ou *GSTTI* a ser mutado

alterações seminais apareceram numa mesma freqüência em homens com infertilidade idiopática. A distribuição das respectivas freqüências encontra-se na Tabela XV e XVI.

Tabela XVI– Distribuição independente do genótipo *GSTMI* e *GSTTI* de pacientes do grupo alterado, para amostras de sangue – NPR 2008

Exame Grupo alterado	Oligo	%	Asteno	%	Terato	%	Azoo	%	p
SANGUE									
<i>GSTMI</i>									
0	25	69,4	15	65,2	21	80,8	32	80,0	
1	11	30,6	8	34,8	5	19,2	8	20,0	0,441
Total	36	100,0	23	100,0	26	100,0	40	100,0	
<i>GSTTI</i>									
0	25	69,4	15	65,2	20	76,9	27	67,5	
1	11	30,6	8	34,8	6	23,1	13	32,5	0,813
Total	36	100,0	23	100,0	26	100,0	40	100,0	

Legenda: 0- genótipo nulo; 1- genótipo positivo; Oligo: oligozoospermia, Asteno: astenozoospermia, Terato: teratozoospermia, Azoo: azoospermia; NPR: Núcleo de Pesquisas Replicon
Teste qui-quadrado

A fim de verificar a influencia do hábito tabagista e etilista dos pacientes como uma possível causa da infertilidade, foi feita uma análise estatística correlacionando estes hábitos sociais ao fenótipo apresentado nos exames de espermograma, sendo assim dos 134 pacientes normais 30,6% (41) eram fumantes e 69,4% (93) não fumantes, já em relação 169 aos pacientes alterados, 27,8% (47) são fumantes e 72,2% (122) não fumantes. Apesar de muitos autores afirmarem que o cigarro é prejudicial à fertilidade masculina, não foi encontrado valores estatísticos significantes ($P= 0,596$). O consumo de bebida alcoólica também não demonstrou estar intimamente responsável pelo aumento da infertilidade masculina, já que dentre as 133 amostras de pacientes normais analisadas 51,9% (69) não bebiam e 48,1% (64) faziam uso de bebidas alcoólicas, e dentre os 169 pacientes alterados 51,5% (87) não bebiam e 48,5% (82) bebiam ($P= 0,945$) [Tabela XVII].

Na tentativa de verificar os efeitos dos xenobióticos no sistema reprodutor masculino, foram analisadas 134 amostras de pacientes normais e dentre estes 38,1% (51) não foram expostas a qualquer tipo de xenobióticos, mas 61,9% (83) pacientes alguma vez já estivemos expostos à xenobióticos. No grupo de pacientes com laudo de espermograma alterado 44,7% (76) pacientes não tiveram contato com xenobióticos, mas 55,3% (94) estavam expostos aos diversos tipos de xenobióticos e possivelmente muito deles poderiam

estar relacionadas às causas da infertilidade masculina idiopática destes pacientes, mas estatisticamente os dados não comprovam esta afirmativa ($P= 0,243$) [Tabela XVII].

Tabela XVII- Comparação das variáveis nos grupos estudados – NPR 2008

GRUPO	NORMAL	%	ALTERADO	%	<i>p</i>
Fuma					
Sim	41	30,6	47	27,8	0,596
Não	93	69,4	122	72,2	
Total	134	100,0	169	100,0	
Bebe					
Sim	69	51,9	87	51,5	0,945
Não	64	48,1	82	48,5	
Total	133	100,0	169	100,0	
Caxumba					
Sim	78	58,2	92	54,1	0,476
Não	56	41,8	78	45,9	
Total	134	100,0	170	100,0	
Xenobióticos					
Sim	51	38,1	76	44,7	0,243
Não	83	61,9	94	55,3	
Total	134	100,0	170	100,0	

Legenda: Xenobióticos – manuseio de metais pesados, exposição às pesticidas, irradiação por ondas eletromagnéticas, uso de quimioterápico, etc; NPR: Núcleo de Pesquisas Replicon
 Teste qui-quadrado

9. Discussão

Em homozigose os alelos nulo do gene *GSTM1* e *GSTT1* são considerados grupo de risco para muitas patologias, principalmente se expostos a elevados níveis de carcinógenos e compostos químicos, devido ao defeito enzimático em seu sistema de detoxificação (Nakata et al., 2004). Dentre as patologias encontradas na literatura associadas ao GST nulo, merecem destaque: câncer de pulmão (Duarte et al., 2006), oral (Drummond et al., 2004; Cha et al., 2007), ovário (Coughlin et al., 2002), cervical e uterino (Huang et al., 2006; Joseph et al., 2006), próstata (Quiñones et al., 2006); mama (Linhares et al., 2006); trato aerodigestivo (Soya et al., 2007), leucemias (Taspinar et al., 2008; Xiao et al., 2007; Rohr et al., 2004) e outras doenças, tais como: arterioesclerose da coronária (Manfredi et al., 2007), endometriose (Kim et al., 2007; Nakata et al., 2004; Sata et al., 2003; Hadfield et al., 2001) perda recorrente de gravidez (Sata et al., 2003) varicocele (Chen et al., 2002) e infertilidade masculina (Aydemir et al., 2007; Rubens et al., 2007; Schuppe et al., 2000; Fritsche et al., 1998; Pajarinen et al., 1996).

A infertilidade relacionada ao fator masculino está ligada a múltiplas irregularidades incluindo as de concentração, motilidade e morfologia espermática (Huynh et al., 2002).

Aproximadamente 25% dos casos de infertilidade conjugal estão atribuídos à diminuição da qualidade seminal. Uma das possíveis razões para este declínio seminal seriam os xenobióticos, aos quais os homens estariam expostos frequentemente e que poderiam afetar o sistema reprodutor masculino (Pasqualotto et al., 2008).

Ao analisarmos a idade dos homens com infertilidade idiopática verificamos homogeneidade para as amostras de pacientes com alterações espermáticas e pacientes normais. Apesar de ainda não estar bem definida a influência da idade na qualidade seminal. Pasqualotto et al., (2006), demonstraram que existe um decréscimo na concentração espermática após os 45 anos de idade. Moskovtsev et al (2006), após estudarem 1125 homens inférteis relatam que o dano no DNA espermático é significativamente maior em homens com mais de 40 anos de idade. A média de idade dos pacientes em nosso trabalho é de 34,66% em indivíduos com alterações de espermograma e 33,38% em indivíduos normais, mas a idade não mostrou-se significante.

O envelhecimento acarreta alterações sistêmicas no organismo. Neste contexto, incluem-se modificações morfofisiológicas testiculares e, conseqüentemente, na função reprodutiva masculina (Kuhnert et al., 2004; Slotter et al., 2006). Homens mais velhos apresentam menor volume seminal, concentração total de espermatozóides, vitalidade e aumento na morfologia espermática anormal com diminuição das formas normais e aumento na quantidade de espermatozóides com vacúolos citoplasmáticos (Kidd et al., 2001). Um dos cofatores para estas alterações morfofisiológicas testiculares seriam os xenobióticos.

A disponibilidade de informações sobre os polimorfismos do gene *GSTMI* e *GSTTI* na população brasileira é escassa. Rossit et al., (1999), em estudo realizado em brasileiras provenientes dos Estados do Pará e São Paulo, mostraram freqüência de 47,3 e 18% para os genótipos *GSTMI* (nulo) e *GSTTI* (nulo), respectivamente. Em nossos estudos indivíduos alterados apresentaram freqüência genotípica de (50,0%) quando analisamos o genótipo *GSTMI/TTI* (nulo) simultaneamente em amostras de sêmen. Pesquisadores chineses estudando pacientes com varicocele e inférteis, verificaram uma elevada incidência de *GSTMI* (nulo) (43,8%) (Chen et al., 2002).

A população analisada no presente estudo não está em equilíbrio de Hardy-Weinberg ($P < 0.0001$). Vários estudos indicam que os pressupostos do teorema de Hardy-Weinberg não são atendidos quando se analisa mutações, pois dificilmente uma população estará em equilíbrio devido a fatores como exposição ambiental e perfil genético variado (Crow., 1999). Iniesta et al., (2005), afirmam que casos envolvendo polimorfismos gênicos e que não cumpram o equilíbrio de Hardy-Weinberg podem ser um indicativo de que o polimorfismo esteja associado à enfermidade em estudo.

Georgellis & Rydstrom (1987) demonstraram, pela primeira vez, em modelo experimental a capacidade dos testículos de metabolizarem xenobióticos. As enzimas de fase I e fase II foram detectadas em tecido testicular de animais de laboratório (ex. camundongos). O polimorfismo nos genes *GSTMI* e *GSTTI* têm sido associados à infertilidade masculina (Schuppe et al., 2000) e também á infertilidade feminina (Hadfield et al., 2001; Sata et al., 2003).

Quando analisadas a freqüência genotípica dentro de cada um dos grupos de pacientes normais e alterados em amostras de sêmen, verifica-se significativa relação estatística entre o polimorfismo do gene *GSTMI* e *GSTTI* com a infertilidade masculina

idiopática. O genótipo *GSTM1/T1* (nulo) é o mais frequente em indivíduos com laudo de espermograma alterado e a oligozoospermia a alteração seminal em que mais se associa ao polimorfismo nulo das GST M1 e T1.

Em nosso estudo o genótipo *GSTM1/T1* (nulo) e o genótipo selvagem *GSTM1/T1* (positivo) foram encontrados numa frequência de 29% em indivíduos normais e em indivíduos com laudo de espermograma alterado a frequência genotípica de 50,0% quando *GSTM1/T1* (nulo) e 23,4% quando *GSTM1/T1* (positivo). Fritsche et al., (1998), relataram que indivíduos com infertilidade segundo laudo de espermograma possuem frequências elevadas para o polimorfismo das enzimas de fase I CYP1A1, já que esta enzima participa do metabolismo de substratos endógenos, dentre eles os hormônios esteróides. Um estudo na Turquia com indivíduos inférteis segundo os critérios da OMS demonstrou que não há diferença significativa na frequência genotípica *GSTM1* (nulo) entre pacientes do grupo infértil (51,9%) quando comparado ao grupo controle (46,7%) [Aydemir et al., 2007]. Entretanto, este mesmo autor verificou a associação entre o polimorfismo do gene *GSTM1* e marcadores de estresse oxidativo em pacientes com infertilidade idiopática.

A análise de nossos resultados permitiu concluir que a presença de pelo menos um alelo não mutado do gene *GSTM1* e *GSTT1* protege o indivíduo contra os efeitos nocivos dos xenobióticos ao DNA, visto que o gene *GSTM1* (nulo) é duas vezes maior em indivíduos normais quando somente T1 está presente, e sem diferença quando M1 presente. Estes achados nos levam a ressaltar a importância do gene *GSTT1* no processo de detoxificação testicular, apesar de que a maioria dos trabalhos que associam a infertilidade masculina e o polimorfismo das GSTs tem como gene de estudo *GSTM1*.

Uma possível explicação para os indivíduos pertencentes ao grupo alterado e genótipo selvagem seria a causa da infertilidade atribuída a outros fatores, tais como: microdeleções do cromossomo Y (Farah et al., 2003); alterações cromossômicas (Maduro et al., 2002); varicocele (Jarow., 2001); uso de álcool (Benoff et al., 2000); tabaco (Mehranian et al., 2007) e espécies reativas de oxigênio (Gracia et al., 2005). A ausência em homozigose dos genes *GSTM1* e *GSTT1* ocasionam efeitos citotóxicos e genotóxicos no aparelho reprodutor masculino, pois os xenobióticos não detoxificados impedem as células de Sertoli e Leydig de exercerem suas funções durante a espermatogênese (Castellón et al., 1999).

Nossos resultados estão de acordo com Chen et al., (2002), que associaram o elevado polimorfismo *GSTMI* (nulo) em homens com varicocele e varicocele subclínica quando comparado à indivíduos férteis. Neste mesmo trabalho utilizando um programa computadorizado (*CASA - computer assisted semen analysis*) a avaliação da função espermática de 80 pacientes com varicocele, demonstrou que indivíduos com genótipo *GSTMI*(nulo) apresentavam redução na qualidade morfológica e motilidade seminal. Em nosso trabalho a oligospermia representa a alteração seminal com maior frequência tanto para *GSTMI* (78,9%) quanto *GSTTI* (73,7%), apesar de não ser significante..

Estes dados estão em conformidade com a pesquisa feita por Alkan et al., (1997), que relataram uma predominância de homens *GSTMI* (nulo) e inférteis com laudo de espermograma oligozoospermicos somente ou associados à astenozoospermia ou teratozoospermia. Uma possível explicação para redução espermática em indivíduos *GSTMI/TI* (nulo) seria a redução no volume dos túbulos seminíferos e o aumento de fibroses no tecido testicular, já que o acúmulo de xenobióticos não detoxificados na região testicular danificariam a matriz celular das células testiculares, o que acarretaria danos à espermatogênese (Pajarinen et al., 1996).

Existem inúmeros fatores clínicos que se associam a oligozoospermia: idade, patologias inflamatórias, auto-imunidade, disfunções hormonais, ingestão de álcool, fumo, agrotóxicos, período de abstinência, fatores genéticos e idiopáticos (Pasqualotto et al., 2006). Dentre os fatores idiopáticos, as alterações no genoma dos gametas (polimorfismos), a presença de xenobióticos e alterações hormonais podem constituir prováveis causas de degradação da homeostasia testicular (Shefi et al., 2006).

A associação entre espermatozoides imaturos e produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) está intimamente relacionada à redução da qualidade seminal (Pasqualotto et al., 2008; Smith et al., 2007; Alvarez et al., 2006; Arabi et al., 2005).

Em humanos, vários estudos em clínicas de fertilização têm demonstrado que a glutathiona reduzida (GSH) está presente no plasma seminal e o nível deste anti-oxidante não enzimático é significativamente menor no sêmen de indivíduos inférteis quando comparados com indivíduos normais (Hemachand et al., 2003).

Quando analisadas amostras de sangue o polimorfismo do gene *GSTMI/ TI* (nulo) não se mostraram significativos, assim como não houve associação com nenhuma alteração seminal específica.

Como o genoma humano diplóide consiste em 22 pares de cromossomos autossômicos e 1 par de cromossomos sexuais (X/Y ou X/X) (Jarvi et al., 2008), espera-se que um indivíduo possua um mesmo perfil polimórfico para um determinado gene, independente do tipo celular a ser coletado e estudado. Analisando o perfil polimórfico de 127 indivíduos encontramos resultados surpreendentes, pois amostras de sangue (células somáticas) e sêmen (células germinativas) entre os pacientes alterados de um mesmo indivíduo possuíam diferenças genotípicas. Indivíduos alterados que possuíam genótipo *GSTM1/T1* (positivo) para as amostras de sangue e genótipo *GSTM1/T1* (nulo) para sêmen frequência de (46,7%), já indivíduos alterados que possuíam genótipo *GSTM1/T1*(nulo), para as amostras de sangue e genótipo *GSTM1/T1*(positivo) para sêmen, frequência de (14,6%). Assim verificamos uma significativa diferença polimórfica quando analisadas tipos celulares diferentes de um mesmo paciente ($P= 0,002$). O genótipo *GSTM1/T1* (nulo) em pacientes alterados foi o mais freqüente (66,7%) quando observado nas análises de DNA sangue/semên agrupadas. Isto nos prova o conceito relatado por (Fritsche et al., 1998) de que o polimorfismo das glutionas S-transferases pode codeterminar uma susceptibilidade genética individual para as desordens reprodutivas masculinas.

Nossos achados sugerem que pode ter ocorrido alteração do polimorfismo das enzimas glutionas S-transferases (GST) de fase I e fase II durante a espermatogênese, devido a influência de xenobióticos. Os espermatozoides podem sofrer danos devido ao grande número de divisões celulares e ao estresse oxidativo durante a espermatogênese, um importante mecanismo fisiopatológico (Leduc et al., 2008; Aydemir et al., 2007; Hemachand et al., 2003). Assim, a GST exerceria sua função detoxificante mais intensamente nas células espermáticas tentando atenuar a formação de aductos de DNA, essa intensa atividade mitótica propiciaria o aumento de mutações e conseqüentemente diferenças polimórficas nas enzimas de fase I e II.

Com relação ao etilismo verifica-se que muitas vezes ele está associado a disfunções testiculares, pois a oxidação do álcool compete com a produção testicular da testosterona e conseqüentemente leva a uma redução no volume e concentração seminal (Pasqualotto et al., 2004). Embora os efeitos do álcool em pacientes com infertilidade masculina idiopática sejam controversos na literatura analisada, nossos resultados estão em conformidade com as pesquisas de Moura et al., (2001), pois não foi encontrada influência significativa do consumo de álcool nos parâmetros básicos dos espermogramas analisados.

O *GSTM1* (nulo) e o consumo de álcool, pode representar um importante fator na susceptibilidade de pacientes desenvolverem danos espermatozoides (Pasqualotto et al., 2004). Pajarinen et al. (1996) analisando o polimorfismo desta enzima de detoxificação e as desordens causadas na espermatogênese pela indução do consumo de bebidas alcoólicas encontraram frequência genotípica *GSTM1* (nulo) (45,8%). Apesar de que no grupo amostral de homens que consumiam mais de 80mg de álcool por dia, indivíduos com genótipo *GSTM1* (nulo) mostraram-se menos propensos a desenvolver danos testiculares, comparado com os que possuíam *GSTM1* funcional. Uma possível explicação para este inesperado resultado seria que o genótipo *GSTM1* (nulo) poderia resultar em uma maior quantidade de glutatona reduzida (GSH) que seria usada na detoxificação de compostos nocivos.

Já com o tabaco, a maior prevalência de fumantes é observada entre homens jovens adultos durante o período reprodutivo sendo que 46% dos fumantes estão na faixa etária entre 20-39 anos (Trummer et al., 2002). Muitos estudos relatam associação entre os efeitos do tabaco e infertilidade (Arabi et al., 2005). Pasqualotto et al., (2008) relatam que os parâmetros seminais de homens fumantes são inferiores ao de homens não fumantes.

Em nosso estudo não encontramos relação de significância entre o tabagismo e pacientes com alterações seminais (fenótipo alterado) e o polimorfismo nas enzimas *GSTM1* e *T1* detoxificante de xenobióticos. Os mecanismos pelos quais os componentes do cigarro afetam a qualidade seminal ainda não estão bem esclarecidos. Kunzle et al., (2003), relatam que os compostos químicos do tabaco alteram a qualidade seminal. Indivíduos tabagistas possuem menor capacidade anti-oxidante no plasma seminal (Chen et al., 2002), e conseqüentemente apresentam danos na cromatina e aductos no DNA espermático. Em um estudo prospectivo, Saleh et al., (2002), compararam homens inférteis fumantes com inférteis não fumantes; verificou-se que homens fumantes estavam associados ao aumento da concentração de leucócitos no plasma seminal (~ 48%) e o nível de ROS aumentado em 107%.

Até o momento ainda não há um consenso a respeito do real efeito do tabaco na fertilidade masculina (Pasqualotto et al., 2008; Ramlau-Hansen et al., 2007; DeMarini 2004). Um fator que deve ser levado em consideração é a susceptibilidade genética individual do organismo em metabolizar os diversos componentes do cigarro (Arabi et al., 2005; Saleh et al., 2002; Sharma et al., 2001).

Estudos epidemiológicos do polimorfismo metabólico poderão identificar populações com risco de desenvolver infertilidade devido à exposição à xenobióticos. Desta maneira, estudos futuros são necessários tanto no metabolismo das enzimas de fase I como de fase II, e também a elucidação de mais detalhes fenotípicos e suas respostas aos diferentes genótipos.

10. Conclusão

- No presente estudo verifica-se a significativa relação estatística entre o polimorfismo do gene *GSTM1* e *GSTT1* (nulo) com a infertilidade masculina idiopática;
- O genótipo *GSTM1/T1* (nulo) é o mais freqüente dentro do grupo de indivíduos com laudo de espermograma alterado;
- Indivíduos com genótipo *GSTM1/T1* (nulo) são mais susceptíveis a redução de número (oligozoospermia) na qualidade seminal quando comparado as demais alterações seminais;
- Não houve associação entre o álcool e os parâmetros básicos dos espermogramas analisados;
- Não houve associação entre o tabaco e o polimorfismo nulo da glutathione S-transferase M1 e T1 dos indivíduos analisados;
- No que tange a idade houve homogeneidade entre os grupos normal e alterado.

11. Referências Bibliográficas

- Abdelmassih R. Estudo do Fator Masculino. In: Scheffer BB, Remohi J, García-Velasco J, Pellicer A, Simón C. Reprodução Humana Assistida; 1th ed. São Paulo: Atheneu; 2003: 41-58.
- Achermann JC, Ozisik G, Meeks JJ and Jameson JL (2002). Genetic causes of human reproductive disease. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 87: 2447-2454.
- Agarwal A, Saleh RA and Bedaiwy MA (2003). Role of reactive oxygen species in pathophysiology of human reproduction. *Fertil. Steril.* 79: 829-8243.
- Alkan I, Simsek F, Haklar G, Ozveri H, et al. (1997). Reactive oxygen species production by the spermatozoa of patients with idiopathic infertility: relationship to seminal plasma antioxidants. *J. Urol.* 157: 140-143.
- Alvarez CA and Moraes GV (2006). Efeitos da selenometionina e vitamina C sobre o sêmen. *Sábios: Rev. Saúde. Biol.* 1: 42-51.
- Amorim LMF, Rossini A, Mendonça G, Lotsch P, et al. (2002). CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms and breast cancer risk in Brazilian women. *Cancer. Lett.* 181: 179-186.
- Approbato MS, Moura KKVO, Barbosa EFMC and Gomide NC (1999). Prevalência de infertilidade masculina e sua correlação com os fatores sócio-ambientais. In: 48 *Cong Bras Gineco Obst*; Goiânia-GO.
- Arabi M and Mosthaghi H (2005). Influence of cigaret smoking on spermatozoa via seminal plasma. *Androl.* 37: 119-124.
- Arruda JT, Approbato MS and Moura KKVO (2007). O Fator Masculino em Casais Inférteis. *LAES&HAES.* 165.
- Arruda JT, Santos PR, Mesquita WEJC and Moura KKVO (2007). Causas genéticas para a infertilidade masculina. *Reprod. Clim.* 22: 112-118.
- Arruda VR, Grinolli CE, Gonçalves MS, Soares MC, et al. (1998). Prevalence of homozygosity for the deleted alleles of glutathione S-transferase um (GSTM1) and (GSTT1) among distinct ethnic groups from Brazil: Relevance to environmental carcinogenesis. *Clin. Genet.* 54: 210-214.

- ASRM - American Urological Association (AUA) & American Society for Reproductive Medicine. Report on optimal evaluation of the infertile male 2004. [Online] Disponível em: www.auanet.org/timssnet/products/guidelines/mainreports/optimalevaluation.pdf
- Aydemir B, Onaran I, Kiziler AR, Alici B, et al. (2007). Increased oxidative damage of sperm and seminal plasma in men with idiopathic infertility is higher in patients with glutathione S-transferase Um-1 null genotype. *Asian. J. Androl.* 9: 108-115.
- Benoff S, Jacob A and Hurley IR (2000). Male infertility and environmental exposure to lead and cadmium. *Hum. Reprod.* 6: 107-121.
- Bernardino ALF, Lima CE and Zatz M (2003). Analysis of mutations in the cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR) gene in patients with obstructive azoospermia. *Genet. Mol. Biol.* 26:1-3.
- Boccia S, Cadoni G, Sayed-Tabatabaei FA, Volante M, et al. (2008). CYP 1A1, CYP2E1, GSTM1, GSTT1, EPHX1 exons 3 and 4, and NAT2 polymorphisms, smoking, consumption of alcohol and fruit and vegetables and risk of head and neck cancer. *J. Cancer. Res. Clin. Oncol.* 134 :93-100.
- Bolarine O, Masoud A, Spyros P, Khaldoun S, et al. (2003). Accuracy of sperm-cervical mucus penetration testes in evaluating sperm motility in semen: a systematic quantitative review. *Hum. Reprod.* 18: 1037-1046.
- Bordin BM, Arruda JT, Miranda LCB, Maia DLM, et al. (2005). Alterações no espermiograma e a associação com tabagismo e etilismo. *32 Cong Bras Análises Clínicas; Goiânia-GO.*
- Branigan EF, Estes MA and Muller CH (1999). Advanced semen analysis: a simple screening test to predict intrauterine insemination success. *Fertil. Steril.* 71: 547-551.
- Carrara RCV, Yamasaki R, Mazucatto LF, Veludo MAL, et al. (2004). Somatic and germ cell cytogenetic studies and AZF microdeletion screening in infertile men. *Genet. Mol. Biol.* 27: 477-482.
- Casals T, Bassas L, Chillón M, Giménez T, et al. (2000). Heterogeneity for mutations in the CFTR gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum. Reprod.* 15: 1476-1483.

- Castellón EA (1999). Influence of age, hormones and germ cells on glutathione S-transferase activity in cultured Sertoli cells. *Int. J. Androl.* 22: 49-55.
- Castro A, López P, Johnson MC, Sovino H, et al. (2000). Microdeleção del cromossoma Y en paciente infértil oligozoospermico severo. *Rev. Med. Chile.* 128: 778-782.
- Cha IH, Park JY, Chung WY, Choi MA, et al. (2007). Polymorphisms of CYP1A1 and GSTM1 Genes and Susceptibility to Oral Cancer. *Yonsei. Med. J.* 48: 233-239.
- Chandley AC (1979). The chromosomal basis of human infertility. *Br. Med. Bull.* 35: 181-186.
- Chen SS, Chang LS, Chen HW and Wei YH (2002). Polymorphisms of glutathione S-transferase M1 and male infertility in Taiwanese patients with varicocele. *Hum. Reprod.* 17: 718-725.
- Cocuzza M, Sikka SC, Athayde KS and Agarwal A (2007). Clinical Relevance of Oxidative Stress and Sperm Chromatin Damage in Male Infertility: An Based Analysis. *Int. Braz. J. Urol.* 33: 603-621.
- Cooke HJ and Saunders PT (2002). Mouse models of male infertility. *Nat. Rev. Genet.* 3: 790-801.
- Costa C, Teixeira JP, Silva S, Roma-Torres J, et al. (2006). Cytogenetic and molecular biomonitoring of a Portuguese population exposed to pesticides. *Mutagenesis.* 21: 343-350.
- Coughlin SS and Hall IJ (2002). Glutathione S Transferase Polymorphisms and Risk of Ovarian Cancer. *Genet. Med.* 4: 250-257.
- Crow JF (1999). Hardy, Weinberg and language impediments. [*Genetics.* 152: 821-825.](#)
- De Araújo CHM, de Araújo MCPM, Martins WP, Ferriani RA, et al. (2007). Gametogênese: estágio fundamental do desenvolvimento para reprodução humana. *Medicina – RP.* 40: 551-558.
- De Carvalho OF, Ferreira JDJ, Silveira NA and Freneau GE (2002). Efeito oxidativo do óxido nítrico e infertilidade no macho. *J. Bras. Patol. Med. Lab.* 38: 33-38.

- De Kretser DM and Baker HWG (1999). Infertility in men: recent advances and continuing controversies. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 84: 3443-3450.
- DeMarini DM (2004). Genotoxicity of tabaco smoke and tabacco smoke condensate: a review. *Mutation. Research.* 567: 447-474.
- Devoto EC, Madariaga M and Lioi XC (2000). Factores causales de infertilidad masculina. Contribución del factor endocrino. *Rev. Med. Chile.* 128: 184-192.
- Diemer T and Desjardins C (1999). Developmental and genetic disorders in spermatogenesis. *Hum. Reprod.* 5: 120-140.
- Do Vale Bosso RM, Amorim LMF, Andrade SJ, Rossini A, et al. (2006). Effects of genetic polymorphisms CYP1A1, GSTM1, GSTT1 and GSTP1 on urinary 1-hydroxypyrene levels in sugarcane workers. *Science. Total. Environment.* 370: 382-390.
- Duarte RLM and Paschoal MEM (2006). Marcadores moleculares no câncer de pulmão: papel prognóstico e sua relação com o tabagismo. *J. Bras. Pneumol.* 32: 56-65.
- Drummond SN, De Marco L, Noronha JC and Gomez RS (2004). GSTM1 polymorphism and oral squamous cell carcinoma. *Oral. Oncol.* 40: 52-55.
- Fan C, Jin M, Chen K, Zhang Y, et al. (2007). Case-only study of interactions between metabolic enzymes and smoking in colorectal cancer. *BMC. Cancer.* 7: 150.
- Farah LMS, Carrara R de CV and Yamasaki R (2003). Genética e Infertilidade Masculina. *Int. Braz. J. Urol.* 29: 28-31.
- Ferrás C, Costa P, Fernandes S, Carvalho F, et al. (2004). Importância do Estudo das Microdeleções do Cromossoma Y na Infertilidade Masculina. *Acta. Urológica.* 21: 17-26.
- Ford JG, et al. (2000). Glutathione S-transferase M1 polymorphism and lung cancer risk in African-Americans. *Carcinogenesis.* 21: 1971-1975.
- Fritsche E, Schuppe HC, Dohr O, Ruzicka T, et al. (1998). Increased frequencies of cytochrome P4501A1 polymorphisms in infertile men. *Androl* 30: 125-128.
- Gajeccka M, Ryzanicz M, Sztul-Jaskula R, Kujawski M, et al. (2005). CYP1A1, CYP2D6, CYP2E1, NAT2, GSTM1 and GSTT1 polymorphisms or their

combinations are associated with the increased risk of the laryngeal squamous cell carcinoma. *Mutation. Res.* 574:112-123.

- Gandolfi AJ and Sipes IG (1991). Biotransformation of toxicants. *Casarett. Doull's Toxicology.* 4: 88-126.
- Gattás GJF, Kato M, Soares-Vieira JÁ, Siraque MS, et al. (2004). Ethnicity and glutathione S-transferase (GSTM1/GSTT1) polymorphisms in a Brazilian population. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 37: 451-458.
- Georgellis A and Rydstrom J (1987). Cell-specific metabolic activation of 7,12-Dimethylbenz(a)anthracene in rat testis. *Chem. Biol. Interact.* 72: 65-78.
- Gooren LJG (1998). Endocrine aspects of ageing in the male. *Mol. Cel. Endo.* 145: 153-159.
- Gracia CR, Sammel MD, Coutifaris C, Guzick DS, et al. (2005). Occupational Exposures and Male Infertility. *Am. J. Epidemiol.* 162: 729-733.
- Guzick DS, Overstreet JW, Factor-Litvak P, Brazil CK, et al. (2001). Sperm morphology, motility and concentration in fertile and infertile men. *N. Engl. J. Med.* 345: 1388-1393.
- Habdous M, Siest G, Vicent-Viry M and Visvikis S (2004). Polymorphismes des glutathione S-transférases et pathologies humaines: ilan des etudes épidémiologiques. *Ann. Biol.Clin.* 62: 15-24.
- Hadifield RM, Manek S, Weeks DE, Mardon HJ, et al. (2001). Linkage and association studies of the relationship between endometriosis and genes encoding the detoxification enzymes GSTM1, GSTT1 and CYP1A1. *Mol. Hum. Reprod.* 7: 1073-1078.
- Hatagima A (2002). Genetic polymorphisms and metabolism of endocrine disruptors in cancer susceptibility. *Cad. Saúde. Pública.* 2002; 18: 357-377.
- Hemachand T, Gopalakrishnan B, Salunke DM, Totey SM, et al. (2002). Sperm plasma-membrane-associated glutathione S-transferases as gamete recognition molecules. *J. Cell. Sci.* 115: 2053-2065.
- Hemachand T and Shaha C (2003). Functional role of sperm surface glutathione S-transferases and extracellular glutathione in the haploid spermatozoa under oxidative stress. *FEBS. Letters.* 538: 14-18.

- Hirsh A (2003). Male subfertility. *B. M. J.* 327: 669-672.
- Ho T, Zhao C, Zheng R, Liu Z, et al. (2006). Glutathione S-Transferase Polymorphisms and Risk of Differentiated Thyroid Carcinomas. *Arch. Otolaryngol. Head. Neck. Surg.* 132: 756-761.
- Houillon C. Espermatogênese e Ovogênese. In: Houillon C. Sexualidade. São Paulo: Edgard Blucher; 2001: 17-36.
- Hruska KS, Furth PA, Seifer DB, Sharara FI et al. (2000). Environmental Factors in Infertility. *Clin. Obst. Gynecol.* 43: 821-829.
- Huang YK, Hsieh HC, Sun JA, Chao CF, et al. (2006). Genetic Polymorphisms of Phase I and Phase II Xenobiotic Enzymes in Human Papillomavirus Related Lesion and Cancer of the Uterine Cervix. *Tzu. Chi. Med. J.* 18: 267-274.
- Huber PC and Almeida WP (2008). Glutathione e Enzimas Relacionadas: Papel Biológico e Importância em Processos Patológicos. *Quim Nova* 10: 1-10.
- Huynh T, Mollard R and Trounson A (2002). Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum. Reprod.* 8: 183-198.
- Iniesta R, Guino E and Moreno V (2005). Análisis estadístico de polimorfismos genéticos em estudos epidemiológicos. *Gac. Sanit.* 19: 333-341.
- Jardim FC and Lorenzini F (2003). Fatores de risco e prevenção da infertilidade no homem. *II Cons. Bras. Inf. Masc.* 2: 9-14.
- Jarow JP. Effects of varicocele on male fertility. *Hum. Reprod.* 2001; 7(1):59-64.
- Jarvi K and Chitayat D (2008). The genetics you never knew: a new primer. *Urol. Clin. N. Am.* 35: 243-256.
- Joseph T, Chacko P, Wesley R, Jayaprakash PG, et al. (2006). Germline genetic polymorphisms of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian cervical cancer: Associations with tumor progression, age and human papillomavirus infection. *Gynecol. Oncol.* 101: 411-417.
- Joseph, Mannervik B, Ortiz de Montellano P. *Molecular Toxicology*, 1st, Oxford University Press: New York, 1997, 152-186.

- Kerr JB (1992). Spontaneous degeneration of germ cells in normal rat testis: assessment of cell types and frequency during the spermatogenic cycle. *J. Reprod. Fertil.* 95: 825-830.
- Kidd SA, Eskenazi B and Wyrobek AJ (2001). Effects of male age on semen quality and fertility: a review of the literature. *Fertil. Steril.* 75: 237-248.
- Kim SH, Choi YM, Lee GH, Hong MA, et al. (2007). Association between susceptibility to advanced stage endometriosis and the genetic polymorphisms of aryl hydrocarbon receptor repressor and glutathione-S-transferase T1 genes. *Hum. Reprod.* 22: 1866-1870.
- Klautau-Guimarães MN, Hiragi CO, D'Ascensão RF, Oliveira SF, et al. (2005). Distribution of glutathione S-transferase GSTM1 and GSTT1 null phenotypes in Brazilian Amerindians. *Genet. Mol. Biol.* 28: 32-35.
- Kleiman SE, Yogev L, Gamzu R, Hauser R, et al. (1999). Genetic evaluation of infertile men. *Hum. Reprod.* 14: 33-38.
- Kuhnert B and Nieschlag E (2004). Reproductive functions of the ageing male. *Hum. Reprod.* 10: 327-339.
- Kunzle R, Mueller MD, Hanggi W, Birkhauser MH, et al. (2003). Semen quality of male smokers and nonsmokers in infertile couples. *Fertil. Steril.* 19: 287-291.
- Leduc F, Nkoma GB and Boissonneault G (2008). Spermiogenesis and DNA Repair: A Possible Etiology of Human Infertility and Genetic Disorders. *Syst. Biol. Reprod. Med.* 54: 310.
- Lemos ACM, Matos E, Franco R, Santana P, et al. (2004). Fibrose cística em adultos: aspectos clínicos e espirométricos. *J. Bras. Pneumol.* 30: 9-13.
- Lewis SE, Boyle PM and McKinney KA (1995). Total antioxidant capacity of seminal plasma is different in fertile and infertile men. *Fertil. Steril.* 64: 868-870.
- Lima JM, Serafim PVP, Silva IDCG and Forones NM (2006). Estudo do polimorfismo genético no gene p53 (códon 72) em câncer colorretal. *Arq. Gastroenterol.* 43: 8-13.

- Linhares JJ, da Silva IDCG, Noronha EC, Ferraro O, et al. (2006). Polimorfismo em gene do receptor da progesterona (PROGINS) e da glutationa S-transferase (GST) e risco de câncer da mama: revisão da literatura. *Rev. Bras. Canc.* 52 : 387-393.
- Liu YL, Huang PL, Chang YF, Chen YH, et al. (2006). GSTP1 Genetic Polymorphism Is Associated with a Higher Risk of DNA Damage in Pesticide-Exposed Fruit Growers. *Cancer. Epidemiol. Biomarkers. Prev.* 15: 659-666.
- Losi-Guembarovski R and Cólus IMS (2001). Glutathione S-transferase M1 (GSTM-1): distribuição étnica e relação com câncer. *Ci. Biol. Saúde.* 22: 3-9.
- Louro ID, Lerena Jr JC, Vieira MSM, Ashton-Prolla P, Conforti-Froes N. Genética molecular do câncer. *MSG* 2002.
- Lucchesse L, Garcez M, Salvador M, Pasqualotto EB, et al. (2007). A influência das espécies reativas de oxigênio na infertilidade masculina. *Reprod. Clim.* 22: 7-14.
- Maduro MR and Lamb DJ (2002). Understanding the new genetics of male infertility. *J. Urol.* 168: 2197-2205.
- Maegawa GHB and Centa LJR (2000). Aspectos Genéticos do Fator Masculino na Infertilidade. *Fam. Saúde. Desenv.* 2: 7-12.
- Mak V and Jarvi KA (1996). The genetics of male infertility. *J. Urol.* 156: 1245-1256.
- Manfredi S, Federici C, Picano E, Botto N, et al. (2007). GSTM1, GSTT1 and CYP1A1 detoxification gene polymorphisms and susceptibility to smoking-related coronary artery disease: A case-only study. *Mutation. Research.* 621: 106-112.
- Marques CFS, Koifman S, Koifman RJ, Boffetta P, et al. (2006). Influence of CYP1A1, CYP2E1, GSTM3 and NAT2 genetic polymorphisms in oral cancer susceptibility: Results from a case-control study in Rio de Janeiro. *Oral. Oncol.* 42: 632-637.
- Mehrannia T (2007). The effect of cigarette smoking on semen quality on infertile men. *Pak. J. Med. Sci.* 23: 717-719.
- Menegon A, Board PG and Blackburn AC (1998) Parkinson's disease, pesticides, and glutathione transferase polymorphisms. *Lancet.* 352: 1344-1346.

- Moore KL, Persaud TVN. Início do desenvolvimento humano: primeira semana. In: Moore KL, Persaud TVN. Embriologia clínica. 6^a ed. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 2000: 15-43.
- Morais LMTS, Lourenco GJL, Shinzato JY, Zeferino LC, et al. (2008). Polymorphisms GSTM1 and GSTT1 and sporadic breast cancer mammographic features. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 54: 61-66.
- Moskovtsev SI, Willis J and Mullen JB (2006). Age-related decline in sperm deoxyribonucleic acid integrity in patients evaluated for male infertility. *Fertil. Steril.* 85: 496-499.
- Moura KKV; Silva AA; Barbosa EFMC; Amaral D; et al. (2004). Avaliação do efeito potencial do consumo crônico do cigarro e do álcool na qualidade do sêmen humano. *J. Bras. Patol.* 37: 7-10.
- Mukhtar H, Lee PI and Bend R (1978). Glutathione S-transferase activities in rat and mouse sperm and human semen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 83: 1093-1098.
- Nakata LC, Goloni-Bertollo EM, Santos I, Oliani AH, et al. (2004). Biomarkers of Susceptibility to Endometriosis. *RBGO.* 26: 299-304.
- Naughton CK, Nangia AK and Agarwal A (2001). Varicocele and male infertility: part II: pathophysiology of varicoceles in male infertility. *Hum. Reprod.* 7: 473-481.
- Nudell DM, Pagani R and Lipshultz LI (2001). Indications for genetics evaluation of men in a reproductive medicine program. *Braz. J. Urol.* 27: 105-119.
- Oates RD (2008). The Genetic Basis of Male Reproductive Failure. *Urol. Clin. N. Am.* 35: 257-270.
- Ochsendorf FR, Buhl R, Bastlein A and Beschmann H (1998). Glutathione in spermatozoa and seminal plasma of infertile men. *Hum. Reprod.* 13: 353-359.
- Oehninger S, Franken DR, Sayed E, Barroso G, et al. (2000). Sperm function assays and their predictive value for fertilization outcome in IVF therapy: a meta-analysis. *Hum. Reprod.* 6: 160-168.
- OMS - Organização Mundial de Saúde. Laboratory manual for indicators for global monitoring: Report of the second interagency meeting. New York: England Cambridge. Uk. 2001.

- OMS - Organização Mundial de Saúde. Laboratory manual for the examination of human semen and semen-cervical mucus interaction. 4th Ed. New York: England Cambridge. UK. 1999.
- Pajarinen J, Savolainen V, Perola M, Penttila A, et al. (1996). Glutathione S-transferase-M1 'null' genotype and alcohol-induced disorders of human spermatogenesis. *Int. J. Androl.* 19: 155-163.
- Pajarinen J, Savolainen V, Perola M, Penttila A, et al. (1996). Polymorphis in the cytochrome P450 2E1 gene and alcohol-induced disorders of human spermatogenesis. *Int. J. Androl.* 19: 314-322.
- Palli D, Falchetti M, Masala G, Lupi R, et al. (2007). Association between the BRCA2 N372H variant and male breast cancer risk: a population-based case-control study in Tuscany, Central Italy. *BMC. Cancer.* 3: 170.
- Parkinson A (1996). Biotransformation of xenobiotics. *Casarett. Doull's. Toxicology.* 113-186.
- Parkinson A (2001). Biotransformation of xenobiotics. *Casarett. Doull's. Toxicology.* 133-224.
- Parl FF (2005). Glutathione S-transferase genotypes and cancer risk. *Cancer. Lett.* 221: 123-129.
- Pasqualotto FF, Lucon AM, Sobreiro BP, Pasqualotto EB, et al. (2004). Effects of medical therapy, alcohol, smoking, and endocrine disruptors on male infertility. *Rev. Hosp. Clin.* 59: 375-382.
- Pasqualotto FF and Pasqualotto EB (2006). Tratamento do homem infértil com varicocele. *J. Bras. Med.* 90: 38-46.
- Pasqualotto FF, Umezu FM, Salvador M, Borges E, et al. (2008). Effect of cigarette smoking on antioxidant levels and presence of leukocytospermia in infertile men: a prospective study. *Fertil. Steril.* 90: 278-283.
- Pasqualotto FF (2007). Investigação e reprodução assistida no tratamento da infertilidade masculina. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 29: 103-112.

- [Pieri P de Campos](#), [Missaglia MT](#), [ROQUE J de A](#), et al. (2007). Novel CFTR missense mutations in Brazilian patients with congenital absence of vas deferens: counseling issues. *Clinics*. 62: 385-390.
- Pina –Neto JM, Carrara RCV, Bisinella R, Mazzucatto LF, et al. (2006). Somatic cytogenetic and azoospermia factor gene microdeletion studies in infertile men. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 39: 555-561.
- Prabhu KS, Reddy PV, Jones EC, Liken AD, et al. (2004). *Arch. Biochem. Biophys.* 424: 72.
- Quallich S (2006). Examining Male Infertility. *Urol. Nurs.* 26: 277-288.
- Queiroz EKR and Waissmann W (2006). Occupational exposure and effects on the male reproductive system. *Cad. Saúde. Pública.* 22: 485-493.
- Quiñones LA, Irrarázabal CE, Rojas CR, Orellana CE, et al. (2006). Joint effect among p53, CYP1A1, GSTM1 polymorphism combinations and smoking on prostate câncer risk: na exploratory genotype-environment interaction study. *Asian. J. Androl.* 8: 349-355.
- Ramlau-Hansen CH, Thulstrup AM, Aggerholm ASA, Jensen MS, et al. (2007). Is smoking a risk factor for decreased semen quality? A cross-sectional analysis. *Hum. Reprod.* 22: 188-196.
- Rao L, Babu A, Murthy Kanakavalli, Padmalatha V, et al. (2004). Chromosomal abnormalities and Y chromosome microdeletions in infertile men with varicocele and idiopathic infertility of south indian origin. *J. Androl.* 25: 147.
- Rohr P, Canedo AD, Paskulin G, Schüller I, Nardi NB, Kvitko K. Análise dos polimorfismos GSTM1 e GSTT1 em pacientes que desenvolveram leucemias agudas. *Brazi J of Biosci* 2004; 2:143-150.
- Rossini A, Rapozo DCM, Amorim L MF, Macedo JMB, et al. (2002). Frequencies of GSTM1, GSTT1 and GSTP1 polymorphisms in a Brazilian population. *Genet. Mol. Res.* 1: 233-240.
- Rossit A and Conforti-Froes NDT (2000). Suscetibilidade genética, biometabolismo e câncer. *Rev. Soc. Bras. Câncer.* 10: 26-31.

- Rossit ARB, Cabral IR and Conforti-Froes NDT (1999). Avaliação das frequências alélicas de genes do biometabolismo em uma população brasileira. *Genet. Mol. Biol.* 22:23.
- Rubes J, Selevan SG, Sram RJ, Evenson DP, et al. (2007). GSTM1 genotype influences the susceptibility of men to sperm DNA damage associated with exposure to air pollution. *Mutation. Res.* 625: 20-28.
- Ruiz CAJ and Santos MAP. Sistemas de defesa química em el hombre. Prevención em oncología. Importância clínica del análisis de polimorfismos de susceptibilidad metabólica [acesso em 2008 Abr.22]. Disponível em: www.sedet.es/sedet/pdf/prevoncologiatxt.pdf.
- Saleh RA, Agarwal A, Sharma RK, Nelson DR, et al. (2002). Effect of cigarette smoking on levels of seminal oxidative stress in infertile men: a prospective study. *Fertil. Steril.* 78: 491-499.
- Saleh RA and Agarwal A (2002). Oxidative stress and male infertility: from research bench to clinical practice. *J. Androl.* 23: 737-752.
- Samrslá M, Nunes JC, Kalume C, Cunha ACR, et al. (2007). Expectativa de mulheres à espera de reprodução assistida em Hospital Público do Distrito Federal: estudo bioético. *Rev. Assoc. Med. Bras.* 53: 47-52.
- Santiago C, Bandrés F and Gómez-Gallego F (2002). Polimorfismos de citocromo P450: papel como marcador biológico. *Med. Trab.* 11: 130-140.
- São Pedro SL, Fraietta R, Spaine D, Porto CS, et al. (2003). Prevalence of Y chromosome deletions in a Brazilian population of nonobstructive azoospermic and severely oligozoospermic men. *Braz. J. Med. Biol. Res.* 36: 787-793.
- Sata F, Yamada H, Kondo T, Gong Y, et al. (2003). Glutathione S-transferase M1 and T1 polymorphisms and the risk of recurrent pregnancy loss. *Mol. Hum. Reprod.* 9: 165-169.
- Schuppe HC, Wieneke P, Donat S, Fritsche E, et al. (2000). Xenobiotic metabolism, genetic polymorphisms and male infertility. *Androl.* 32: 255-262.
- Sharma RK, Pasqualotto FF, Nelson DR, Thomas AJ, et al. (2001). Role of leukocytospermia in oxidative stress. *J. Androl.* 22: 575-583.

- Sheehan D, Meade G, Foley VW and Dowd CA (2001). Structure, function and evolution of glutathione transferases: implications for classification of non-mammalian members of an ancient enzyme superfamily. *Biochem. J.* 360: 1-16.
- Shefi S and Turek PJ (2006). Definition and Current Evaluation of Subfertile Men. *Int. Braz. J. Urol.* 32: 385-397.
- Shen HM, Chia SE and Ong CN (1999). Evaluation of Oxidative DNA Damage in Human Sperm and Its Association with Male Infertility. *J. Androl.* 20: 718-723.
- Slotter E, Schmid TE, Marchetti F, Eskenazi B, et al. (2006). Quantitative effects of male age on sperm motion. *Hum. Reprod.* 21: 2868-2875.
- Smith R, Kaune H, Parodi D, Madariaga M, et al. (2007). Aumento del dano en el ADN y estrés oxidativo em espermatozoides de pacientes com oligozoospermia idiopática y antecedentes de criptorquidismo. *Rev. Med. Chile.* 135: 279-286.
- Sorensen M, Autrup H, Tjonland A, Overvad K, et al. (2004). Glutathione S-transferase T1 null-genotype is associated with an increased risk of lung cancer. *Int. J. Cancer.* 110: 219-224.
- Souza CL, Barbosa CG, Moura Neto JP, Barreto JH, et al. (2008). Polymorphisms in the glutathione S-transferase theta and um genes and susceptibility to myeloid leukemia in Brazilian patients. *Genet. Mol. Biol.* 31: 39-41.
- Soya SS, Vinod T, Reddy KS, Gpalakrishnan S, et al. (2007). Genetic polymorphisms of glutathione-S-transferase genes (GSTM1, GSTT1 and GSTP1) and upper aerodigestive tract cancer risk among smokers, tobacco chewers and alcoholics in an Indian population. *European. J. Cancer.* 43: 2698-2706.
- Sreelekha TT, Ramadas K, Pandey M, Thomas G, et al. (2001). Genetic polymorphism of CYP1A1, GSTM1 and GSTT1 genes in Indian oral cancer. *Oral. Oncol.* 37: 593-598.
- Taitson, PF (2007). Distribuição geográfica da infertilidade masculina no Estado de Minas Gerais. *Rev. Bras. Ginecol. Obstet.* 29:165.
- Taspinar M, Aydos SE, Comez O, Elban AH, et al. (2008). CYP1A1, GST gene polymorphisms and risk of chronic myeloid leukaemia. *Swiss. Med. WKLY.* 138: 12-17.
- Tesarik J and Mendonza G (2007). Treatment of severe male infertility by micromanipulation-assisted fertilization: an update. *Front. Biosci.* 12: 105-114.

- Thier R, Bruning T, Roos PH, Ribs HP, et al. (2003). Markers of genetic susceptibility in human environmental hygiene and toxicology: the role of selected CYP, NAT and GST genes. *Int. J. Environ. Health.* 206: 149-171.
- Timm Jr O, Cedenho AP, Spaine DM, Buttignol MHP, et al. (2005). Search and identification of spermatozoa and spermatids in the ejaculate of non-obstructive azoospermic patients. *Int. Braz. J. Urol.* 31: 42-48.
- Tomlinson MJ, Kessopoulou E and Barratt CLR (1999). The diagnostic and prognostic value of traditional semen parameters. *J. Androl.* 20: 588-593.
- Torrades S (2002). Diversidad del genoma humano: los polimorfismos. *OFFARM.* 21: 122-126.
- Trummer H, Habermann H, Hass J and Pummer K (2002). The impact of cigaret smoking on human semen parameters and hormones. *Hum. Reprod.* 17: 1554-1559.
- Viana AMH and Mesquita ERL (2003). Análise de mutações do gene CFTR em indivíduos com sinais clínicos sugestivos de Fibrose Cística. *Rev. Hosp. Univ. UFMA.* 1.
- Vogt PH, Edelmann A and Henegariu O (1996). Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different sub-regions in Yq11. *Hum. Mol. Genet.* 5: 933-943.
- Vogt PH (2004). Molecular genetic of human male infertility: from genes to new therapeutic perspectives. *Curr. Pharm. Des.* 10: 471-500.
- Vogt PH (2005). Symposium: Genetic aspects of male (in) fertility. *Reprod. BioMed.* 10: 11-13.
- Wassarman PM, Jovine L and Litscher ES (2001). A profile of fertilization in mammals. *Nature. Cell. Biology.* 3: 59-64.
- Wu AK, Walsh TJ, Phonsombat S, Croughan MS, et l. (2008). Bilateral but not unilateral testicular hypotrophy predicts for severe impairment of semen quality in men with varicocele undergoing infertility evaluation. [Urol.](#) 71: 1114-1118.
- Xiao Z, Yang L, Xu Z, Zhang Y, et al. (2007). Glutathione S-transferases (GSTT1 and GSTM1) genes polymorphisms and the treatment response and prognosis in Chinese patients with *de novo* acute myeloid leukemia. *Leuk. Res.* 101016.

- Zendeher-Boodi Z and Saadat M (2008). Genetic polymorphism of GSTT1 may be under natural selection in a population chronically exposed to natural sour gas. *Mol. Biol. Rep.* 35: 673-676.

Anexo 1. Termo e Esclarecido**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**

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 3227-1071.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

Título do Projeto: __ ANÁLISE DA INFERTILIDADE MASCULINA IDIOPÁTICA SOB ASPECTOS

GENÉTICO-MOLECULARES Pesquisador Responsável: __Dra. Kátia Karina Verolli de O Moura Telefone para contato: 3227-1385 Telefones 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**, 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.

Igualmente, 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 2. Consentimento da participação da pessoa como sujeito**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA****CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO**

Eu, _____, RG n°. _____
CPF n°. _____ n°. de prontuário _____ n°. 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: _____

Anexo 3. Questionário Informativo

QUESTIONÁRIO INFORMATIVO

- Nome: _____
 - Idade: _____
 - Telefone: _____
 - Filhos: () sim () não Quantos: meninos (____) meninas (____)
 - Deste casamento: () sim () não
 - N° prontuário: _____
 - N° 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
 Todo 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: _____
 Xérox: () 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 ()

Anexo 4. Parecer Comitê de Ética



PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
Av. Universitária, 1069 • Setor Universitário
Caixa Postal 86 • CEP 74605-010
Goiânia • Goiás • Brasil
Fone: (62) 227.1071 • Fax: (62) 227.1073
www.ucg.br • heck@ucg.br

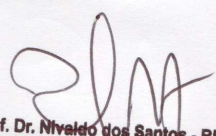
**PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA**

DECLARAÇÃO

Declaramos para os devidos fins que o Projeto: **Análises moleculares e citogenéticas em pacientes masculinos: um screening sobre infertilidade**, coordenado pela Profa. **Kátia Karina V. de O Moura** foi cadastrado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica de Goiás (COEP/UCG) sob o número: **COEP/UCG N. 150/2004 na data de: 11/11/2004.**

Situação atual do projeto em questão, conforme regimento do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Católica de Goiás:

() Aprovado e arquivado no COEP/UCG
 (x) Aprovado com recomendações
 () Pendência
 () Retirado
 () Não aprovado
 () Aprovado e encaminhado para apreciação da CONEP


 Prof. Dr. Nivaldo dos Santos - RE 3574
 Presidente do Comitê de Ética
 da Universidade Católica de Goiás

Goiânia, 21 de fevereiro de 2005.

Anexo 5. Laudo de Espermograma**ESPERMOGRAMA**

- NÚMERO SPTZ: _____x 10⁶/mL
- MOTILIDADE: _____
- MORFOLOGIA: _____
- PH: _____

LAUDO: _____	Oligospermia: < 20x10 ⁶ /ml Oligosp. Severa: < 5x10 ⁶ /ml Azoospermia: zero SPTZ Astenospermia: < 50% a + b Teratospermia: < 30% ovais
------------------------	---