

Monize Lazar Magalhães

Desvio de segregação em humanos

Segregation distortion in humans

São Paulo

2011

Monize Lazar Magalhães

Desvio de segregação em humanos

Segregation distortion in humans

Tese apresentada ao Instituto de
Biotecnologia da Universidade de São
Paulo, para a obtenção de título de
Doutor em Ciências, na área de
Biologia/Genética

Orientação: Profa. Dra. Mayana Zatz

São Paulo

2011

Ficha catalográfica

Lazar Magalhães, Monize

Desvio de segregação em humanos

100 páginas

Tese (Doutorado) - Instituto de Biociências da
Universidade de São Paulo. Departamento de Genética e
Biologia Evolutiva

1. Desvio de segregação 2. Motilidade espermática

I. Universidade de São Paulo. Instituto de Biociências.
Departamento de Genética e Biologia Evolutiva

Comissão Julgadora

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Prof(a). Dr(a).

Profa. Dra. Mayana Zatz

Orientadora

Dedicatória

Aos meus pais, Adherbal e Suzana, e
ao irmão Rodrigo, meus exemplos e,
sobretudo, meus porquês.

Epígrafe

*"... It's a test of ultimate will
The heartbreak climb uphill
Got to pick up the pace
If you want to stay in the race
More than blind ambition
More than simple greed
More than a finish line
Must feed this burning need
In the long run..."*

(Geddy Lee, Alex Lifeson, Neil Peart, 1985 – RUSH)

Agradecimentos

Aos meus pais, Adherbal e Suzana, e ao meu irmão, Rodrigo, pelo apoio incondicional, paciência, companheirismo e pelas inúmeras esperas para jantarmos juntos.

Ao Bruno e aos seus pais, pelo amor e pelas tardes de divertimento que tivemos reunidos.

Às diversas famílias do Centro de Estudos do Genoma Humano com as quais tive a oportunidade de entrar em contato, por me fazerem reavaliar conceitos e considerar o que, de fato, merece importância ao longo da caminhada da vida.

À Profa. Dra. Mayana Zatz, que, há alguns anos, recebeu-me em seu laboratório, transmitiu-me preciosos conhecimentos e acreditou que eu conseguiria chegar ao final desta importante etapa.

Ao Prof. Dr. Paulo Alberto Otto, que muito me ensinou e me ajudou, especialmente nos últimos meses.

À Profa. Dra. Maria Rita dos Santos Passos-Bueno, com quem muito aprendi, principalmente, como monitora em suas duas disciplinas para a graduação.

Aos demais professores, funcionários e alunos do CEPID.

Ao Dr. David Schlesinger, pelas valiosas discussões e sugestões científicas, sem as quais este trabalho não teria sido concluído.

A Mayra Miranda, ao Dr. Philip Wolff e ao Dr. Dani Ejzenberg, que me auxiliaram na segunda etapa deste estudo.

A Agnes Nishimura, que muito me ensinou no início da minha vida laboratorial.

Aos integrantes da sala 211, Antonia Cerqueira, Lúcia Inês Macedo-Souza, Luciana Licinio, Michel Naslavsky, Miguel Mitne-Neto, Naila Lourenço e Natale Cavaçana, que foram muito mais do que companheiros de trabalho e das horas de almoço: tornaram-se amigos.

Aos estagiários Henrique Peres e Melinda Beccari, pela alegria inata.

Aos amigos da sala 200, especialmente a Simone Ferreira, por toda a ajuda, em especial, no segundo semestre de 2010.

Aos colegas de laboratório: Carlos Bueno Júnior, Marcos Valadares, Mariane Secco, Natássia Vieira e Tatiana Jazedje.

A Constância Gotto, pelo carinho e atenção.

À Fapesp/CEPID e ao CNPq, pelo apoio financeiro que possibilitou este estudo.

Sumário

Capítulo I

1. INTRODUÇÃO.....	14
1.1. DESVIOS DA PROPORÇÃO MENDELIANA	14
1.1.1. Definições e causas	14
1.1.2. Aspectos históricos e exemplos de desvio de segregação associados à viabilidade diferencial dos gametas masculinos	16
1.1.3. Desvio de segregação na espécie humana	20
1.2. GAMETOGÊNESE MASCULINA E FERTILIZAÇÃO.....	22
2. OBJETIVOS	26
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	27

Capítulo II

ABSTRACT.....	32
RESUMO.....	33
1. INTRODUÇÃO.....	34
2. PACIENTES E MÉTODOS	36
2.1. PACIENTES	36
2.2. MÉTODOS.....	37
2.2.1. Isolamento de DNA genômico a partir de sangue periférico (protocolo adaptado de Miller et al., 1988).....	37
2.2.2. Amplificação de DNA utilizando-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês, Polymerase Chain Reaction)	38
3. RESULTADOS	44
4. DISCUSSÃO	45

FIGURAS.....	49
TABELAS.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	55

Capítulo III

ABSTRACT.....	59
RESUMO.....	60
1. INTRODUÇÃO.....	61
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	63
2.1. COLETA E ANÁLISE DAS AMOSTRAS DE SÊMEN FRESCO	63
2.2. SELEÇÃO DE ESPERMATOZOIDES POR CENTRIFUGAÇÃO EM GRADIENTE DE DENSIDADE	63
2.3. ISOLAMENTO DE DNA GENÔMICO A PARTIR DE ESPERMATOZOIDES	64
2.4. AMPLIFICAÇÃO INICIAL DO DNA GENÔMICO	65
2.5. GENOTIPAGEM PELA TÉCNICA DE <i>MICROARRAY</i>	66
2.6. CÁLCULO DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS	67
2.7. ANÁLISE DOS DADOS.....	67
3. RESULTADOS	69
4. DISCUSSÃO	71
FIGURAS.....	74
TABELAS.....	76
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	82
ANEXO I.....	86
ANEXO II	89
ANEXO III	90

Capítulo IV

DISCUSSÃO GERAL E CONCLUSÕES	93
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	97
<i>ABSTRACT</i>.....	99
RESUMO.....	100

Figuras

Figura 2.1: Heredograma da família estudada evidencia a transmissão da alteração *CAPN3* c.759_761del para a descendência do indivíduo II.1; probando IV.6 (p. 49).

Figura 2.2: Estudo de marcadores de microssatélites compreendidos entre D15S994 e D15S978 para a progênie de II.1 (p. 50).

Figura 2.3: Estudo de marcadores compreendidos entre D15S994 e D15S978, demonstrando a redução da região compartilhada pelos descendentes de II.1, entre SNP rs6493127 (*TRIM69* intron 6/7) e D15S132 (indivíduos III.2 e IV.3) (p. 51).

Figura 3.1: Constituição das 45 combinações de dez indivíduos, oito a oito (em azul, indivíduos que foram incluídos na combinação indicada). Para cada um dos grupos, foram comparadas as frequências alélicas de SNPs em heterozigose entre as subpopulações de espermatozoides lentos e rápidos (p. 74).

Figura 3.2: Distribuição dos SNPs cujos valores de p são inferiores a 0,05, evidenciando o grande número de polimorfismos intragênicos ($p < 0,01$) (p. 75).

Figura I.1: Composição de um conjunto de sondas (*Affymetrix GeneChip® Mapping 100K Array set*) (p. 86).

Tabelas

Tabela 2.1: Marcadores de microssatélites utilizados para estudo da região compreendida entre D15S994 (40,6 Mb) e D15S978 (49,3 Mb) (p. 52).

Tabela 2.2: Genes codificadores de proteínas presentes na região flanqueada pelo SNP rs6493127 em *TRIM69* (45,1 Mb) e D15S132 (47,2 Mb); em negrito: genes sequenciados (p. 53).

Tabela 2.3: Variantes identificadas em genes compreendidos entre SNP rs6493127 (45,1 Mb) e D15S132 (47,2 Mb) para o indivíduo II.1 e seus descendentes (p. 54).

Tabela 3.1: Análises qualitativa e quantitativa das amostras de sêmen dos dez indivíduos estudados (V.R.: valores referenciais seguidos dos respectivos intervalos de confiança – 95%; fonte: *World Health Organization*); **PR**: espermatozoides com motilidade progressiva; **NP**: espermatozoides com motilidade não-progressiva (p. 76).

Tabela 3.2: SNPs com valores de p inferiores a 0,05 e suas localizações. Em destaque: genes que contêm dois ou mais polimorfismos com valores de p significantes (pp. 77-79).

Tabela 3.3: Genes onde se encontram SNPs com valores de p inferiores a 0,01 e suas respectivas categorias GO (AmiGO versão 1.7) (pp. 80-81).

Acrônimos e abreviaturas

AC	enzima adenilato ciclase
AMPC	adenosina monofosfato 3',5'-cíclico
ATP	adenosina trifosfato
BFB	azul de bromofenol
CAPN3	calpaína 3
CNG	<i>cyclic nucleotide-gated</i>
DC	displasia cleidocranial
ddNTP	didesoxinucleotídeo trifosfato
DM	<i>Dynamic Modelling</i>
DM1	distrofia miotônica do tipo 1
DMSO	dimetilsulfóxido
EXO	enzima exonuclease I
GC	enzima guanilato ciclase
GMPC	guanosina monofosfato 3',5'-cíclico
GTP	guanosina trifosfato
HTF	<i>human tubal fluid</i>
LGMD2A	<i>limb-girdle muscular dystrophy type 2A</i>
Mb	megabase
MM	<i>mismatch</i>
MPAM	<i>Modified Partitioning Around Medoids</i>
NaCl	Cloreto de sódio
pb	par de base
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>

PDE	fosfodiesterase
PKA	proteína quinase A
PM	<i>perfect match</i>
RanGAP	<i>Ran GTPase activating protein</i>
RanGEF	<i>Ran guanine nucleotide exchange factor</i>
RAS	<i>relative allele signal</i>
RhoGAP	<i>Rho GTPase activating protein</i>
RhoGEF	<i>Rho guanine nucleotide exchange factor</i>
ROS	<i>reative oxygen species</i>
Rsp	loco <i>Responder (Drosophila melanogaster)</i>
Rsp ⁱ	loco <i>Responder</i> insensível aos efeitos de <i>Sd</i>
Rsp ^s	loco <i>Responder</i> sensível aos efeitos de <i>Sd</i>
Rsp ^{ss}	loco <i>Responder</i> supersensível aos efeitos de <i>Sd</i>
SAP	<i>shrimp alkaline phosphatase</i>
SCA3	ataxia espinocerebelar tipo 3, doença de Machado Joseph
SD	cromossomo <i>Segregation Distorter</i>
Sd	loco <i>Segregation distorter</i>
Smok	<i>sperm motility kinase</i>
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i>
SSS	<i>serum substitute supplement</i>
Tcd	<i>distorter</i> (haplótipo t, <i>Mus musculus</i>)
Tcr	<i>responder</i> (haplótipo t, <i>Mus musculus</i>)
TRD	<i>transmission ratio distortion</i>

Capítulo I

1. Introdução

1.1. Desvios da proporção mendeliana

1.1.1. Definições e causas

Uma das bases da genética moderna, o princípio da segregação mendeliana, afirma que uma célula germinativa portadora de um par de alelos em heterozigose dará origem a diferentes gametas em proporções equivalentes, ou seja, cada uma das variantes estará igualmente representada entre as células haploides.

Entretanto, segundo Pardo-Manuel de Villena e Sapienza (2001), há casos em que a definição acima não pode ser aplicada.

O primeiro deles ocorre quando, devido à não-disjunção, há segregação incorreta de cromossomos homólogos ou de cromátides irmãs, levando à formação de células aneuploides.

A segunda situação em que tal conceito não se verifica é quando ocorre conversão gênica, termo cunhado em 1930 por Hans Winkler e que descreve a substituição de um dos alelos parentais pelo outro, decorrente de recombinação envolvendo um loco em heterozigose; dessa maneira, a proporção de gametas pode deixar de ser mendeliana, isto é, 2:2, e assumir a razão 3:1 (Liu e West, 2004).

Diferentemente dos anteriores por apresentar efeitos em âmbito populacional, o terceiro caso resulta de processos ocorridos tanto no período que sucede a fertilização como nas fases que a antecedem: após a fertilização, a distorção das proporções mendelianas pode ser ocasionada pela seleção de embriões com um dado genótipo, resultando em sobrevivência diferencial ao longo do desenvolvimento; anteriormente à fecundação, tal distorção pode ter como causas a proliferação mais acentuada de um subgrupo de células germinativas em etapa que antecede as divisões reducionais, a viabilidade diferencial das células gaméticas ou a segregação não aleatória dos cromossomos, cujas condições

suficientes e necessárias são a divisão meiótica assimétrica, a assimetria do fuso meiótico e a heterozigosidade funcional em um loco que media a ancoragem entre o cromossomo e o fuso.

Também com impacto populacional por afetar as frequências gênicas, o desvio de segregação ou *meiotic drive* (Sandler e Novitski, 1957) pode ser definido como um mecanismo de distorção na transmissão de alelos (*meiotic drive* gênico) ou de cromossomos (*meiotic drive* cromossômico) às gerações subsequentes e, como resultado, uma das sequências homólogas de um gene expressa-se preferencialmente entre os produtos da meiose (Lyttle *et al.*, 1991).

No *meiotic drive* gênico, em um primeiro momento, há um impacto na dinâmica populacional do loco diretamente associado ao desvio. Os locos que se encontram em suas proximidades, ou seja, que estão a ele ligados, são beneficiados pelo efeito conhecido como carona genética (*genetic hitchhiking*), levando à constituição de um haplótipo que sofre a distorção. Tal haplótipo pode ser ampliado com a incorporação de rearranjos cromossômicos que diminuam a possibilidade de recombinação e, portanto, aumentam o desequilíbrio entre o loco associado ao desvio e locos modificadores mais distantes. Por fim, como consequência extrema, o haplótipo em questão pode se tornar coextensivo ao cromossomo, tendo-se não mais uma forma de *meiotic drive* gênico, mas sim um caso de *meiotic drive* cromossômico (Lyttle *et al.*, 1991).

A diferença entre os mecanismos acima definidos e a seleção gamética propriamente dita é, muitas vezes, difícil de ser identificada, uma vez que ambos culminam na super-representação de uma classe de gametas capazes de originar prole.

1.1.2. Aspectos históricos e exemplos de desvio de segregação associados à viabilidade diferencial dos gametas masculinos

A primeira descrição de desvio de segregação foi feita em 1928, quando Gershenson observou que cruzamentos envolvendo machos de *Drosophila obscura* portadores de um cromossomo X considerado "especial" originavam número de fêmeas bastante superior à quantidade de machos. Além disso, foi constatado que esse desvio nas proporções sexuais não era causado pela mortalidade diferencial de zigotos, sugerindo, então, que esse fato tinha como causa um número excessivamente elevado de células gaméticas com tal cromossomo X em relação às portadoras do cromossomo Y (Sandler e Novitski, 1957).

Estudos citogenéticos mais detalhados realizados por Sturtevant e Dobzhansky (1936) revelaram que o cromossomo X em questão estava amplamente espalhado entre populações selvagens de *Drosophila pseudoobscura*. Sobretudo, a espermatogênese anormal nos machos portadores do cromossomo X em questão era responsável pela ausência quase absoluta de células gaméticas portadoras do cromossomo Y, que se degenerava.

Em 1959, Sandler *et al.* descreveram a ocorrência de desvio de segregação para o cromossomo 2 de machos de *Drosophila melanogaster*, ao qual atribuiu-se o nome de *Segregation distorter (SD)*. Machos heterozigotos SD/SD^+ formam células gaméticas portadoras do cromossomo *SD* em proporção que varia entre 95% e 99%.

O cromossomo *SD* apresenta dois principais locos que interagem e são responsáveis pelo evento biológico em questão: *Segregation distorter (Sd)*, localizado em 37E1 (cuja presença é necessária para causar a distorção), e *Responder (Rsp)* (que representa o local sobre o qual *Sd* exerce seu efeito) (Ganetzky, 1977).

Além disso, os alelos $E(SD)$ e $M(SD)$, entre outros localizados em SD , atuam como modificadores do desvio de segregação e são, por vezes, mantidos em forte desequilíbrio de ligação pela inversão $In(2R)NS$.

O loco Sd pode apresentar duas formas alélicas, distintas pela capacidade de gerar a distorção de segregação, ao passo que o loco Rsp pode apresentar três diferentes alelos a ele associados: o Rsp^i (insensível aos efeitos de Sd), o Rsp^s e o Rsp^{ss} (respectivamente, sensível e supersensível aos efeitos de Sd).

Machos heterozigotos para o loco Sd (Sd/Sd^+) transmitem para a quase totalidade de sua prole o alelo Sd , ao qual se encontra associado Rsp^i ; já os machos homozigotos para Sd são estéreis e, portanto, o desaparecimento do alelo Sd^+ selvagem não ocorre.

O loco Rsp , por sua vez, consiste em um conjunto de repetições de sequências satélites de uma unidade de 240 pares de base (pb) (definida por sítios de restrição da enzima $XbaI$), cujo número de cópias se correlaciona com a sensibilidade do alelo ao produto codificado por Sd (Wu *et al.*, 1988). O alelo Rsp^i apresenta número de repetições inferior a 200. Já Rsp^s e Rsp^{ss} têm maior número de cópias, respectivamente em torno de 700 e de 2500.

O produto do alelo Sd é uma versão truncada, embora enzimaticamente ativa, da proteína RanGAP (*Ran GTPase activating protein*) (Merrill *et al.*, 1999), que, assim como RanGEF (*Ran guanine nucleotide exchange factor*), atua como cofator da proteína Ran, uma GTPase pequena (*small GTPase*) de localização predominantemente nuclear, essencial para o transporte através da carioteca, para a formação do fuso durante a divisão da célula e do envelope nuclear pós-mitótico, bem como para a regulação do ciclo celular (Sazer e Dasso, 2000). A localização citoplasmática de RanGAP e o posicionamento nuclear de RanGEF estabelecem um gradiente de concentração de RanGTP através do envelope nuclear, crítico para o funcionamento correto da via de sinalização Ran.

A RanGAP truncada, que se localiza no núcleo celular (Kusano *et al.*, 2001), desencadeia alterações no grupo de gametas portadores do alelo *Rsp^s* ou *Rsp^{ss}* (como, por exemplo, modificações na condensação da cromatina da espermátide e no processo de alongação/maturação dessa célula) (Tokuyaso *et al.*, 1977), ocasionadas pela redução dos níveis intranucleares de RanGTP. Assim, todos os gametas que contêm alelos *Rsp* sensíveis à atuação do produto codificado por *Sd* são eliminados.

Além de caracterizado em *Drosophila melanogaster*, o desvio de segregação também foi descrito para machos de camundongos *Mus musculus*. Nesse caso, o evento biológico, que recebeu o nome de *transmission ratio distortion* (TRD), envolve o complexo t (*t-complex*), definido como uma forma variável do terço proximal do cromossomo 17, com extensão estimada entre 30 e 40 megabases (Mb) (Lyon, 2003).

Machos heterozigotos para tal região e que contêm, portanto, a variante t (o que é denominado haplótipo t) e um cromossomo 17 normal, transmitem majoritariamente para a sua prole o haplótipo t, ao passo que machos homozigotos para a variante t são estéreis. As fêmeas, por sua vez, não apresentam distorção de segregação e exibem fertilidade normal.

A recombinação meiótica entre a variante t e o cromossomo selvagem é um evento raro devido à presença de quatro grandes inversões nessa região, o que assegura a transmissão do haplótipo completo (Lyon, 2003).

Assim como no caso descrito para *Drosophila melanogaster*, o desvio de segregação envolvendo o complexo t em camundongos depende da interação entre diferentes locos (Lyon, 1984). No caso, há um gene *responder* (designado genericamente de *Tcr*) e um número ainda desconhecido de alelos *distorters* (denominados *Tcd*), os quais atuam aditivamente em *trans* aumentando a transmissão do *responder*. Em um primeiro momento, foi proposta a atuação de três alelos *Tcd* e, posteriormente, outros foram sugeridos.

Mais especificamente, o *Tcr* (denominado *Smok^{Tcr}*) é uma fusão entre um gene codificante de uma proteína quinase chamada *Sperm motility kinase* (*Smok*) e um gene denominado *Rps6ka2* (ribossomo S6 quinase) (Herrmann *et al.*, 1999).

Já foram identificadas duas das proteínas que atuam como *distorters*, promovendo desvio de segregação, ambas envolvidas na via de sinalização da proteína Rho: *Tagap1* (uma RhoGAP – *Rho GTPase activating protein*) (Bauer *et al.*, 2005) e *Fgd2* (uma RhoGEF – *Rho guanine nucleotide exchange factor*) (Bauer *et al.*, 2007).

Há outros três candidatos para *Tcd* já identificados, que codificam proteínas do grupo das dineínas (*Tctex1*, *Dnahc8* e *Tcte3*), provavelmente envolvidas no movimento flagelar do espermatozoide (Lyon, 2003).

O mecanismo sugerido para explicar o desvio de segregação observado para o complexo t dos camundongos baseia-se no fato de que, tanto a proteína codificada por *Smok^{Tcr}* como a produzida a partir de *Smok*, apresentam atividade de quinase, mas a primeira desempenha aproximadamente um décimo da atividade da segunda.

Herrmann *et al.* (1999) sugerem, portanto, que os *distorters*, que constituem alelos hipermórficos (ou seja, cujos produtos apresentam atividade bastante superior à do produto codificado pelo alelo selvagem), atuariam como ativadores de uma cascata de sinalização da qual participa *Smok*, elevando excessivamente sua atividade, evento que seria prejudicial à vida da célula. Isso não ocorreria com *Smok^{Tcr}* devido à sua atividade de quinase bastante inferior à da proteína selvagem.

Há também diversas espécies de *Drosophila* e de outros dípteros que apresentam desvio de segregação envolvendo os cromossomos sexuais (*sex-ratio segregation distortion*). *Drosophila simulans* constitui um bom exemplo, uma vez que a produção de espermatozoides que carregam o cromossomo Y é afetada por,

pelo menos, três vias distintas, levando à geração de prole majoritariamente feminina (Jaenike, 2008).

1.1.3. Desvio de segregação na espécie humana

Apesar de o desvio de segregação estar bem caracterizado em diversos organismos, pouco se sabe sobre sua ocorrência na espécie humana.

Alguns estudos relatam distorção de segregação em determinadas regiões do genoma, embora grande parte deles tenha sido feita com famílias previamente selecionadas pela ocorrência de uma dada doença, o que impossibilita afirmar se tal distorção está diretamente associada ao traço observado ou se é um fenômeno independente.

Há indícios de que ocorra desvio de segregação com transmissão preferencial do alelo paterno portador da mutação em casos de distrofia miotônica do tipo 1 (DM1; MIM 160900) (Zatz *et al.*, 1997), distúrbio neuromuscular autossômico dominante causado pela expansão de trinucleotídeos na porção 3' não traduzida de *DMPK* (localizado em 19q13.2-13.3).

A distorção em favor do alelo paterno mutado também se verifica em outra doença de herança dominante causada por expansão de trinucleotídeos, a ataxia espinocerebelar do tipo 3 (SCA3 ou doença de Machado Joseph; MIM 109150), patologia neurodegenerativa que se associa a alterações em *ATXN3* (em 14q24.3-q31) (Iughetti *et al.*, 1998). Apesar de o resultado obtido com as famílias de SCA3 ser corroborado por achados de grupos distintos, outros estudos não descrevem desvio de segregação em favor do alelo alterado e revelam, em alguns casos, uma distorção favorecendo o alelo normal (Grewal *et al.*, 1999; Bettencourt *et al.*, 2008). Isso indica que, possivelmente, a ocorrência desse evento não está atrelada à alteração molecular que causa SCA3.

Recentemente, Botta *et al.* (2005) relataram a ocorrência de desvio de segregação em casos de atrofia espinhal progressiva, favorecendo o alelo não mutado.

Em 2009, Santos *et al.* demonstraram, para homens saudáveis de origem europeia, a distorção na transmissão de uma região contida no cromossomo 6, cujo braço curto é sintênico ao cromossomo 17 de camundongos. Especificamente localizada em 6p21.1 e com cerca de 730 kilobases (kb) de extensão, ela compreende os quadros de leituras completos de *SUPT3H* (*supressor of Ty3 homolog*) e do precursor de microRNA *MIRN586*, assim como a região *upstream* e 4 exons de *RUNX2* (*runt-related transcription factor 2*). *SUPT3H* codifica um fator de transcrição, o Spt3, que é subunidade de dois diferentes complexos proteicos, ambos envolvidos com a regulação transcricional, a acetilação de histonas e a remodelação da cromatina. Já o produto codificado por *RUNX2* é essencial para processos como a condrogênese, a osteogênese e a hematopoiese, por exemplo; mutações em *RUNX2* foram previamente associadas à displasia cleidocranial (DC) (MIM 119600), uma doença de herança autossômica dominante caracterizada pela hipoplasia ou aplasia de clavículas, anormalidades dentárias múltiplas e atraso no fechamento das suturas cranianas (Ott *et al.*, 2010). Além disso, esse fator de transcrição participa da regulação de genes associados ao ciclo celular e, recentemente, foi constatada sua expressão em testículos e em espermatozoides de camundongos, o que sugere que essa proteína desempenha um papel importante para o sistema reprodutor masculino. A literatura não apresenta relatos de distorção de segregação em casos de DC.

Esses dados vão ao encontro dos resultados obtidos anteriormente por Zöllner *et al.* (2004), que confirmaram, também para indivíduos saudáveis, a ocorrência de desvio de segregação em diversas regiões do genoma, com probabilidades máximas encontradas para os cromossomos 15, 5 e 6.

1.2. Gametogênese masculina e fertilização

A espermatogênese ocorre no epitélio do túbulo seminífero, onde se apresentam as células de Sertoli e diversas células germinativas. Caracterizada por seu elevado grau de complexidade, divide-se em quatro etapas sequenciais, ao final das quais são formados os gametas masculinos (Amann, 2008).

Na primeira delas, ocorre a proliferação e a diferenciação das espermatogônias – as células progenitoras – originando os espermatócitos, que permanecem em fase de pré-leptóteno (também chamados de espermatócitos primários jovens); na segunda fase, uma primeira divisão meiótica origina os espermatócitos secundários, que, após a meiose II, formam as espermatídes esféricas; em um terceiro momento, tais células são transformadas em espermatídes maduras em um processo denominado espermiogênese, quando ocorre a condensação do núcleo e sua movimentação para a periferia da célula, a formação do acrossomo e a constituição do flagelo, composto por um conjunto de microtúbulos – o axonema – que se origina de um dos centríolos da espermatíde esférica (de Kretser *et al.*, 1998); por fim, ocorre a espermição, a qual consiste na ruptura das estruturas que unem as espermatídes maduras às células de Sertoli, originando, assim, os espermatozoides liberados no lúmen do túbulo seminífero.

Entretanto, essas células recém-liberadas ainda não são capazes de concluir a fertilização, o que só se torna possível ao final de três processos amplamente dependentes de íons cálcio, que ocorrem quando os espermatozoides já se encontram no trato genital feminino: a capacitação, a hiperativação e a reação acrossômica (Küpker *et al.*, 1998; Fraser, 1998).

A primeira etapa, a capacitação, consiste em um conjunto de alterações estruturais e funcionais, que envolvem a ativação de ATPases e a redistribuição de glicoproteínas, de glicolípídios e de receptores de manose na superfície do espermatozoide, com consequentes alterações nas propriedades de sua membrana.

A hiperativação, por sua vez, é caracterizada pela alteração do padrão de motilidade espermática, que passa de progressivo, com pequena amplitude de batimento flagelar, para hiperativado, quando ocorre movimentação flagelar de grande amplitude. Essa modificação auxilia a progressão do espermatozoide ao longo do oviduto.

Quando, por fim, o gameta masculino se liga à zona pelúcida (matriz glicoproteica que envolve o oócito), mais especificamente à glicoproteína ZP3, tem início a reação acrossômica: o influxo de cálcio característico dessa etapa modifica o potencial de membrana do espermatozoide e provoca a alteração de seu pH, aumentando o volume do acrossomo; como consequência, ocorre a fusão entre a membrana que envolve tal organela e a membrana celular. A liberação das enzimas contidas no acrossomo auxiliam o trânsito do espermatozoide até a membrana do oócito, também denominada oolema, podendo, então, ocorrer a fertilização (Zanetti e Mayorga, 2009).

Os processos acima descritos resultam de complexas cascatas de sinalização intracelular. A exemplo disso, podemos citar as vias que apresentam o AMPc (adenosina monofosfato 3',5'-cíclico) e o GMPc (guanosina monofosfato 3',5'-cíclico) como segundos mensageiros.

O AMPc, nucleotídeo gerado a partir de ATP (adenosina trifosfato) pela ação da enzima adenilato ciclase (AC), ativa a PKA (proteína quinase A) e, subsequentemente, ocorre a fosforilação de diversas proteínas intracelulares. Processos como a capacitação, a hiperativação e a reação acrossômica se revelaram dependentes de AMPc, que participa ainda do aumento da motilidade e da viabilidade espermáticas (Ho e Suarez, 2001; Dimitriadis *et al.*, 2008; Yoshida *et al.*, 2008).

O GMPc, de maneira análoga ao AMPc, origina-se a partir de GTP (guanosina trifosfato) pela atividade da enzima guanilato ciclase (GC). Esse nucleotídeo

também apresenta participação importante na manutenção da motilidade espermática, capacitação e reação acrossômica (Dimitriadis *et al.*, 2008).

Ainda, a geração de AMPc e de GMPc estimula, através dos canais de cálcio CNG (*cyclic nucleotide-gated*) presentes no flagelo do espermatozoide, a entrada de íons cálcio, importantes para a conclusão das etapas acima descritas (Wiesner *et al.*, 1998).

Entretanto, há um complexo mecanismo de regulação das cascatas que envolvem ambos os nucleotídeos. A duração da sinalização intracelular mediada por AMPc e GMPc é regulada pela ação das fosfodiesterases (PDE), em conjunção, respectivamente, com a AC e com a GC.

Até o momento, foram descritas 12 famílias de PDE, nomeadas de PDE1 a PDE12: algumas delas são capazes de hidrolisar somente AMPc (por exemplo, PDE4), outras se ligam somente a GMPc (é o caso de PDE5, por exemplo) e há aquelas que utilizam tanto AMPc quanto GMPc como substrato (como ocorre com PDE1).

A família PDE1 apresenta alta afinidade por GMPc, mas também pode se ligar à AMPc para degradação; compreende três membros, PDE1A, PDE1B e PDE1C, que são ativados pela ligação à calmodulina na presença de cálcio e situam-se, principalmente, na cabeça do espermatozoide. A inibição específica de PDE1 com o uso da droga 8-metoxi-isobutil-metilxantina (8-MeIBMX), que reduz de 35% a 40% sua atividade, é responsável por estimular a reação acrossômica (Fisch *et al.*, 1998; Dimitriadis *et al.*, 2008), reforçando a participação de AMPc e de GMPc nesse processo.

Já a família PDE4 apresenta quatro membros AMPc-específicos (PDE4A, PDE4B, PDE4C e PDE4D), que se localizam, em especial, na parte intermediária do espermatozoide e, ao serem fosforilados por PKA, assumem estado ativo. Com o uso de Rolipram (RS25344), um inibidor específico que reduz em 25% a 30% a atividade de PDE4, observou-se um aumento da motilidade espermática, não

associada ao estímulo da reação acrossômica (Fisch *et al.*, 1998; Dimitriadis *et al.*, 2008), demonstrando a participação de AMPc na movimentação dessa célula.

Os resultados obtidos com os experimentos de inibição de PDE1 e de PDE4 evidenciam a importância de tais proteínas, entre muitas outras, para o controle das funções da célula gamética masculina e fica evidente a rigorosa regulação que ocorre em diversas etapas a fim de que o espermatozoide conclua a fertilização.

2. Objetivos

Os objetivos do projeto em questão consistem em definir um ou mais genes associados à ocorrência de desvio de segregação do cromossomo 15 humano, indicado, como citado anteriormente, pelo trabalho de Zöllner *et al.* (2004), bem como identificar regiões do genoma ligadas ao desempenho diferencial das células gaméticas masculinas e, possivelmente, sujeitas a tal distorção em âmbito populacional.

Referências bibliográficas

Amann, R. P. (2008). "The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit?" J Androl **29**(5): 469-87.

Bauer, H., Willert, J., Koschorz, B. and Herrmann, B. G. (2005). "The t complex-encoded GTPase-activating protein Tagap1 acts as a transmission ratio distorter in mice." Nat Genet **37**(9): 969-73.

Bauer, H., Veron, N., Willert, J. and Herrmann, B. G. (2007). "The t-complex-encoded guanine nucleotide exchange factor Fgd2 reveals that two opposing signaling pathways promote transmission ratio distortion in the mouse." Genes Dev **21**(2): 143-7.

Bettencourt, C., Santos, C., Kay, T., Vasconcelos, J. and Lima, M. (2008). "Analysis of segregation patterns in Machado-Joseph disease pedigrees." J Hum Genet **53**(10): 920-3.

Botta, A., Tacconelli, A., Bagni, I., Giardina, E., Bonifazi, E., Pietropolli, A., Clementi, M. and Novelli, G. (2005). "Transmission ratio distortion in the spinal muscular atrophy locus: data from 314 prenatal tests." Neurology **65**(10): 1631-5.

de Kretser, D. M., Loveland, K. L., Meinhardt, A., Simorangkir, D. and Wreford, N. (1998). "Spermatogenesis." Hum Reprod **13 Suppl 1**: 1-8.

Dimitriadis, F., Giannakis, D., Pardalidis, N., Zikopoulos, K., Paraskevoidis, E., Giotitsas, N., Kalaboki, V., Tsounapi, P., Baltogiannis, D., Georgiou, I., Saito, M., Watanabe, T., Miyagawa, I. and Sofikitis, N. (2008). "Effects of phosphodiesterase-5 inhibitors on sperm parameters and fertilizing capacity." Asian J Androl **10**(1): 115-33.

Fisch, J. D., Behr, B. and Conti, M. (1998). "Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: differential activation by type-specific phosphodiesterase inhibitors." Hum Reprod **13**(5): 1248-54.

Fraser, L. R. (1998). "Sperm capacitation and the acrosome reaction." Hum Reprod **13 Suppl 1**: 9-19.

Ganetzky, B. (1977). "On the components of segregation distortion in *Drosophila melanogaster*." Genetics **86**(2 Pt. 1): 321-55.

Grewal, R. P., G. Cancel, et al. (1999). "French Machado-Joseph disease patients do not exhibit gametic segregation distortion: a sperm typing analysis." Hum Mol Genet **8**(9): 1779-84.

Herrmann, B. G., Koschorz, B., Wertz, K., McLaughlin, K. J. and Kispert, A. (1999). "A protein kinase encoded by the t complex responder gene causes non-mendelian inheritance." Nature **402**(6758): 141-6.

Ho, H. C. and Suarez, S. S. (2001). "Hyperactivation of mammalian spermatozoa: function and regulation." Reproduction **122**(4): 519-26.

Iughetti, P., Otto, P. A., Zatz, M., Passos Bueno, M. R. and Marie, S. K. (1998). "Different behavior in the paternally vs. maternally inherited mutated allele in Brazilian Machado-Joseph (MJD1) families." Am J Med Genet **77**(3): 246-8.

Jaenike, J. (2008). "X chromosome drive." Curr Biol **18**(12): R508-11.

Küpker, W., Diedrich, K. and Edwards, R. G. (1998). "Principles of mammalian fertilization." Hum Reprod **13 Suppl 1**: 20-32.

Kusano, A., Staber, C. and Ganetzky, B. (2001). "Nuclear mislocalization of enzymatically active RanGAP causes segregation distortion in *Drosophila*." Dev Cell **1**(3): 351-61.

Liu, Y. and West, S. C. (2004). "Happy Hollidays: 40th anniversary of the Holliday junction." Nat Rev Mol Cell Biol **5**(11): 937-44.

Lyon, M. F. (1984). "Transmission ratio distortion in mouse t-haplotypes is due to multiple distorter genes acting on a responder locus." Cell **37**(2): 621-8.

Lyon, M. F. (2003). "Transmission ratio distortion in mice." Annu Rev Genet **37**: 393-408.

Lyttle, T. W. (1991). "Segregation distorters." Annu Rev Genet **25**: 511-57.

Merrill, C., Bayraktaroglu, L., Kusano, A. and Ganetzky, B. (1999). "Truncated RanGAP encoded by the Segregation Distorter locus of *Drosophila*." Science **283**(5408): 1742-5.

Ott, C. E., Leschik, G., Trotier, F., Brueton, L., Brunner, H. G., Brussel, W., Guillen-Navarro, E., Haase, C., Kohlhase, J., Kotzot, D., Lane, A., Lee-Kirsch, M. A., Morlot, S., Simon, M. E., Steichen-Gersdorf, E., Tegay, D. H., Peters, H., Mundlos, S. and Klopocki, E. "Deletions of the RUNX2 gene are present in about 10% of individuals with cleidocranial dysplasia." Hum Mutat **31**(8): E1587-93.

Pardo-Manuel de Villena, F. and Sapienza, C. (2001). "Nonrandom segregation during meiosis: the unfairness of females." Mamm Genome **12**(5): 331-9.

Sandler, L. and Novitski, E. (1957). "Meiotic drive as an evolutionary force." Am Nat **41**: 105-10.

Sandler, L., Hiraizumi, Y. and Sandler, I. (1959). "Meiotic Drive in Natural Populations of *Drosophila Melanogaster*. I. the Cytogenetic Basis of Segregation-Distortion." Genetics **44**(2): 233-50.

Santos, P. S., Hohne, J., Schlattmann, P., König, I. R., Ziegler, A., Uchanska-Ziegler, B. and Ziegler, A. (2009). "Assessment of transmission distortion on chromosome 6p in healthy individuals using tagSNPs." Eur J Hum Genet **17**(9): 1182-9.

Sazer, S. and Dasso, M. (2000). "The ran decathlon: multiple roles of Ran." J Cell Sci **113 (Pt 7)**: 1111-8.

Sturtevant, A. H. and Dobzhansky, T. (1936). "Geographical Distribution and Cytology of "Sex Ratio" in *Drosophila Pseudoobscura* and Related Species." Genetics **21**(4): 473-90.

Tokuyasu, K. T., Peacock, W. J. and Hardy, R. W. (1977). "Dynamics of spermiogenesis in *Drosophila melanogaster*. VII. Effects of segregation distorter (SD) chromosome." J Ultrastruct Res **58**(1): 96-107.

Wiesner, B., Weiner, J., Middendorff, R., Hagen, V., Kaupp, U. B. and Weyand, I. (1998). "Cyclic nucleotide-gated channels on the flagellum control Ca²⁺ entry into sperm." J Cell Biol **142**(2): 473-84.

Wu, C. I., Lyttle, T. W., Wu, M. L. and Lin, G. F. (1988). "Association between a satellite DNA sequence and the Responder of Segregation Distorter in *D. melanogaster*." Cell **54**(2): 179-89.

Yoshida, M., Kawano, N. and Yoshida, K. (2008). "Control of sperm motility and fertility: diverse factors and common mechanisms." Cell Mol Life Sci **65**(21): 3446-57.

Zanetti, N. and Mayorga, L. S. (2009). "Acrosomal swelling and membrane docking are required for hybrid vesicle formation during the human sperm acrosome reaction." Biol Reprod **81**(2): 396-405.

Zatz, M., Cerqueira, A., Vainzof, M. and Passos-Bueno, M. R. (1997). "Segregation distortion of the CTG repeats at the myotonic dystrophy (DM) locus: new data from Brazilian DM families." J Med Genet **34**(9): 790-1.

Zöllner, S., Wen, X., Hanchard, N. A., Herbert, M. A., Ober, C. and Pritchard, J. K. (2004). "Evidence for extensive transmission distortion in the human genome." Am J Hum Genet **74**(1): 62-72.

Capítulo II

Segregation distortion involving the human chromosome 15 in a family with a mutation in the *CAPN3* gene

Monize Lazar¹, David Schlesinger^{1,2}, Michel Naslavsky¹, Melinda Beccari¹,
Naila Lourenço¹, Alessandra Starling¹, Mayana Zatz¹

¹ Human Genome Research Center, Department of Genetics and Evolutionary Biology,
Institute of Biosciences, University of São Paulo

² Department of Clinical Neurology, University of São Paulo School of Medicine

Abstract

Several biological processes, as nonrandom segregation of chromosomes during meiosis or gametic and postzygotic viability selection, can produce offspring with genotypic proportions skewed away from the Mendelian predictions. This occurrence, named transmission ratio distortion (or transmission distortion) is well characterized for *Drosophila melanogaster* and *Mus musculus*, but little is known about its impact in humans. We have studied a family with an intergeneration overtransmitted deletion in the *CAPN3* gene ($p < 0,001$), which in homozygosity is associated to limb-girdle muscular dystrophy type 2A (LGMD2A). Using microsatellite markers and single nucleotide polymorphisms it was possible to define a 2.1 Mb region at chromosome 15 which was present in most of the individuals (13 among 15 individuals). Subsequently, we sequenced 14 genes contained in the defined region but we were not able to find rare variants that could be responsible for the advantage of some gametes. However, common variants identified in some genes could suggest that the observed transmission distortion is caused by the interaction among proteins with small dissimilarities, resulting in differential performance of a few gametic cells.

Desvio de segregação para o cromossomo 15 humano em uma família com mutação no gene *CAPN3*

Monize Lazar¹, David Schlesinger^{1,2}, Michel Naslavsky¹, Melinda Beccari¹,
Naila Lourenço¹, Alessandra Starling¹, Mayana Zatz¹

¹ Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva,
Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo

² Departamento de Neurologia Clínica, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

Resumo

Diversos processos biológicos, como a segregação não aleatória dos cromossomos durante a meiose, a seleção gamética e a viabilidade pós-zigótica diferencial, por exemplo, podem ser responsáveis pela geração de prole com proporções genotípicas não mendelianas. Esse evento, denominado desvio de segregação, está bem caracterizado em *Drosophila melanogaster* e em *Mus musculus*, mas pouco se conhece sobre a ocorrência de tal distorção na espécie humana. Neste estudo, nós avaliamos uma família na qual uma deleção em *CAPN3*, que, em homozigose, está associada à distrofia muscular de cinturas do tipo 2A (LGMD2A), é transmitida entre gerações em proporção que excede a esperada ($p < 0,001$). Utilizando-se marcadores de microssatélites e polimorfismos de base única (SNP) foi possível definir uma região de 2,1 Mb no cromossomo 15, comum à grande parte dos indivíduos da família em questão (13 entre 15 indivíduos). O estudo de 14 genes contidos nessa região, realizado por sequenciamento direto, não revelou variantes raras que pudessem estar diretamente associadas à vantagem de uma dada subpopulação de gametas em detrimento de outra. Entretanto, a presença de variantes comuns encontradas em genes da região pode indicar que o desvio de segregação observado decorre da interação, em nível proteico, de pequenas alterações genômicas, resultando em desempenho diferencial das células gaméticas.

1. Introdução

Diversos processos biológicos estão relacionados à formação de progênie cujas proporções genotípicas são incompatíveis com as predições mendelianas, ocorrência a que denominamos desvio de segregação. Entre eles, podemos citar a segregação não aleatória dos cromossomos durante a meiose, a seleção gamética e a viabilidade pós-zigótica diferencial (Pardo-Manuel de Villena e Sapienza, 2001).

O desvio de segregação ou *meiotic drive*, termo cunhado em 1957 por Sandler e Novitski, é bastante conhecido para machos de *Drosophila melanogaster* (sistema *segregation distorter*, localizado no cromossomo 2) e de *Mus musculus* (complexo t, que se encontra no cromossomo 17). Em ambos os casos, espermatozoides portadores de um haplótipo em particular apresentam melhor desempenho e, portanto, são capazes de concluir a fertilização com maior probabilidade quando comparados aos demais (Lyttle, 1991; Lyon, 2003).

Apesar de bem compreendido nos dois exemplos acima citados, pouco se sabe sobre a ocorrência de desvio de segregação e seu impacto em humanos. Alguns estudos demonstraram a distorção de locos associados a variantes raras (Zatz *et al.*, 1997; Iughetti *et al.*, 1998).

Entretanto, há indícios de que o desvio ocorra não somente para alguns poucos locos, mas para diversas regiões do genoma, e de que esse evento não esteja ligado à presença de alterações genéticas de baixa frequência na população (Zöllner *et al.*, 2004).

No presente trabalho, foram utilizados marcadores de microsatélites e polimorfismos de base única (SNP, do inglês: *single nucleotide polymorphism*) a fim de definir uma região comum aos indivíduos de uma família para a qual se observou distorção na transmissão de um alelo específico de *CAPN3*. Posteriormente, realizamos o sequenciamento direto de 14 genes contidos em tal região e identificamos variantes comuns que podem estar associadas ao desvio de segregação observado.

O gene *CAPN3* (*calpain 3*) está associado à distrofia muscular de cinturas do tipo 2A (LGMD2A, do inglês: *limb-girdle muscular dystrophy type 2A*) (MIM 253600) (Beckmann *et al.*, 1991; Richard *et al.*, 1995), a forma mais comum de LGMD entre os pacientes brasileiros, correspondendo a aproximadamente 30% do total de casos (de Paula *et al.*, 2002; Zatz e Starling, 2005).

Os primeiros sintomas dessa doença se manifestam, em geral, durante a segunda e a terceira décadas de vida, quando os afetados apresentam fraqueza nos músculos proximais da cintura pélvica. Este quadro evolui para o comprometimento simétrico dos músculos proximais da cintura escapular, podendo levar o paciente à cadeira-de-rodas após um período de 10 a 20 anos. As funções cardíaca e respiratória permanecem, em geral, preservadas e, dessa maneira, não se observa diminuição na expectativa de vida desses indivíduos.

CAPN3, que se localiza em 15q15.1-q21.1 (42,6 Mb), codifica uma proteína denominada p94 ou calpaína 3 (*CAPN3*), ausente ou em quantidade inferior à normal em pacientes com LGMD2A (Richard *et al.*, 1995).

A *CAPN3* pertence a uma superfamília de proteases ricas em cisteína no seu sítio ativo e dependentes de íons cálcio para sua ativação; tal proteína ocorre tanto no citossol como no núcleo das células constituintes de tecidos bastante específicos: em humanos, é encontrada somente em músculos esqueléticos, ao passo que, em ratos, a *CAPN3* é encontrada em músculos esqueléticos predominantemente, músculo cardíaco e fígado (Huang e Wang, 2001; Sorimachi e Suzuki, 2001; Goll *et al.*, 2003; Zatz e Starling, 2005).

2. Pacientes e métodos

2.1. Pacientes

Em 1999, foi atendida, no Centro de Estudos do Genoma Humano (CEGH), uma família cujo probando apresentava hipótese diagnóstica de distrofia muscular (Figura 2.1, p. 49).

O propósito (IV.6), que exibia fenótipo compatível com LGMD, foi molecularmente diagnosticado como heterozigoto composto para duas mutações em *CAPN3* (uma delas ocasiona a inserção de um códon de parada prematuro durante a tradução e tem origem paterna – c.2362-2363AG>TCATCT –, ao passo que a outra, uma deleção *in-frame* c.759_761del, tem origem materna; essa deleção é responsável pela codificação de uma proteína com deleção de uma lisina na posição 254 – CAPN3 ΔK254) (Starling *et al.*, 2005). Foi confirmado, portanto, o diagnóstico de LGMD2A.

Entretanto, chamou-nos atenção que outros membros da família também haviam herdado o alelo codificante da *CAPN3* que contém c.759_761del (CAPN3 ΔK254), totalizando 16 indivíduos com o mesmo alelo, sendo dez deles filhos de II.1.

A baixa probabilidade de ocorrência de dez indivíduos heterozigotos na prole de II.1, sob hipótese nula de ausência de desvio de segregação ($p = 1/2^{10} = 0,000977$), sugere que nessa família o cromossomo 15 está sujeito à segregação não-mendeliana.

2.2. Métodos

2.2.1. Isolamento de DNA genômico a partir de sangue periférico (protocolo adaptado de Miller *et al.*, 1988)

A partir de 4 mL a 8 mL de sangue periférico coletados em tubo contendo EDTA 8% (VACUETTE®) e posteriormente transferidos para tubo de propileno (Corning), foi adicionada a solução de lise 1 (1x) de modo a completar 50 mL; depois de incubação em gelo durante 30 minutos (para a lise da membrana celular), a amostra foi centrifugada a 580 x g (2000 rpm – rotações por minuto) por 15 minutos; o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi ressuspenso em 15 mL de solução de lise 1 (1x); uma nova centrifugação foi realizada a 580 x g (2000 rpm) durante 5 minutos; o sobrenadante foi novamente descartado e o precipitado foi ressuspenso em 3 mL de solução de lise 2 (1x) (para a lise da membrana nuclear); posteriormente, foram adicionados 50 µL de pronase E – 40 mg/mL (ou 70 µL de proteinase K – 10 mg/mL) e 300 µL de dodecil sulfato de sódio (SDS) 10%; após agitação manual, a amostra foi incubada a 37°C *overnight* (ou a 60°C durante 1 hora, caso tenha sido utilizada a proteinase K); a seguir, foi adicionado 1 mL de cloreto de sódio (NaCl) 6M à amostra, que foi agitada manualmente durante 15 segundos e centrifugada a 910 x g (2500 rpm) durante 20 minutos; o sobrenadante foi transferido para um novo tubo de propileno e a centrifugação foi repetida (910 x g, 15 minutos); o novo sobrenadante, ao qual atribuiu-se a medida de 1 volume, foi então transferido para um tubo de vidro (com capacidade de aproximadamente 15 mL) e foram adicionados 2 volumes de etanol 100%; após vedá-lo, o tubo foi invertido número de vezes suficiente para que ocorresse a precipitação do DNA, resgatado com o auxílio de um pequeno bastão de vidro e colocado em tubo de microcentrífuga de 1,5 mL; por fim, foi adicionado TE⁻⁴ em volume que variou entre 100 µL e 500 µL, segundo a quantidade de DNA precipitado; as amostras foram incubadas a 65°C durante 30 minutos e estocadas a

4°C. O procedimento acima descrito foi realizado após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido.

Solução de lise 1 (estoque – 10x):

1,550 M NH₄Cl

0,100 M KHCO₃

0,010 M EDTA (pH = 7,4)

Solução de lise 2 (estoque – 10x):

0,100 M Tris HCl (pH = 8,0)

0,400 M NaCl

0,020 M EDTA (pH = 8,2)

TE⁻⁴

0,1 mM EDTA

10 mM Tris HCl (pH = 8,0)

2.2.2. Amplificação de DNA utilizando-se a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR – do inglês, *Polymerase Chain Reaction*)

2.2.2.1. Estudo da segregação de marcadores de microssatélites localizados no cromossomo 15

Para iniciadores (*primers*) fluorescentes integrantes do kit comercialmente disponível *ABI Prism® Linkage Mapping Set v2.5 (Applied Biosystems)* (D15S994 e D15S978), foi realizada, em tubo de microcentrífuga de volume 0,2 mL, a reação abaixo descrita (para volume final de 10 µL):

Reagente	Volume utilizado (µL)	Concentração final
10x PCR <i>buffer</i> (sem Mg)**	1,00	1x
2,5 mM dNTP mix	1,00	0,25 mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP
50 mM MgCl ₂ **	0,50	2,50 mM
Primer mix (5 µM cada primer)	0,66	0,33 µM de cada primer
DNA (25 ng/µL)	3,00	75 ng
Taq DNA polimerase (5 U/µL)**	0,13	0,65 unidades
H ₂ O ultrapura	3,71	–

A preparação foi então submetida à incubação em termociclador a 94°C durante 5 minutos para desnaturação completa do DNA. A seguir, iniciaram-se 30 ciclos de amplificação, constituídos das seguintes etapas: 94°C por 15 segundos (para desnaturação), 55°C durante 15 segundos (para anelamento dos *primers*) e 72°C por 30 segundos (para extensão). Uma incubação adicional foi realizada a 72°C durante 10 minutos para extensão final e, por fim, o resfriamento a 10°C por tempo indeterminado. As amostras foram armazenadas a 4°C até a etapa subsequente.

Para a redução do tamanho da região de interesse do cromossomo 15, foram utilizados marcadores não disponíveis no kit acima citado e a construção dos *primers* foi feita segundo Schuelke, 2000 (tabela 2.1, p. 52). Nesses casos, foi realizada a reação a seguir, para volume final de 15 µL:

Reagente	Volume utilizado (uL)	Concentração final
10x PCR <i>buffer</i> (sem Mg)**	1,50	1x
2,5 mM dNTP mix	1,50	0,25 mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP
50 mM MgCl ₂ **	0,75	2,50 mM
<i>Primer</i> M13 (FAM) (2,4 µM)	1,00	0,16 µM
<i>Primer forward</i> (0,6 µM)	1,00	0,04 µM
<i>Primer reverse</i> (2,4 µM)	1,00	0,16 µM
DNA (50 ng/µL)	2,00	100 ng
Taq DNA polimerase (5 U/µL)**	0,20	1 unidade
H ₂ O ultrapura	6,05	–

As amostras foram incubadas em termociclador a 94°C por 5 minutos para desnaturação completa do DNA e, a seguir, foram realizados 30 ciclos compostos pelas etapas de desnaturação (94°C – 30 segundos), anelamento dos *primers forward* e *reverse* (57°C – 45 segundos) e extensão (72°C – 45 segundos); 8 ciclos adicionais foram efetuados para ligação do *primer* M13 (FAM), com as etapas de desnaturação (94°C – 30 segundos), anelamento (53°C – 45 segundos) e extensão (72°C – 45 segundos). Para extensão final, uma nova incubação foi realizada a 72°C durante 10 minutos e seguiu-se o resfriamento a 10°C por tempo

indeterminado. O armazenamento das amostras foi feito a 4°C até a etapa subsequente.

** Invitrogen™ (número de catálogo 11615010).

Após a amplificação do DNA como acima descrito, a amostra foi diluída com água ultrapura em proporção 1:10; 2 µL dessa diluição foram acrescentados a 2,7 µL de Tween-20 0,1% e 0,3 µL de Size Standard ET550-R (*GE Healthcare*, número de catálogo 25-6550-01) para posterior genotipagem utilizando-se o *MegaBACE™ DNA Analysis System* (*Amersham Biosciences*).

Para a análise dos resultados, utilizou-se o programa *Genetic Profiler* versão 2.2 (*Amersham Biosciences*).

2.2.2.2. Estudo de genes localizados na região de interesse do cromossomo

15

Após a definição da região de interesse localizada no cromossomo 15 (descrita no item anterior) prosseguiu-se ao sequenciamento de genes nela contidos.

A amplificação das regiões exônicas de tais genes, bem como de suas fronteiras intron-exon foi realizada em tubo de 0,2 mL, segundo a descrição que se segue (para volume final de 10 µL):

Reagente	Volume utilizado (µL)	Concentração final
10x PCR <i>buffer</i> (sem Mg)**	1,00	1x
2,5 mM dNTP mix	1,00	0,25 mM de dATP, dCTP, dGTP, dTTP
50 mM MgCl ₂ **	0,30	1,50 mM
<i>Primer forward</i> (20 µM)	0,50	1,00 µM
<i>Primer reverse</i> (20 µM)	0,50	1,00 µM
DNA (100 ng/µL)	1,00	100 ng
Taq DNA polimerase (5 U/µL)**	0,10	0,50 unidade
H ₂ O ultrapura	5,60	—

** Invitrogen™ (número de catálogo 11615010).

A preparação foi então submetida à incubação em termociclador a 95°C durante 5 minutos para desnaturação completa do DNA, seguindo-se 30 ciclos compostos pelas etapas de desnaturação (95°C – 30 segundos), anelamento dos *primers* (57°C – 30 segundos) e extensão (72°C – 30 segundos). A extensão final a 72°C teve duração de 10 minutos e o resfriamento a 10°C foi feito por tempo indeterminado. O armazenamento até uso na etapa seguinte foi feito a 4°C.

As temperaturas de anelamento, bem como a reação acima descrita foram alteradas para a amplificação de determinadas regiões cromossômicas, sendo necessária, por vezes, modificações como a adição de dimetilsulfóxido (DMSO) 10%.

A quantificação das amostras amplificadas foi realizada por meio de eletroforese em gel de agarose 2,0%, 0,5x TBE (Tris/Borato/EDTA – solução 10x: 0,89 M Tris Base, 0,89 M ácido bórico, 0,02 M EDTA) com brometo de etídeo 0,3 µg/mL, submetido a 120 V durante 50 a 60 minutos. Para a corrida, 2 µL da amostra de PCR foram adicionados a 1 µL de tampão BFB (0,25% azul de bromofenol, 40% sucrose). O marcador utilizado como base comparativa para a quantificação foi o *Low DNA mass ladder* (Invitrogen™, número de catálogo 10068013). O gel foi visualizado em transiluminador com luz ultravioleta.

A etapa seguinte consistiu na purificação do produto amplificado para a remoção do excesso de *primers*, bem como de nucleotídeos provenientes da PCR:

Reagente	Volume utilizado (uL)	Concentração final
Produto de PCR	8,00	–
Exonuclease I (EXO – 20 U/µL)	0,25	5 unidades
<i>Shrimp alkaline phosphatase</i> (SAP – 1 U/µL)	1,00	1 unidade

A reação acima foi submetida à incubação a 37°C durante 1 hora (para atividade da EXO e da SAP), seguindo-se o aquecimento a 80°C por 20 minutos (para a completa inativação de ambas as enzimas) e o posterior resfriamento a 10°C por tempo indeterminado.

A etapa subsequente consistiu na reação de sequenciamento propriamente dita, onde ocorreu a incorporação de didesoxinucleotídeos trifosfato (ddNTP) fluorescentes na amostra de DNA:

Reagente	Volume utilizado (uL)	Concentração final
BigDye® terminator v.3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Mix (2,5x)***	2,00	0,5x
BigDye® terminator v.3.1 5x Sequencing Buffer***	1,00	0,5x
Primer 5 µM (<i>forward</i> e <i>reverse</i> separadamente)	1,00	0,5 µM
Produto de PCR purificado	Variável, de acordo com a quantificação	10 a 15 ng (amplicons com 100 a 300 pb); 20 a 30 ng (amplicons com 300 a 800 pb)
H ₂ O ultrapura	q.s.p. 10,0	–

*** parte integrante do kit *BigDye® terminator v.3.1 Cycle Sequencing kit (Applied Biosystems – número de catálogo 4337455)*

A preparação acima foi submetida à incubação em termociclador a 96°C durante 1 minuto (para desnaturação do DNA), seguindo-se 25 ciclos constituídos das etapas de desnaturação (96°C por 10 segundos), anelamento dos *primers* (50°C durante 5 segundos) e extensão para incorporação dos ddNTPs (60°C por 4 minutos). Em cada ciclo, o decréscimo de temperatura entre as etapas de desnaturação e anelamento foi de 1°C por segundo. Ao fim, as amostras foram resfriadas a 10°C por tempo indeterminado.

A purificação após a reação de sequenciamento foi feita em coluna de purificação ou por precipitação utilizando-se 2-propanol e etanol:

- Coluna de purificação:

A coluna de purificação foi construída em placa MultiScreen (Millipore, número de catálogo MAHVN4550), utilizando-se como matriz *Sephadex™ G-50 (GE Healthcare, número de catálogo 17057302)*.

Cada coluna foi hidratada com 300 µL de água ultrapura e, após 3 horas à temperatura ambiente, a placa foi centrifugada a 725 x g (2100 rpm) durante 5 minutos. A seguir, foram adicionados 150 µL de água ultrapura a cada coluna e a centrifugação foi repetida a 725 x g (2100 rpm) por 5 minutos. Ao produto da reação de sequenciamento foram adicionados 5 µL de água ultrapura e, então, o volume de 15 µL foi transferido para a coluna de purificação. Para a eluição final, foi feita mais uma etapa de centrifugação a 725 x g (2100 rpm) durante 5 minutos. As amostras foram secas em termociclador a 96°C por 15 minutos e foram acrescentados 10 µL de formamida****.

- Precipitação com 2-propanol e etanol:

Foram adicionados 40 µL de 2-propanol 65% ao produto da reação de sequenciamento, que, após agitação manual, foi incubado à temperatura ambiente por 20 minutos ao abrigo da luz. A seguir, centrifugou-se a amostra a 9700 x g (12000 rpm) por 25 minutos (4°C); o tubo foi seco após invertê-lo em papel absorvente e foram adicionados 200 µL de etanol 70%. Depois de agitá-la manualmente mais uma vez, a amostra foi centrifugada a 9700 x g (12000 rpm) por 10 minutos (4°C); novamente, o tubo foi seco invertendo-o em papel absorvente e foram acrescentados 10 µL de formamida****.

**** *Hi-Di™ formamide (Applied Biosystems, número de catálogo 4311320).*

O sequenciador utilizado para a leitura das amostras foi o ABI 3730 (*Applied Biosystems*) e o programa usado para a análise dos resultados foi o *Sequencher®* versão 4.8 (*Gene Codes Corporation*).

3. Resultados

O estudo do cromossomo 15, realizado com marcadores de microssatélites que flanqueiam *CAPN3* e cujas localizações estão entre 40,6 Mb e 49,3 Mb, revelou a presença de uma região comum aos descendentes de II.1, excluindo-se dois integrantes da geração IV (IV.1 e IV.5) (Figura 2.2, p. 50).

A ocorrência de recombinação entre D15S537 e D15S132 para os indivíduos III.1 e IV.3 foi investigada com o auxílio de SNPs, localizados em *TRIM69* (alteração não descrita no intron 3/4 e SNP rs6493127 no intron 6/7) e em *SORD* (SNP rs28709644 no intron 4/5). Dessa maneira, foi possível definir uma região comum a 13 dos 15 descendentes de II.1, compreendida entre o SNP rs6493127 (em 45,1 Mb) e o marcador de microssatélite D15S132 (em 47,2 Mb); o gene *CAPN3* não se encontra nesse intervalo (Figura 2.3, p. 51).

A região em questão, que apresenta 2,1 Mb de extensão, compreende 15 genes codificadores de proteínas (tabela 2.2, p. 53) dos quais 14 foram selecionados para sequenciamento de acordo com sua função e/ou perfil de expressão relacionados ao aparelho reprodutor masculino.

Nos genes estudados, não foi encontrada qualquer variante que apresentasse baixa frequência populacional e pudesse ser diretamente associada ao desempenho diferencial de uma subpopulação de espermatozoides. Entretanto, alterações polimórficas presentes em regiões codificadoras foram identificadas no indivíduo II.1 e em sua progênie (tabela 2.3, p. 54).

4. Discussão

Mesmo após um longo período desde as primeiras descrições, em mamíferos, de desvio de segregação, feitas por Dobrovolskaia-Zavadskaia em 1932 acerca do complexo-t (Willison e Lyon, 2000), este evento biológico e suas implicações são pouco conhecidos na espécie humana.

O presente trabalho sugere, para a família estudada, o desvio de segregação de uma região do cromossomo 15 com 2,1 Mb de extensão (em 15q21.1), compartilhada por 13 entre 15 indivíduos com um ancestral comum. A não-observação de tal região para a progênie em sua totalidade não exclui a ocorrência da distorção de segregação, uma vez que esse fenômeno, quando observado em *Drosophila melanogaster* e *Mus musculus*, também não se verifica para 100% da prole (Lyttle, 1991).

Além disso, este resultado é corroborado pelo trabalho de Zöllner *et al.* (2004), onde são identificadas diversas regiões do genoma sujeitas a desvio de segregação, com probabilidade máxima atribuída ao cromossomo 15, mais especificamente a 15q21.3.

O estudo de genes contidos na região sob distorção, compreendida entre o SNP rs6493127 e o marcador de microsatélite D15S132, revelou alterações polimórficas nas regiões codificadoras de *DUOX2*, *DUOX2A2*, *DUOX1*, *SHF* e *SLC30A4*, sendo algumas delas classificadas como *missense* e outras, como trocas sinônimas.

Embora as substituições apresentadas na tabela 2.3 (p. 54) sejam consideradas variantes comuns e tenham, portanto, alta frequência na população, podem acarretar efeitos sobre a proteína, o que não se restringe somente às alterações *missense*, mas também abrange aquelas que não culminam em troca de aminoácido. Apesar de não ser responsável pela modificação na estrutura primária da proteína, as denominadas mutações silenciosas são capazes de alterar o dobramento do RNAm, o que determina sua estabilidade e, por conseguinte, a

velocidade com que a respectiva proteína é traduzida e posteriormente degradada. A exemplo disso, pode-se citar o que ocorre com o gene que codifica o receptor de dopamina D2 (*DRD2*), onde substituições sinônimas apresentam consequências funcionais importantes para a estabilidade de seu RNAm, bem como para a expressão desse receptor induzida por dopamina (Duan *et al.*, 2003).

DUOX1 e DUOX2 (*Dual oxidase 1 precursor* e *Dual oxidase 2 precursor*, respectivamente) são glicoproteínas integrantes da família NADPH oxidase, que reúne proteínas responsáveis pela formação de ânions superóxido, precursores das espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês: *reactive oxygen species*). Estas são consideradas importantes componentes em vias de sinalização celular, sendo essenciais para a biossíntese de hormônios da tireoide e para a fertilização (Donkó *et al.*, 2005). Ainda que não apresentem função previamente associada aos processos desempenhados por espermatozoides, a expressão de DUOX1 e DUOX2 em testículos sugere sua importância para o sistema reprodutor masculino.

DUOXA2 (*Dual oxidase maturation factor 2*), por sua vez, codifica uma proteína transmembrana localizada no retículo endoplasmático, essencial para o trânsito de DUOX2 entre o retículo endoplasmático e o Golgi, bem como para sua maturação e translocação até a membrana plasmática, onde executa suas funções (Grasberger e Refetoff, 2006).

Assim como ocorre para DUOX1 e DUOX2, o produto codificado por *SHF* (*Src homology 2 domain containing F*), já ligado à regulação da apoptose, não foi diretamente associado às células gaméticas, mas expressa-se em testículos, o que pode indicar participação em etapas da gametogênese.

Já *SLC30A4* (*Solute carrier family 30, member 4*) codifica uma proteína pertencente à família ZNT de transportadores de zinco (ZNT4 ou SLC30A4). As proteínas ZNT apresentam estruturas similares entre si: seis domínios transmembrana e um *loop* citoplasmático rico em histidina.

O zinco é bastante abundante nos órgãos genitais masculinos, em especial na próstata, glândula responsável pela elevada concentração desse metal no plasma seminal. Além disso, desempenha funções celulares importantes em nível estrutural (na formação de *zinc fingers* em proteínas que se ligam ao DNA) e é parte do sítio catalítico de metaloenzimas como a SOD1 (superóxido dismutase 1, também conhecida como cobre-zinco superóxido dismutase) e carboxipeptidases pancreáticas, por exemplo (Ebisch *et al.*, 2007; Colagar *et al.*, 2009).

No que diz respeito ao sistema reprodutor masculino, o zinco apresenta importante papel no desenvolvimento testicular, bem como nas funções fisiológicas do espermatozoide, sendo encontrado em todos os compartimentos celulares, em especial na porção intermediária do flagelo (Ebisch *et al.*, 2007; Colagar *et al.*, 2009; de Lamirande *et al.*, 2009).

Alterações dos níveis de zinco já foram associadas a problemas durante a espermatogênese, não somente por sua participação durante a reação acrossômica, mas possivelmente também devido à sua capacidade de ligar-se a espécies reativas de oxigênio, não permitindo que ocorram danos oxidativos à célula, em particular, à cromatina (Colagar *et al.*, 2009; Liu *et al.*, 2009).

Na família estudada, realizamos, inicialmente, a busca de uma alteração molecular de baixa frequência populacional em um gene com função diretamente associada à fertilidade masculina e que provocasse o desvio em favor do cromossomo portador de *CAPN3* c.759_761del. No entanto, deparamo-nos com oito variantes comuns distribuídas em cinco diferentes genes e cujos efeitos em nível proteico são absolutamente desconhecidos, embora possam estar associados à espermatogênese, o que é sugerido por suas funções ou seus perfis de expressão.

Uma hipótese é que a distorção na transmissão dessa região do cromossomo 15 seja causada, como em *Drosophila melanogaster* e em *Mus musculus*, pela interação entre diferentes genes: o que promove o desvio (*distorter*) e o que

responde a ele (*responder*), podendo haver mais de um *distorter* e mais de um *responder* (Lyttle, 1991; Lyon, 2003).

Sobretudo, acreditamos que as alterações encontradas nessa família, por si só, não sejam responsáveis pelo desvio, mas que tais genes sejam capazes de interagir com outros associados à distorção de segregação, possivelmente localizados em regiões do genoma diversas.

Figuras

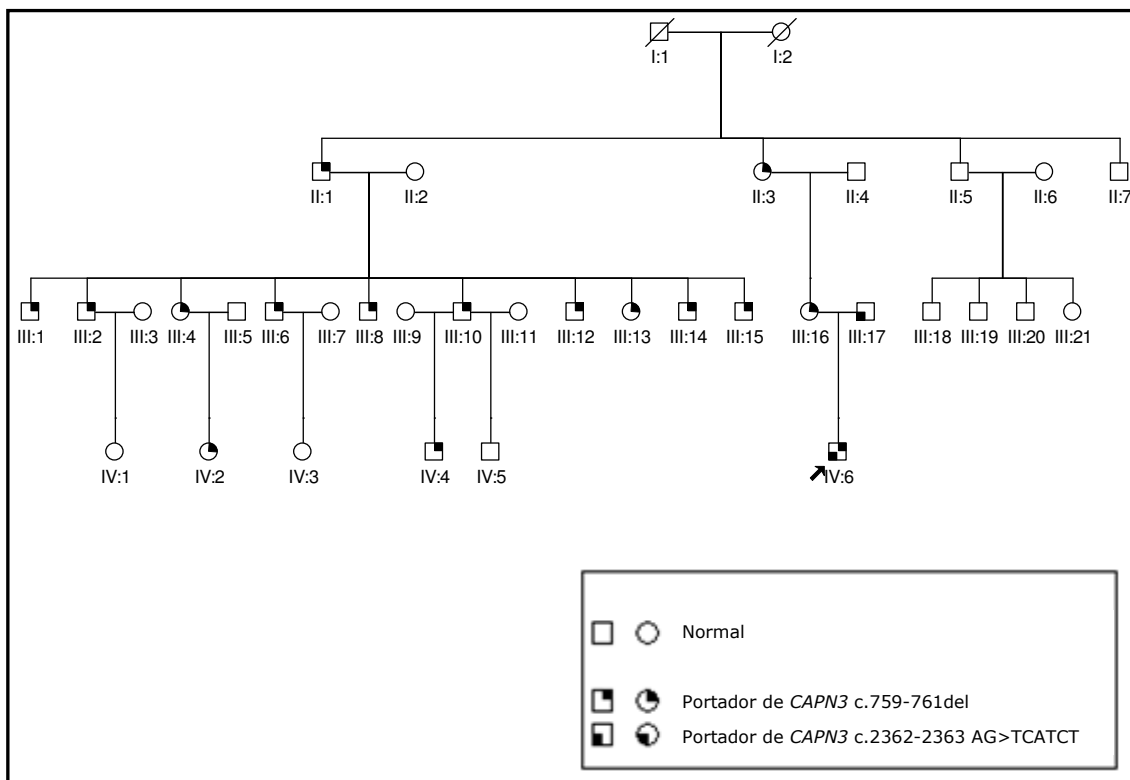


Figura 2.1: Heredograma da família estudada evidencia a transmissão da alteração *CAPN3* c.759-761del para a descendência do indivíduo II.1; probando IV.6.

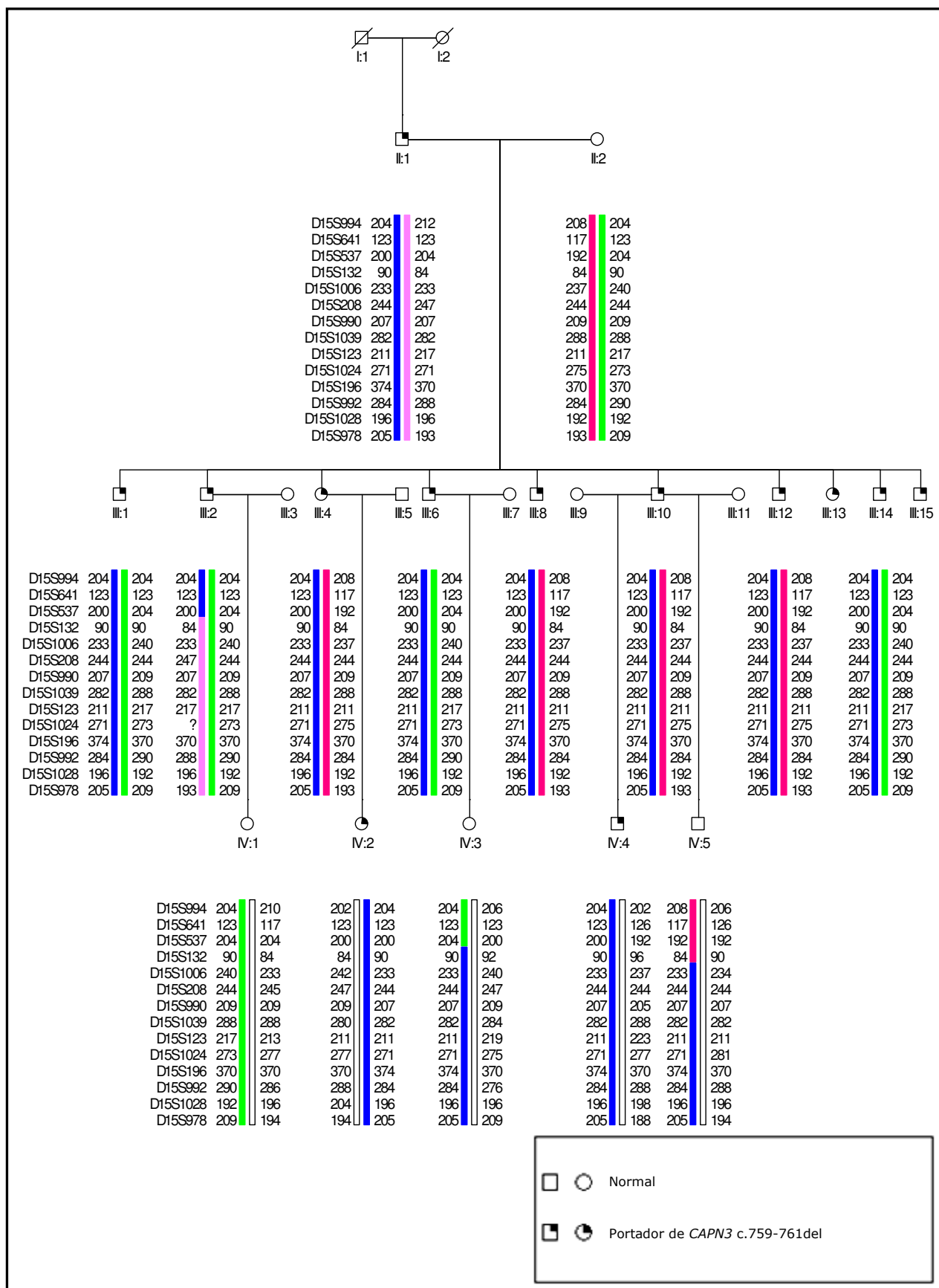


Figura 2.2: Estudo de marcadores de microssatélites compreendidos entre D15S994 e D15S978 para a progénie de II.1.

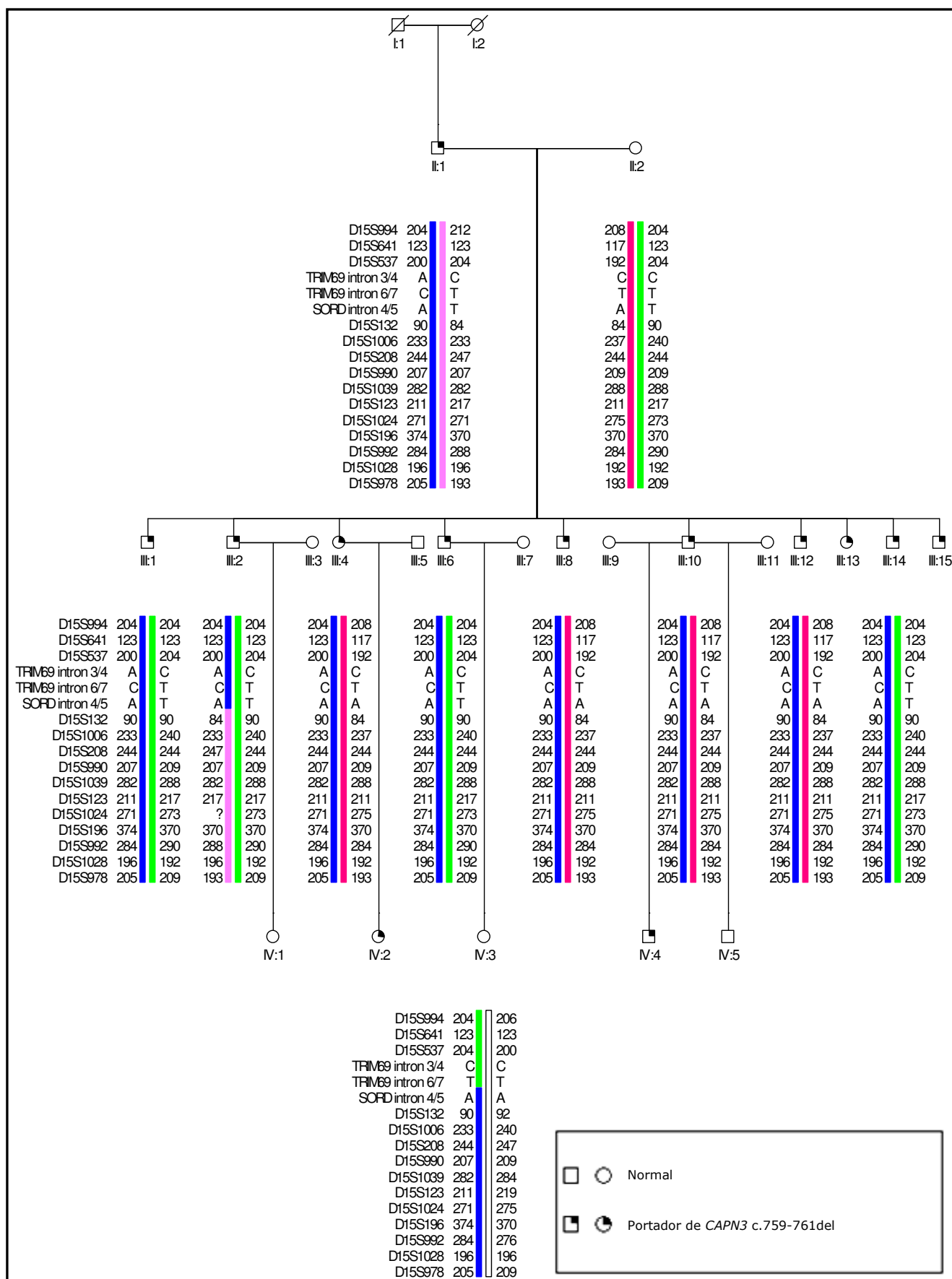


Figura 2.3: Estudo de marcadores compreendidos entre D15S994 e D15S978, evidenciando a redução da região compartilhada pelos descendentes de II.1, entre SNP rs6493127 (TRIM69 intron 6/7) e D15S132 (indivíduos III.2 e IV.3).

Tabelas

Tabela 2.1: Marcadores de microssatélites utilizados para estudo da região compreendida entre D15S994 (40,6 Mb) e D15S978 (49,3 Mb).

marcador	frequência ⁽³⁾	amplicon (pb)	Posição no mapa físico (pb)				Sequência dos oligonucleotídeos iniciadores	
			NCBI ⁽¹⁾		UCSC ⁽²⁾		<i>forward</i>	<i>reverse</i>
			início	término	início	término		
D15S641	0,570	96-108	41843931	41844035	41843908	41844201	AACAAAGGGAGACCCTCATC	GACACCCAGTAGCAATGAG
D15S537	0,650	185	44815488	44815672	44815413	44815722	CCCAGCAGTAATCCCACCATT	ACCACAATGCCAGCAAGCTT
D15S132	0,750	69-83	47201150	47201228	47201013	47201314	CTGATAATAAAACCAGGAAGACAC	TATTGGCCTGAAGTGGTG
D15S1006	0,820	190-228	47546963	47547176	47546869	47547186	AGGGAATACTTCAAACTC	CCACTTGGCTATGGTGAAT
D15S208	0,670	224-230		?	47709451	47709816	TCTTAGCAGTAATTGTCACTCCTT	ACATACCATCCCATGGTTAT
D15S990	0,600	190-196	47761467	47761657	47761380	47761758	CTGAACAGGTTGAAGTGCC	CTTGAATGCCTGAGGAC
D15S1039	0,840	227-275	47763995	47764259	47763995	47764331	TGCCGGTAGTAACATCTG	CCAAGGATAAAGTATTTGTGTC
D15S123	0,800	191-207	48064521	48064711	48064520	48064711	AGCTGAACCCAATGGACT	TTTCATGCCACCAACAAA
D15S1024	0,430	212-264	48552488	48552741	48552421	48552764	CTAAGTCCTCCACACTAGCC	CTAAAATGGGAACAGGGC
D15S196	0,490	356	48709394	48709737	48709235	48709740	GACCTGTAGCTGAAGGG	GGCACATTCATTTATAAAG
D15S992	0,800	228-274	48839742	48840011	48839742	48840080	AGCTGAGAAATGCCTTCTATAAAT	GAGGGCCACCTTGATAGT
D15S1028	0,820	171-187	48996982	48997156	48996980	48997333	TGTCCTGAAATTCCCAAC	GAACTGTGCTCTGTGCTC

⁽¹⁾ <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

⁽²⁾ <http://genome.ucsc.edu/> - assembly Feb.2009 (GRCh37/hg19)

⁽³⁾ <http://research.marshfieldclinic.org/genetics/GeneticResearch/compMaps.asp>

Tabela 2.2: Genes codificadores de proteínas presentes na região flanqueada pelo SNP rs6493127 em *TRIM69* (45,1 Mb) e D15S132 (47,2 Mb); em negrito: genes sequenciados.

Símbolo	Posição (pb) ^(*)	Nome
<i>C15orf43 (MGC33951)</i>	45248903 – 45271419	<i>Hypothetical protein LOC145645</i>
<i>SORD (SORD1)</i>	45315341 – 45367038	<i>Sorbitol dehydrogenase</i>
<i>DUOX2 (LNOX2; THOX2; NOXEF2; P138-TOX)</i>	45384853 – 45406359	<i>Dual oxidase 2</i>
<i>DUOXA2</i>	45406524 – 45410299	<i>Dual oxidase maturation factor 2</i>
<i>DUOXA1 (NIP; mol; NUMBIP; FLJ32334)</i>	45409688 – 45422059	<i>Dual oxidase maturation factor 1</i>
<i>DUOX1</i>	45422192 – 45457774	<i>Dual oxidase 1</i>
<i>SHF (MGC126650; MGC126652)</i>	45459414 – 45493373	<i>Src homology 2 domain containing F</i>
<i>SLC28A2 (CNT2; HCNT2; SPNT1; FLJ21468; HsT17153; MGC138252)</i>	45544428 – 45568132	<i>Solute carrier family 28, member 2</i>
<i>GATM (AT; AGAT)</i>	45653324 – 45670980	<i>Glycine amidinotransferase</i>
<i>SPATA5L1 (MGC5347; FLJ12286)</i>	45694519 – 45713614	<i>Spermatogenesis associated 5-like 1</i>
<i>C15orf48 (NMES1; FOAP-11; FLJ22645; MGC32925)</i>	45722763 – 45725645	<i>Chromosome 15 open reading frame 48</i>
<i>SLC30A4 (ZNT4)</i>	45774682 – 45815002	<i>Solute carrier family 30, member 4</i>
<i>C15orf21 (D-PCa-2; FLJ39426)</i>	45803334 – 45848928	<i>Chromosome 15 open reading frame 21</i>
<i>PLDN (PA; PALLID)</i>	45879417 – 45901908	<i>Pallidin homolog (mouse)</i>
<i>SQRDL (CGI-44)</i>	45923346 – 45983478	<i>Sulfide quinone reductase-like (yeast)</i>

(*) <http://genome.ucsc.edu/> - assembly Feb.2009 (GRCh37/hg19)

Tabela 2.3: Variantes identificadas em genes compreendidos entre SNP rs6493127 (45,1 Mb) e D15S132 (47,2 Mb) para o indivíduo II.1 e seus descendentes.

Gene	SNP (dbSNP build 131)	Localização SNP (pb)^(*)	Alteração	Heterozigosidade média
<i>DUOX2</i>	rs2001616	45404066	Prolina (CCC) > Leucina (CTC)	0,140 +/- 0,224
	rs269860	45400358	Glicina (GGG) > Glicina (GGC)	0,219 +/- 0,248
	rs269868	45392075	Serina (TCG) > Leucina (TTG)	0,454 +/- 0,230
<i>DUOXA2</i>	rs2576090	45408414	Arginina (CGT) > Glicina (GGT)	0,251 +/- 0,250
<i>DUOX1</i>	rs1706804	45444518	Treonina (ACA) > Treonina (ACG)	0,497 +/- 0,041
	rs2458236	45446156	Leucina (CTC) > Fenilalanina (TTC)	0,498 +/- 0,027
<i>SHF</i>	rs1632144	45467540	Alanina (GCG) > Prolina (CCG)	–
<i>SLC30A4</i>	rs2453531	45779810	Aspartato (GAC) > Aspartato (GAT)	0,318 +/- 0,241

(*) <http://genome.ucsc.edu/> - assembly Feb.2009 (GRCh37/hg19)

Referências bibliográficas

Beckmann, J. S., Richard, I., Hillaire, D., Broux, O., Antignac, C., Bois, E., Cann, H., Cottingham, R. W., Jr., Feingold, N., Feingold, J. and et al. (1991). "A gene for limb-girdle muscular dystrophy maps to chromosome 15 by linkage." C R Acad Sci III **312**(4): 141-8.

Colagar, A. H., Marzony, E. T. and Chaichi, M. J. (2009). "Zinc levels in seminal plasma are associated with sperm quality in fertile and infertile men." Nutr Res **29**(2): 82-8.

de Lamirande, E., Lamothe, G. and Villemure, M. (2009). "Control of superoxide and nitric oxide formation during human sperm capacitation." Free Radic Biol Med **46**(10): 1420-7.

de Paula, F., Vainzof, M., Passos-Bueno, M. R., de Cassia, M. P. R., Matioli, S. R., L, V. B. A., Nigro, V. and Zatz, M. (2002). "Clinical variability in calpainopathy: what makes the difference?" Eur J Hum Genet **10**(12): 825-32.

Donko, A., Peterfi, Z., Sum, A., Leto, T. and Geiszt, M. (2005). "Dual oxidases." Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci **360**(1464): 2301-8.

Duan, J., Wainwright, M. S., Comeron, J. M., Saitou, N., Sanders, A. R., Gelernter, J. and Gejman, P. V. (2003). "Synonymous mutations in the human dopamine receptor D2 (*DRD2*) affect mRNA stability and synthesis of the receptor." Hum Mol Genet **12**(3): 205-16.

Ebisch, I. M., Thomas, C. M., Peters, W. H., Braat, D. D. and Steegers-Theunissen, R. P. (2007). "The importance of folate, zinc and antioxidants in the pathogenesis and prevention of subfertility." Hum Reprod Update **13**(2): 163-74.

Goll, D. E., Thompson, V. F., Li, H., Wei, W. and Cong, J. (2003). "The calpain system." Physiol Rev **83**(3): 731-801.

Grasberger, H. and Refetoff, S. (2006). "Identification of the maturation factor for dual oxidase. Evolution of an eukaryotic operon equivalent." J Biol Chem **281**(27): 18269-72.

Huang, Y. and Wang, K. K. (2001). "The calpain family and human disease." Trends Mol Med **7**(8): 355-62.

Iughetti, P., Otto, P. A., Zatz, M., Passos Bueno, M. R. and Marie, S. K. (1998). "Different behavior in the paternally vs. maternally inherited mutated allele in Brazilian Machado-Joseph (MJD1) families." Am J Med Genet **77**(3): 246-8.

Liu, D. Y., Sie, B. S., Liu, M. L., Agresta, F. and Baker, H. W. (2009). "Relationship between seminal plasma zinc concentration and spermatozoa-zona pellucida binding and the ZP-induced acrosome reaction in subfertile men." Asian J Androl **11**(4): 499-507.

Lyon, M. F. (2003). "Transmission ratio distortion in mice." Annu Rev Genet **37**: 393-408.

Lyttle, T. W. (1991). "Segregation distorters." Annu Rev Genet **25**: 511-57.

Miller, S. A., Dykes, D. D. and Polesky, H. F. (1988). "A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells." Nucleic Acids Res **16**(3): 1215.

Pardo-Manuel de Villena, F. and Sapienza, C. (2001). "Nonrandom segregation during meiosis: the unfairness of females." Mamm Genome **12**(5): 331-9.

Richard, I., Broux, O., Allamand, V., Fougerousse, F., Chiannikulchai, N., Bourg, N., Brenguier, L., Devaud, C., Pasturaud, P., Roudaut, C. and et al. (1995). "Mutations in the proteolytic enzyme calpain 3 cause limb-girdle muscular dystrophy type 2A." Cell **81**(1): 27-40.

Sandler, L. and Novitski, E. (1957). "Meiotic drive as an evolutionary force." Am Nat **41**: 105-10.

Schuelke, M. (2000). "An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments." Nat Biotechnol **18**(2): 233-4.

Sorimachi, H. and Suzuki, K. (2001). "The structure of calpain." J Biochem **129**(5): 653-64.

Starling, A., Schlesinger, D., Kok, F., Passos-Bueno, M. R., Vainzof, M. and Zatz, M. (2005). "A family with McLeod syndrome and calpainopathy with clinically overlapping diseases." Neurology **65**(11): 1832-3.

Willison, K. R. and Lyon, M. F. (2000). "A UK-centric history of studies on the mouse t-complex." Int J Dev Biol **44**(1): 57-63.

Zatz, M., Cerqueira, A., Vainzof, M. and Passos-Bueno, M. R. (1997). "Segregation distortion of the CTG repeats at the myotonic dystrophy (DM) locus: new data from Brazilian DM families." J Med Genet **34**(9): 790-1.

Zatz, M. and Starling, A. (2005). "Calpains and disease." N Engl J Med **352**(23): 2413-23.

Zöllner, S., Wen, X., Hanchard, N. A., Herbert, M. A., Ober, C. and Pritchard, J. K. (2004). "Evidence for extensive transmission distortion in the human genome." Am J Hum Genet **74**(1): 62-72.

Capítulo III

Identifying genomic regions susceptible to transmission ratio distortion: a new strategy from an old technique

Monize Lazar¹, David Schlesinger^{1,2}, Simone Ferreira¹, Michel Naslavsky¹, Dani Ejzenberg^{3,4}, Mayra Miranda⁴, Philip Wolff⁴, Paulo Alberto Otto¹, Mayana Zatz¹

¹ Human Genome Research Center, Department of Genetics and Evolutionary Biology, Institute of Biosciences, University of São Paulo

² Department of Clinical Neurology, University of São Paulo School of Medicine

³ Human Reproduction Center Governor Mario Covas, University of São Paulo School of Medicine

⁴ Genics Reproductive Medicine and Genomics Ltd., São Paulo, Brazil

Abstract

The transmission ratio distortion (TRD), defined as a departure from Mendelian segregation, is caused by different mechanisms and has been observed in several species, being extensively characterized on *Drosophila melanogaster* and *Mus musculus*. There are some evidences about the occurrence of TRD in humans, although many were based on families selected for the presence of a particular genetic disorder, what makes impossible to conclude if TRD is a disease-dependent phenomenon. Here, we used DNA from male gametic cells, sorted according to their motility, to estimate and compare allelic frequencies at each locus in order to identify genomic regions susceptible to TRD in normal individuals. The allelic frequencies were obtained using Affymetrix GeneChip[®] Mapping 100K Array set and subsequently corrected employing k-values before their comparison through Wilcoxon tests. Some statistically significant results were achieved for regions containing genes involved with acrosome reaction and sperm motility, as *PDE1* and *PDE4*, suggesting that these are targets of the selection process, which creates proportions diverging from Mendelian predictions in the offspring.

Identificando regiões genômicas sujeitas a desvio de segregação: uma nova estratégia a partir de uma antiga técnica

Monize Lazar¹, David Schlesinger^{1,2}, Simone Ferreira¹, Michel Naslavsky¹, Dani Ejzenberg^{3,4}, Mayra Miranda⁴, Philip Wolff⁴, Paulo Alberto Otto¹, Mayana Zatz¹

¹ Centro de Estudos do Genoma Humano, Departamento de Genética e Biologia Evolutiva, Instituto de Biociências, Universidade de São Paulo

² Departamento de Neurologia Clínica, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

^{3,4} Centro de Reprodução Humana Governador Mario Covas, Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo

⁴ Genics Medicina Reprodutiva e Genômica Ltda., São Paulo, Brasil

Resumo

O desvio de segregação, definido como uma distorção da segregação mendeliana, pode apresentar diferentes causas. Este evento biológico vem sendo observado em diversas espécies e foi amplamente caracterizado em *Drosophila melanogaster* e em *Mus musculus*. Há evidências de que o desvio de segregação ocorra na espécie humana, embora a maioria delas seja averiguada a partir de famílias selecionadas pela presença de uma doença específica. Nesses casos, não é possível concluir se a distorção observada é um fenômeno diretamente ligado ao quadro que se manifesta nesses indivíduos. No presente trabalho, utilizamos DNA de células gaméticas masculinas, separadas segundo sua motilidade, para calcular e comparar as frequências alélicas de cada loco em heterozigose, a fim de identificar regiões genômicas sujeitas à distorção de segregação. As frequências alélicas foram obtidas usando-se a técnica de *microarray* de SNPs (*Affymetrix GeneChip® Mapping 100K Array set*) e foram corrigidas antes da realização do teste de Wilcoxon. Alguns resultados com significância estatística foram obtidos para regiões que contêm genes envolvidos com a reação acrossômica e com a motilidade espermática, como *PDE1C* e *PDE4D*, sugerindo que estes são alvos de um processo seletivo que culmina em proporções diferentes das predições mendelianas para a geração seguinte.

1. Introdução

O desvio de segregação, definido como a transmissão preferencial de um alelo parental para a prole, pode apresentar como causas tanto a seleção em nível pós-zigótico ou gamético, como a segregação meiótica não aleatória dos cromossomos (Pardo-Manuel de Villena e Sapienza, 2001).

Essa distorção nas proporções mendelianas já foi observada em diversas espécies e está particularmente bem caracterizada para o cromossomo 2 de machos de *Drosophila melanogaster* e para o cromossomo 17 de machos de *Mus musculus*. Em ambos os casos, os cromossomos citados podem ser transmitidos para a prole com frequência que oscila entre 95% e 99% (Lyttle, 1991; Lyon, 2003).

Embora este evento biológico seja bastante conhecido para os casos acima, pouco se sabe sobre sua ocorrência em humanos. A maior parte das evidências até então obtidas para a espécie humana resultou de trabalhos com famílias portadoras de uma dada doença, o que não nos permite concluir se tal distorção está diretamente associada ao quadro apresentado pelos indivíduos estudados ou se os sinais clínicos atuam somente como marcadores fenotípicos do desvio de segregação (Zatz *et al.*, 1997; Iughetti *et al.*, 1998; Botta *et al.*, 2005; Bettencourt *et al.*, 2008).

Em 2004, um estudo realizado em 148 núcleos familiares utilizando-se 888 marcadores de microssatélites demonstrou que a proporção de indivíduos que apresentavam regiões cromossômicas idênticas por descendência era superior à predição mendeliana. O excesso de compartilhamento foi identificado em diversas regiões do genoma, com probabilidade máxima para o cromossomo 15, mais especificamente para 15q21.3 (Zöllner *et al.*, 2004).

Mais recentemente, um trabalho com dados do projeto HapMap referentes a 60 trios de indivíduos caucasoides (CEU, residentes norte-americanos com ancestralidade do norte e oeste europeus) e negroides (YRI, yoruba de Ibadan, Nigéria) revelou, para homens de ancestralidade europeia, distorção na transmissão de uma região de 730 kb em 6p21.1, sintênica ao cromossomo 17 de *Mus musculus* (Santos *et al.*, 2009).

Também a partir de dados do projeto HapMap, mais precisamente de trios CEU e YRI, Deng *et al.* (2009) identificaram diversos locos ao longo do genoma, cujas razões de transmissão de alelos em heterozigose diferiam significativamente da proporção mendeliana 50:50 (sobretudo, na transmissão paterna). Ainda, os resultados obtidos para o grupo CEU são distintos dos apresentados pelos indivíduos YRI, o que sugere que as regiões sujeitas a desvio de segregação podem variar, a depender da ancestralidade do grupo estudado.

Neste trabalho, utilizamos DNA de células gaméticas masculinas provenientes de dez indivíduos saudáveis, previamente separadas segundo sua motilidade em gradiente de densidade. A partir de duas subpopulações, compostas por espermatozoides lentos e rápidos, calculamos as frequências alélicas de locos em heterozigose. Os valores assim obtidos foram, a seguir, comparados, a fim de se identificar regiões genômicas sujeitas à distorção de segregação e que podem vir a originar progênie com proporções genotípicas distintas das previsões mendelianas.

Dessa maneira, foi possível identificar SNPs (do inglês: *Single Nucleotide Polymorphism*) cujas frequências alélicas, após comparação entre células gaméticas lentas e rápidas, apresentaram diferença estatisticamente significativa.

Interessantemente, alguns desses polimorfismos encontram-se em genes previamente associados a processos relacionados ao espermatozoide, como a reação acrossômica e a motilidade: é o caso de *PDE1C* e *PDE4D* (Fisch *et al.*, 1998; Dimitriadis *et al.*, 2008).

2. Material e métodos

2.1. Coleta e análise das amostras de sêmen fresco

Após a assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido, amostras de sêmen fresco de dez indivíduos foram coletadas em frasco de polipropileno e colocadas em placa aquecida a 37°C por tempo que variou entre 20 e 30 minutos para liquefação, processo este que se deve à ação de proteases prostáticas.

Prosseguiu-se, então, às análises macroscópica e microscópica de cada uma das amostras, nas quais foram avaliados parâmetros como a coagulação, a liquefação, a coloração e a viscosidade, bem como a concentração de espermatozoides no ejaculado e seu grau de motilidade.

2.2. Seleção de espermatozoides por centrifugação em gradiente de densidade

Em tubo de polipropileno de 15 mL, foi preparada uma coluna composta por duas camadas (cada uma com 1 mL) de meio de processamento de espermatozoides com diferentes densidades. Utilizou-se, para tanto, o ISolate® (*Irvine Scientific*, número de catálogo 99264) *lower* e *upper*, cujas densidades são, respectivamente, 90% e 50%.

Sobre a coluna assim constituída, adicionaram-se 2 mL do ejaculado e a preparação foi submetida à centrifugação a 260 x g (1200 rpm) por 20 minutos.

Após essa etapa, o volume de 100 µL foi retirado da interface entre as duas camadas, onde estão presentes os espermatozoides com menor motilidade, para posterior extração de DNA.

A seguir, a coluna foi cuidadosamente aspirada e, para a lavagem do *pellet*, onde estão contidas as células espermáticas com maior motilidade (ou seja, aquelas com maiores chances de concluir a fertilização), foram adicionados 5 mL de meio HTF (*Human Tubal Fluid*) modificado com gentamicina – HEPES (*Irvine Scientific*, número de catálogo 90126) suplementado com SSS 10% (*Serum Substitute Supplement*, *Irvine*

Scientific, número de catálogo 99193). Realizou-se uma nova centrifugação (260 x g – 1200 rpm) por 10 minutos.

Por fim, o meio foi retirado deixando-se aproximadamente 0,5 mL para a ressuspensão do *pellet*, que também foi submetido à extração de DNA.

2.3. Isolamento de DNA genômico a partir de espermatozoides

Para cada doador, três diferentes amostras foram submetidas à extração de DNA: o sêmen total, assim como as subpopulações de espermatozoides lentos e rápidos. Inicialmente, foram adicionados 200 µL a 250 µL de sêmen fresco total (ou o volume recuperado segundo o item 2.2 do presente capítulo) a 10 mL de tampão 1 em um tubo de centrífuga Corex[®], que, a seguir, foi agitado em vortex à velocidade máxima durante 10 segundos; a amostra foi então centrifugada a 1500 x g (3200 rpm) por 10 minutos; o sobrenadante foi removido deixando aproximadamente 1 mL de tampão 1 e *pellet*; este conteúdo foi agitado em vortex à velocidade máxima por 10 segundos e posteriormente transferido para um tubo de microcentrífuga de 2,0 mL; para coletar as células que eventualmente estivessem aderidas à sua parede, adicionou-se 0,5 mL de tampão 1 ao tubo Corex[®], que foi agitado em vortex à velocidade máxima por 10 segundos; tal conteúdo também foi transferido para o tubo de microcentrífuga de 2,0 mL, que foi então centrifugado a 9700 x g (12000 rpm) por 2 minutos; o sobrenadante foi removido sem perturbar o *pellet*, que foi ressuspensão em 300 µL de tampão 2; a seguir, foram adicionados 10 µL de proteinase K (10 mg/mL) e a amostra foi incubada a 55°C por 2 horas (a inversão do tubo foi feita a cada 25 minutos, aproximadamente, para a dispersão da amostra); ao fim deste período, foram adicionados mais 2 µL de proteinase K (10 mg/mL) e a incubação foi repetida (55°C, 2 horas), bem como as inversões a cada 25 minutos; a seguir, foram adicionados 400 µL de *buffer AL*^{*} e 400 µL de etanol 100% à amostra, que foi agitada em vortex e cuidadosamente aplicada à coluna de purificação^{*}, acoplada a um tubo coletor^{*}; o conjunto foi centrifugado a 8100 x g (11000 rpm) por 1 minuto; o filtrado

foi descartado e a coluna foi acoplada a um novo tubo coletor^{*}; foram adicionados 500 µL de *buffer* AW1^{*} à coluna e o conjunto foi novamente centrifugado a 8100 x g (11000 rpm) por 1 minuto; o filtrado foi descartado e outra lavagem foi feita adicionando-se 500 µL de *buffer* AW2^{*} à coluna, que foi, mais uma vez, centrifugada (13200 x g – 14000 rpm, 3 minutos); o filtrado foi novamente descartado e a centrifugação anterior foi repetida por 1 minuto em tubo de microcentrífuga de 2,0 mL para garantir a ausência de *buffer* AW2 na coluna de purificação; por fim, um tubo de microcentrífuga de 1,5 mL foi acoplado à coluna de purificação, à qual foram adicionados 50 µL a 100 µL de TE⁻⁴; após 5 minutos de incubação à temperatura ambiente, o conjunto foi centrifugado a 8100 x g (11000 rpm) por 1 minuto e o material coletado foi estocado a -20°C.

Tampão 1:

150 mM NaCl

10 mM EDTA (pH = 8,0)

Tampão 2:

100 mM Tris HCl (pH = 8,0)

10 mM EDTA

500 mM NaCl

1% SDS

2% β-mercaptoetanol

* parte integrante do kit de purificação *QIAamp® DNA Mini Kit* (QIAGEN®) (número de catálogo 51304).

2.4. Amplificação inicial do DNA genômico

O DNA obtido em etapa anterior e quantificado em espectrofotômetro (NanoDrop® *ND-1000*) foi amplificado antes de terem início os experimentos seguintes.

Utilizou-se, para tanto, DNA polimerase Φ 29 e *random primers*, componentes do kit comercialmente disponível *illustra™ GenomiPhi™ V2 DNA Amplification* (GE Healthcare, número de catálogo 25-6600-30).

A amplificação em questão é reponsável pela síntese de fragmentos de DNA com extensão média superior a 10 kb e favorece a representação uniforme das sequências. Além disso, a atividade de exonuclease 3' → 5' da enzima empregada resulta em baixas taxas de erro (entre 10^{-5} e 10^{-6}) (Paez *et al.*, 2004).

As condições de reação usadas basearam-se no protocolo geral fornecido pelo fabricante.

2.5. Genotipagem pela técnica de *microarray*

As amostras de DNA obtidas de espermatozoides e previamente amplificadas foram genotipadas utilizando-se a técnica de *microarray* (Affymetrix GeneChip® Mapping 100K Array set).

Para tanto, 250 ng de DNA genômico total foram submetidos à digestão com as enzimas de restrição *HindIII* (números de catálogo 900523 e 900521) e *XbaI* (números de catálogo 900518 e 900520), procedendo-se, a seguir, à ligação de adaptadores que reconhecem as extremidades dos produtos digeridos, independentemente de seus tamanhos.

A seguir, a preparação foi submetida à amplificação por PCR com um *primer* genérico, capaz de reconhecer a sequência dos adaptadores. Nesta reação, ocorre a amplificação preferencial de fragmentos cujos tamanhos variam entre 250 pb e 2000 pb.

O DNA amplificado foi então fragmentado, marcado e hibridado em dois *chips* – um para cada uma das enzimas de restrição utilizadas –, contendo sondas referentes ao total de 116.204 SNPs, espaçados por uma distância média de 23,6 kb. As sondas são oligonucleotídeos com 25 pb, os quais podem corresponder exatamente ao complemento da sequência testada (onde haverá hibridação perfeita) ou a uma

sequência contendo um *mismatch* no 13º nucleotídeo; por esse motivo, são denominadas sondas *perfect match* (PM) e *mismatch* (MM), respectivamente.

Após a hibridação, os dados de intensidade das sondas PM e MM de cada um dos alelos foram gerados pelo programa GCOS (*Affymetrix GeneChip® Operating System*) e posteriormente analisados pelo programa GTYPE (*Affymetrix GeneChip® Genotyping Analysis*), que os converte em dados de genotipagem.

2.6. Cálculo das frequências alélicas

Os valores de intensidades de sondas foram utilizados para o cálculo da variável sinal relativo do alelo (RAS, do inglês: *relative allele signal*), uma medida da intensidade das sondas PM para ambos os alelos de um SNP. Como isso não é feito pelo algoritmo de mapeamento DM (*Dynamic Modelling*) empregado para o conjunto de 100K, geramos os valores de RAS manualmente, segundo o algoritmo *Modified Partitioning Around Medoids* (MPAM) (anexo I, pp. 86-88).

A partir do valor médio de RAS (RAS_{av}), corrigido pelo valor de k correspondente a cada SNP estudado, obtivemos as respectivas frequências alélicas. Tal correção faz-se necessária dado que, em um indivíduo heterozigoto, há intensidade de fluorescência diferencial para as sondas de cada um dos dois alelos, demonstrando que uma única base diferente na sequência de 25 nucleotídeos é suficiente para alterar a cinética da reação de hibridação.

Os valores de k foram estimados com base nos dados disponíveis em <http://cogent.iop.kcl.ac.uk/rcorrection.cogx>, como consta no anexo II (p. 89) (Simpson *et al.*, 2005; Meaburn *et al.*, 2006).

2.7. Análise dos dados

Para a identificação de regiões do genoma sujeitas a desvio de segregação, foram analisadas somente as frequências alélicas correspondentes a SNPs que se apresentaram em heterozigose nas amostras de sêmen total dos dez indivíduos, uma

vez que polimorfismos em homozigose não nos permitem avaliar a ocorrência de distorção. Além disso, o reconhecimento dos locos em heterozigose não foi feito com base nas amostras de sêmen submetidas à seleção por motilidade devido ao fato de que casos extremos de desvio de segregação podem originar genótipos homozigotos, que, por conseguinte, não seriam incluídos em nossa análise.

Inicialmente, foram constituídos 45 diferentes conjuntos, oriundos da combinação dos dez indivíduos, oito a oito [$C_{10,8} = 10!/(8!2!) = 45$], com o objetivo de maximizar o número de SNPs em heterozigose a serem examinados (Figura 3.1, p. 74). Para cada um dos grupos, procedeu-se, então, à comparação das diferenças entre as frequências alélicas obtidas para as subpopulações de espermatozoides lentos e rápidos, utilizando-se, para tanto, o teste não-paramétrico de Wilcoxon, descrito na listagem do programa-fonte no anexo III (pp. 90-91).

Essa estratégia redundou na realização de mais de 4000 testes de Wilcoxon. Com a finalidade de verificarmos se no conjunto total de SNPs existia uma diferença entre as frequências alélicas de cada loco entre espermatozoides lentos e rápidos, foi computado o número de testes que originaram resultados significativos: se a frequência observada desses testes for (estatisticamente) maior que 5%, concluir-se-á que existe um desvio de segregação global. Essa estratégia contorna a necessidade de correção do nível crítico de significância estatística de massas enormes de testes realizados numa mesma amostra, assunto ainda controverso na literatura.

Mesmo na hipótese (improvável) de que isso venha a ocorrer, pretende-se verificar se os resultados significativos (aos níveis de 5%, 2% e 1%) correspondem a regiões do genoma que contêm genes sabidamente associados a funções desempenhadas pelos espermatozoides.

3. Resultados

As amostras de sêmen dos dez indivíduos, após as análises macroscópica e microscópica, apresentaram características qualitativas e quantitativas dentro dos padrões de normalidade, de acordo com a Organização Mundial da Saúde, ficando, assim, confirmada a condição de normozoospermia (*WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen – fifth edition, 2010*; disponível em <http://www.who.int/topics/infertility/en/>). Esses dados são mostrados na tabela 3.1 (p. 76).

Analisando-se os 45 grupos combinatórios de oito indivíduos cada, que resultaram na realização de 4612 testes, identificamos 88 SNPs dispersos ao longo do genoma, cujas diferenças entre as frequências alélicas obtidas para as subpopulações de espermatozoides lentos e rápidos mostraram-se estatisticamente significantes ao nível de 5% ou menos, segundo o teste de Wilcoxon (tabela 3.2, pp. 77-79). Tais resultados evidenciam a ausência de um desvio de segregação global.

Dentre os 88 polimorfismos citados, 41 deles estão localizados em regiões intergênicas, ao passo que o restante encontra-se em genes codificadores de proteínas (45), de sequência precursora de microRNA (1) ou de RNA antisense (1) (Figura 3.2, p. 75).

Esses achados sugerem que há um enriquecimento de SNPs intragênicos em nossos resultados, com probabilidade $p < 0,01$, calculada a partir da distribuição qui-quadrado (1 grau de liberdade), comparando-se o número de SNPs intragênicos presentes nos *chips* utilizados – 45556 (39,2% do total) – e os valores obtidos em nossos experimentos – 47 (53,4% do total).

Interessantemente, um dos polimorfismos identificados no cromossomo 15 localiza-se em 15q21.3, região já associada ao desvio de segregação em humanos (Zöllner *et al.*, 2004).

Observamos também que, em nossos resultados, há diferentes SNPs localizados dentro de um mesmo gene, como é o caso de *SYT14* (cromossomo 1),

STK39 (cromossomo 2), *PDE4D* (cromossomo 5), *CNTNAP2* (cromossomo 7) e *GLDN* (cromossomo 15) (tabela 3.2, pp. 77-79).

Além disso, utilizando-se o aplicativo AmiGO (versão 1.7), disponível em <http://amigo.geneontology.org> (Carbon *et al.*, 2009), foi possível identificar que 5 entre os 11 genes codificadores de proteínas contendo SNPs com os menores valores de p apresentam categorias que os associam ao citoesqueleto. Os dados de ontologia também sugerem que o produto codificado por *FMN2* participa de importantes processos ligados à meiose, como, por exemplo, a localização do fuso e a movimentação cromossômica em direção aos pólos (tabela 3.3, pp. 80-81).

Ainda na tabela 3.3, que reúne os polimorfismos com $p < 0,01$, estão presentes *PDE1C* e *PDE4D*, que codificam fosfodiesterases já associadas a processos desempenhados pelas células gaméticas masculinas em estudos prévios (Fisch *et al.*, 1998; Dimitriadis *et al.*, 2008).

4. Discussão

Realizamos a comparação das frequências alélicas de locos em heterozigose entre duas subpopulações de espermatozoides humanos, separadas de acordo com sua motilidade, a qual está evidentemente relacionada ao processo de fertilização.

Neste estudo, foram encontrados 88 SNPs cujas frequências alélicas apresentaram diferenças estatisticamente significantes (ao nível de 5% ou menos) entre os subgrupos analisados. Estas variantes estão distribuídas ao longo do genoma, corroborando evidências prévias de que o desvio de segregação em humanos não se restringe a algumas poucas regiões cromossômicas (Zöllner *et al.*, 2004; Deng *et al.* 2009). Nossa investigação também revelou que um destes polimorfismos localiza-se em 15q21.3, região à qual, anteriormente, foi atribuída máxima chance de ocorrência de desvio de segregação (Zöllner *et al.*, 2004).

A probabilidade global de erro do tipo I, ou seja, de resultados falso-positivos, não foi controlada por qualquer correção, como, por exemplo, a baseada na desigualdade de Bonferroni, uma vez que o importante na estratégia acima delineada era selecionar os locos associados aos menores valores de p dos testes.

O número de polimorfismos intragênicos detectados, significativamente superior ao esperado sob hipótese nula de segregação mendeliana, sugere que a distribuição desses dados não se dá ao acaso ($p < 0,01$). Além disso, a presença de dois ou mais SNPs dentro de um mesmo gene (como ocorre em *SYT14*, *STK39*, *PDE4D*, *CNTNAP2* e *GLDN*) reforça a hipótese de que as regiões identificadas neste estudo estão diferencialmente representadas entre as duas subpopulações de espermatozoides testadas.

Os polimorfismos associados aos menores valores de p , por sua vez, parecem estar concentrados predominantemente em genes que apresentam associação com o citoesqueleto, segundo as categorias GO; é o caso de *CTTNBP2NL*, *FMN2*, *PALLD*, *PDE4D* e *PAK1* (tabela 3.3, pp. 80-81).

Particularmente, a actina desempenha importante papel na movimentação das células germinativas, no transporte de vesículas e na modificação nuclear que tem lugar durante a espermatogênese (Fouquet *et al.*, 2000; Kierszenbaum, 2002; Kierszenbaum e Tres, 2004; Sun *et al.*, 2010), assim como ao longo da oogênese. Por exemplo, *FMN2* (*Formin 2*), cujo produto proteico é a formina 2, expressa-se preferencialmente no sistema nervoso, mas também está presente em testículos e em ovários (Leader e Leder, 2000). Importante para a constituição inicial (nucleação) dos filamentos de actina, essa proteína controla, nos oócitos de camundongos, a primeira migração do fuso meiotico em direção ao córtex, a citocinese e a extrusão do primeiro corpúsculo polar, mas não participa da segregação cromossômica (Dumont *et al.*, 2007; Goode e Eck, 2007).

Já *CNTNAP2* (*Contactin associated protein-like 2*), que codifica um membro da família das neurexinas, foi anteriormente associado à predisposição a doenças do espectro autista (MIM 209850), entre outros distúrbios (Alarcón *et al.*, 2008; Arking *et al.*, 2008; Bakaloglu *et al.*, 2008). Até o presente momento, não há indícios de que as variantes de suscetibilidade encontradas nesse gene apresentem transmissão majoritariamente paterna.

Ainda entre os genes que contêm os polimorfismos com menores valores de *p* encontram-se *PDE1C* (*Phosphodiesterase 1C*) e *PDE4D* (*Phosphodiesterase 4D*), responsáveis por codificar fosfodiesterases reguladoras da sinalização intracelular mediada por GMPc e AMPc e, por conseguinte, coadjuvantes nos processos de reação acrossômica e de motilidade espermática, respectivamente (Fisch *et al.*, 1998; Dimitriadis *et al.*, 2008).

O SNP rs702543 (G>A) identificado em *PDE4D* foi previamente associado ao neuroticismo, traço de personalidade ligado ao início e à recorrência de episódios de depressão maior, bem como a sintomas de depressão e de ansiedade na população geral (Shifman *et al.*, 2008), mas não há relatos de transmissão preferencial paterna em tais distúrbios.

Mais especificamente, o alelo G do polimorfismo acima é responsável pela criação de um suposto elemento de resposta ao AMPc (CRE) (sequência TGACGTTA) por meio da ligação do heterodímero cJun/CREB2 (Benbrook e Jones, 1994), o que não ocorre na presença do alelo A; isso pode alterar a transcrição de diferentes isoformas de *PDE4D*, uma vez que este evento é regulado pelos níveis do nucleotídeo cíclico em questão, como ocorre com a isoforma *PDE4D5* (Le Jeune *et al.*, 2002).

Em nossos experimentos, o alelo G do SNP rs702543 foi encontrado com maior frequência na subpopulação de células gaméticas com menor motilidade, o que estaria associado à ativação transcricional de isoformas de *PDE4D*, levando à maior degradação de AMPc e, conseqüentemente, à redução da movimentação espermática. Em contrapartida, o alelo A, capaz de abolir a ativação transcricional de determinadas isoformas do gene em questão e, portanto, associado a níveis mais baixos de degradação de AMPc, apresentou maior frequência no subgrupo de células com maior motilidade.

Em vista do exposto acima, concluímos que a estratégia desenvolvida no presente trabalho possibilitou a identificação de regiões do genoma que não estão igualmente representadas entre espermatozoides com desempenhos diferentes em relação à movimentação celular. A consequência disso seriam progênies com proporção genotípica diversa da predição mendeliana, caracterizando o que denominamos desvio de segregação, evento biológico pouco conhecido na espécie humana.

Figuras

		Número da combinação																																																										
Indivíduo		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40	41	42	43	44	45														
1		■	■	■	■	■	■	■	■			■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■									
2		■	■	■	■	■	■	■			■		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■							
3		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■						
4		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■					
5		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■				
6		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■			
7		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■		
8		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
9		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	
10		■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■	■

Figura 3.1: Constituição das 45 combinações de dez indivíduos, oito a oito (em azul, indivíduos que foram incluídos na combinação indicada). Para cada um dos grupos, foram comparadas as frequências alélicas de SNPs em heterozigose entre as subpopulações de espermatozoides lentos e rápidos.

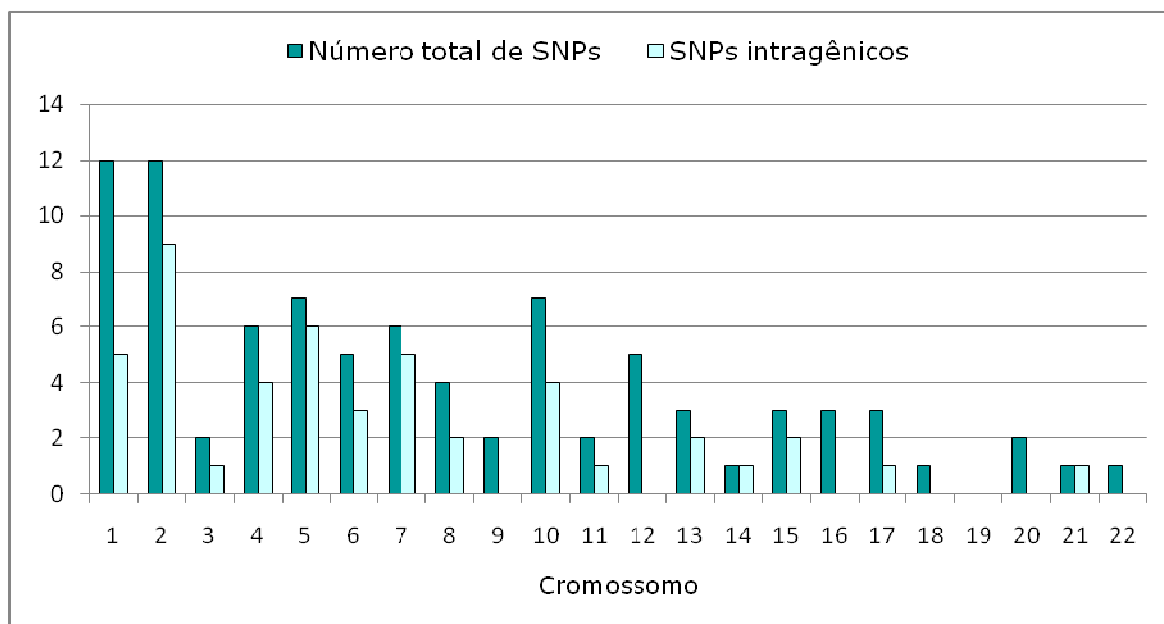


Figura 3.2: Distribuição dos SNPs cujos valores de p são inferiores a 0,05, evidenciando o grande número de polimorfismos intragênicos ($p < 0,01$).

Tabelas

Tabela 3.1: Análises qualitativa e quantitativa das amostras de sêmen dos dez indivíduos estudados

(V.R.: valores referenciais seguidos dos respectivos intervalos de confiança – 95%; fonte: *World Health Organization*)**PR**: espermatozoides com motilidade progressiva; **NP**: espermatozoides com motilidade não-progressiva.

Amostra	Idade	Análise macroscópica				Análise microscópica		
		Coagulação	Liquefação (≤ 30min)	Coloração	Viscosidade	Concentração de espermatozoides total no ejaculado (V.R.: 39.10^{-6} ; 33.10^{-6} - 46.10^{-6})	PR + NP Motilidade total (V.R.: 40%; 38%-42%)	PR Motilidade progressiva (V.R.: 32%; 31%-34%)
1	39	+	+	cinza-opalescente	normal	686,0	40	31
2	29	+	+	cinza-opalescente	normal	350,0	76	72
3	46	+	+	cinza-opalescente	normal	103,5	75	64
4	38	+	+	cinza-opalescente	normal	88,0	76	74
5	45	+	+	cinza-opalescente	normal	156,6	65	59
6	40	+	+	cinza-opalescente	normal	85,0	74	67
7	39	+	+	cinza-opalescente	normal	250,0	70	64
8	40	+	+	cinza-opalescente	normal	280,0	68	61
9	38	+	+	cinza-opalescente	normal	72,0	67	63
10	40	+	+	cinza-opalescente	normal	380,0	75	68
Média	39,4	–	–	–	–	245,1	68,6	62,3
Desvio padrão	4,6	–	–	–	–	192,4	10,8	11,9

Tabela 3.2: SNPs com valores de p inferiores a 0,05 e suas localizações. Em destaque: genes que contêm dois ou mais polimorfismos com valores de p significantes.

Nome ⁽¹⁾	Cromossomo	Banda	Mapa físico (pb) ⁽²⁾	Classe	Informação	p
rs10493611	1	p31.1	79150307	intergênico	–	0,01
rs10493718	1	p31.1	83062933	intergênico	–	<0,01
rs519244	1	p22.2	91903413	intergênico	–	0,02< p <0,05
rs4908087	1	p21.2	101088594	intergênico	–	0,01
rs1928322	1	p21.1	104775597	intergênico	–	0,02
rs3806446	1	p13.2	111832291	intergênico	–	0,02< p <0,05
rs2483328	1	p13.2	112960192	intragênico	<i>CTTNBP2NL</i>	<0,01
rs726706	1	q31.1	186872454	intragênico	<i>PLA2G4A</i>	0,02< p <0,05
rs227229	1	q32.2	210198888	intragênico	<i>SYT14</i>	<0,01
rs227193	1	q32.2	210212424	intragênico	<i>SYT14</i>	0,01
rs1515656	1	q42.3	235017637	intergênico	–	0,01
rs10495468	1	q43	240562391	intragênico	<i>FMN2</i>	<0,01
rs300780	2	p25.3	110819	intergênico	–	<0,01
rs2345181	2	p21	46055108	intragênico	<i>PRKCE</i>	0,01
rs6713506	2	p16.3	48038331	intragênico	<i>FBXO11</i>	0,02< p <0,05
rs720201	2	p15	61376463	intragênico	<i>C2orf74</i>	0,01
rs811526	2	p12	79227099	intergênico	–	0,02< p <0,05
rs1881002	2	q21.1	132089694	intragênico	<i>PLEKHB2</i>	0,01
rs10496861	2	q22.1	141689077	intragênico	<i>LRP1B</i>	0,01
rs10497220	2	q24.2	161765681	intergênico	–	0,02< p <0,05
rs10497333	2	q24.3	168841469	intragênico	<i>STK39</i>	0,02
rs4667996	2	q24.3	168853556	intragênico	<i>STK39</i>	0,01
rs4674719	2	q36.1	223763991	intragênico	<i>ACSL3</i>	0,02< p <0,05
rs2317299	2	q37.2	236903093	intragênico	<i>AGAP1</i>	0,02< p <0,05
rs10510929	3	p14.1	64734036	intragênico	<i>MIR548A2</i>	<0,01
rs6805801	3	q13.13	110490001	intergênico	–	0,02< p <0,05
rs1842160	4	p15.33	12246716	intragênico	<i>BC042433</i>	0,02< p <0,05
rs2345044	4	q13.1	62647756	intragênico	<i>LPHN3</i>	0,02
rs7674285	4	q13.1	65750033	intergênico	–	0,02< p <0,05
rs1376093	4	q28.3	139499942	intergênico	–	0,01
rs10518000	4	q32.3	169429077	intragênico	<i>PALLD</i>	<0,01
rs836307	4	q34.1	173141604	intragênico	<i>GALNTL6</i>	0,02
rs1384732	5	p12	45553387	intragênico	<i>HCN1</i>	0,02< p <0,05
rs702543	5	q11.2	58842774	intragênico	<i>PDE4D</i>	<0,01
rs1370230	5	q12.1	58957641	intragênico	<i>PDE4D</i>	<0,01
rs10514857	5	q12.1	59048722	intragênico	<i>PDE4D</i>	0,01
rs1643657	5	q14.1	79936417	intragênico	<i>DHFR</i>	0,02< p <0,05
rs38032	5	q15	96321887	intragênico	<i>LNPEP</i>	0,02< p <0,05
rs2725107	5	q21.1	100031644	intergênico	–	0,02

Tabela 3.2 - continuação

Nome ⁽¹⁾	Cromossomo	Banda	Mapa físico (pb) ⁽²⁾	Classe	Informação	<i>p</i>
rs10484312	6	p25.1	5557149	intragênico	<i>FARS2</i>	0,01
rs554653	6	p25.1	6547487	intragênico	<i>LY86AS</i>	<0,01
rs2395360	6	p21.32	33102536	intergênico	–	0,02< <i>p</i> <0,05
rs10484578	6	p21.31	35246319	intragênico	<i>ZNF26</i>	0,01
rs1462475	6	q14.1	77570661	intergênico	–	0,01
rs215599	7	p14.3	32330129	intragênico	<i>PDE1C</i>	<0,01
rs929351	7	q21.11	81857893	intragênico	<i>CACNA2D1</i>	0,02< <i>p</i> <0,05
rs10487806	7	q31.32	123314446	intergênico	–	0,02< <i>p</i> <0,05
rs717171	7	q35	146367793	intragênico	<i>CNTNAP2</i>	0,02
rs2642484	7	q35	146389007	intragênico	<i>CNTNAP2</i>	<0,01
rs2642483	7	q35	146389259	intragênico	<i>CNTNAP2</i>	0,02< <i>p</i> <0,05
rs2472240	8	p23.1	6837233	intragênico	<i>DEFA1B</i>	0,02< <i>p</i> <0,05
rs973548	8	q12.1	57416402	intragênico	<i>AX747062</i>	0,02< <i>p</i> <0,05
rs1021156	8	q21.12	79575804	intergênico	–	0,02< <i>p</i> <0,05
rs1429677	8	q23.1	107043545	intergênico	–	0,02< <i>p</i> <0,05
rs7869558	9	p21.1	29348582	intergênico	–	0,02
rs1004358	9	q31.1	106966367	intergênico	–	<0,01
rs1409392	10	p13	14621153	intragênico	<i>FAM107B</i>	0,02
rs1148259	10	p11.21	37508450	intragênico	<i>ANKRD30A</i>	0,02< <i>p</i> <0,05
rs1200821	10	p11.21	37559580	intergênico	–	0,02
rs10508976	10	q21.1	54632299	intergênico	–	0,02
rs10509036	10	q21.1	57370239	intragênico	<i>PCDH15</i>	<0,01
rs303499	10	q23.31	90553051	intergênico	–	0,02< <i>p</i> <0,05
rs2254391	10	q23.32	93018045	intragênico	<i>PCGF5</i>	0,02< <i>p</i> <0,05
rs2583130	11	p15.2	13103771	intergênico	–	0,01
rs2729747	11	q13.5	77098479	intragênico	<i>PAK1</i>	<0,01
rs3852567	12	p12.3	16339333	intergênico	–	0,02
rs261925	12	p12.1	22870109	intergênico	–	0,02< <i>p</i> <0,05
rs1429630	12	p11.22	30422849	intergênico	–	0,01
rs2613895	12	q21.1	74938048	intergênico	–	0,02
rs10507272	12	q24.22	117123376	intergênico	–	0,02
rs2133813	13	q12.13	27199422	intragênico	<i>WASF3</i>	0,02< <i>p</i> <0,05
rs7334245	13	q13.3	36647153	intragênico	<i>DCLK1</i>	0,02< <i>p</i> <0,05
rs1020036	13	q21.1	55827954	intergênico	–	0,02
rs2024863	14	q32.13	95923670	intragênico	<i>C14orf49</i>	0,02

Tabela 3.2 – continuação

Nome ⁽¹⁾	Cromossomo	Banda	Mapa físico (pb) ⁽²⁾	Classe	Informação	<i>p</i>
rs7175922	15	q21.2	51646737	intragênico	<i>GLDN</i>	<0,01
rs2446405	15	q21.2	51646793	intragênico	<i>GLDN</i>	0,02
rs750486	15	q21.3	53616984	intergênico	–	0,01
rs3883208	16	p13.11	14906658	intergênico	–	<0,01
rs1911064	16	p11.2	32504028	intergênico	–	0,02< <i>p</i> <0,05
rs7500098	16	p11.2	33535916	intergênico	–	<0,01
rs163380	17	p12	15583356	intragênico	<i>TRIM16</i>	0,02< <i>p</i> <0,05
rs1684660	17	q21.31	42108351	intergênico	–	<0,01
rs2411127	17	q25.3	75572551	intergênico	–	<0,01
rs931850	18	q21.33	61393834	intergênico	–	0,01
rs6086141	20	p12.3	7622826	intergênico	–	0,01
rs2380063	20	p11.1	26207905	intergênico	–	<0,01
rs212156	21	p11.1	11018113	intragênico	<i>BAGE2</i>	<0,01
rs459310	22	q12.2	29819081	intergênico	–	0,02< <i>p</i> <0,05

⁽¹⁾ dbSNP build 131⁽²⁾ <http://genome.ucsc.edu/> - assembly Feb.2009 (GRCh37/hg19)

Tabela 3.3: Genes onde se encontram SNPs com valores de *p* inferiores a 0,01 e suas respectivas categorias GO (AmiGO versão 1.7).

Nome ⁽¹⁾	Localização	Posição física (pb) ⁽²⁾	Informação adicional	Processo biológico (GO)	Componente celular (GO)	Função molecular (GO)
rs10493718	1p31.1	83062933	–	–	–	–
rs2483328	1p13.2	112960192	<i>CTTNBP2NL - Homo sapiens CTTNBP2 N-terminal like (CTTNBP2NL)</i>	–	citoesqueleto de actina	ligação à proteína
rs227229	1q32.2	210198888	<i>SYT14 - Homo sapiens synaptotagmin XIV (SYT14)</i>	–	integral à membrana	–
rs10495468	1q43	240562391	<i>FMN2 - Homo sapiens formin 2 (FMN2)</i>	organização do citoesqueleto de actina; localização do fuso meiotico; movimentação dos cromossomo em direção aos pólos durante a meiose; metáfase I; oogênese; extrusão do corpúsculo polar após as divisões meioticas	–	ligação à actina
rs300780	2p25.3	110819	–	–	–	–
rs10510929	3p14.1	64734036	<i>MIR548A2 - Homo sapiens microRNA 548a-2 (MIR548A2)</i>	–	–	–
rs10518000	4q32.3	169429077	<i>PALLD - Homo sapiens palladin, cytoskeletal associated protein (PALLD)</i>	organização do citoesqueleto	adesão focal; citoesqueleto; junção celular; filamento de actina	ligação à actina; ligação à alfa-actinina muscular
rs702543	5q11.2	58842774	<i>PDE4D - Homo sapiens phosphodiesterase 4D, cAMP-specific (PDE4D)</i>	transdução de sinal	citoesqueleto; centro organizador de microtúbulo; membrana; citossol	atividade de fosfodiesterase de nucleotídeo cíclico 3'-5'; ligação a íon metálico
rs1370230	5q12.1	58957641	<i>PDE4D - Homo sapiens phosphodiesterase 4D, cAMP-specific (PDE4D)</i>			
rs554653	6p25.1	6547487	<i>LY86-AS1 - Homo sapiens LY86 antisense RNA (non-protein coding) (LY86AS)</i>	–	–	–

Tabela 3.3 - continuação

Nome ⁽¹⁾	Localização	Posição física (pb) ⁽²⁾	Informação adicional	Processo biológico (GO)	Componente celular (GO)	Função molecular (GO)
rs215599	7p14.3	32330129	<i>PDE1C - Homo sapiens phosphodiesterase 1C, calmodulin-dependent 70kDa (PDE1C)</i>	activação da fosfolipase C; via de sinalização intracelular; via de sinalização do receptor de NGF (<i>nerve growth factor</i>); transdução de sinal	citossol	ligação à calmodulina; atividade de fosfodiesterase (de nucleotídeo cíclico) calmodulina-dependente; ligação a íon metálico
rs2642484	7q35	146389007	<i>CNTNAP2 - Homo sapiens contactin associated protein-like 2 (CNTNAP2)</i>	comportamento; adesão celular; desenvolvimento encefálico; agrupamento de canais de potássio voltagem-dependentes; transdução de sinal	complexo de canais de potássio voltagem-dependentes; dendrito; axolema	ligação a receptor
rs1004358	9q31.1	106966367	-	-	-	-
rs10509036	10q21.1	57370239	<i>PCDH15 - protocadherin 15 isoform CD2-2 precursor</i>	adesão celular	-	ligação a íons cálcio
rs2729747	11q13.5	77098479	<i>PAK1 - Homo sapiens p21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1 (PAK1)</i>	organização do citoesqueleto; fosforilação de proteínas	adesão focal	ligação a ATP; ligação a colágeno; atividade de proteína serina-treonina quinase
rs7175922	15q21.2	51646737	<i>GLDN - Homo sapiens gliomedin (GLDN)</i>	diferenciação celular; sistema nervoso	integral à membrana	-
rs3883208	16p13.11	14906658	-	-	-	-
rs7500098	16p11.2	33535916	-	-	-	-
rs1684660	17q21.31	42108660	-	-	-	-
rs2411127	17q25.3	75572551	-	-	-	-
rs2380063	20p11.1	26207905	-	-	-	-
rs212156	21p11.1	11018113	<i>BAGE2 - Homo sapiens putative tyrosine phosphatase</i>	-	região extracelular	-

⁽¹⁾ dbSNP build 131⁽²⁾ <http://genome.ucsc.edu/> - assembly Feb.2009 (GRCh37/hg19)

Referências bibliográficas

Alarcón, M., Abrahams, B. S., Stone, J. L., Duvall, J. A., Perederiy, J. V., Bomar, J. M., Sebat, J., Wigler, M., Martin, C. L., Ledbetter, D. H., Nelson, S. F., Cantor, R. M. and Geschwind, D. H. (2008). "Linkage, association, and gene-expression analyses identify *CNTNAP2* as an autism-susceptibility gene." *Am J Hum Genet* **82**(1): 150-9.

Arking, D. E., Cutler, D. J., Brune, C. W., Teslovich, T. M., West, K., Ikeda, M., Rea, A., Guy, M., Lin, S., Cook, E. H. and Chakravarti, A. (2008). "A common genetic variant in the neurexin superfamily member *CNTNAP2* increases familial risk of autism." *Am J Hum Genet* **82**(1): 160-4.

Bakkaloglu, B., O'Roak, B. J., Louvi, A., Gupta, A. R., Abelson, J. F., Morgan, T. M., Chawarska, K., Klin, A., Ercan-Sencicek, A. G., Stillman, A. A., Tanriover, G., Abrahams, B. S., Duvall, J. A., Robbins, E. M., Geschwind, D. H., Biederer, T., Gunel, M., Lifton, R. P. and State, M. W. (2008). "Molecular cytogenetic analysis and resequencing of *contactin associated protein-like 2* in autism spectrum disorders." *Am J Hum Genet* **82**(1): 165-73.

Benbrook, D. M. and Jones, N. C. (1994). "Different binding specificities and transactivation of variant CRE's by CREB complexes." *Nucleic Acids Res* **22**(8): 1463-9.

Bettencourt, C., Santos, C., Kay, T., Vasconcelos, J. and Lima, M. (2008). "Analysis of segregation patterns in Machado-Joseph disease pedigrees." *J Hum Genet* **53**(10): 920-3.

Botta, A., Tacconelli, A., Bagni, I., Giardina, E., Bonifazi, E., Pietropolli, A., Clementi, M. and Novelli, G. (2005). "Transmission ratio distortion in the spinal muscular atrophy locus: data from 314 prenatal tests." *Neurology* **65**(10): 1631-5.

Carbon, S., Ireland, A., Mungall, C. J., Shu, S., Marshall, B. and Lewis, S. (2009). "AmiGO: online access to ontology and annotation data." *Bioinformatics* **25**(2): 288-9.

Deng, L., Zhang, D., Richards, E., Tang, X., Fang, J., Long, F. and Wang, Y. (2009). "Constructing an initial map of transmission distortion based on high density HapMap SNPs across the human autosomes." *J Genet Genomics* **36**(12): 703-9.

Dimitriadis, F., Giannakis, D., Pardalidis, N., Zikopoulos, K., Paraskevaïdis, E., Giotitsas, N., Kalaboki, V., Tsounapi, P., Baltogiannis, D., Georgiou, I., Saito, M., Watanabe, T., Miyagawa, I. and Sofikitis, N. (2008). "Effects of phosphodiesterase-5 inhibitors on sperm parameters and fertilizing capacity." Asian J Androl **10**(1): 115-33.

Dumont, J., Million, K., Sunderland, K., Rassinier, P., Lim, H., Leader, B. and Verlhac, M. H. (2007). "Formin-2 is required for spindle migration and for the late steps of cytokinesis in mouse oocytes." Dev Biol **301**(1): 254-65.

Fisch, J. D., Behr, B. and Conti, M. (1998). "Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: differential activation by type-specific phosphodiesterase inhibitors." Hum Reprod **13**(5): 1248-54.

Fouquet, J., Kann, M., Soues, S. and Melki, R. (2000). "ARP1 in Golgi organisation and attachment of manchette microtubules to the nucleus during mammalian spermatogenesis." J Cell Sci **113 (Pt 5)**: 877-86.

Goode, B. L. and Eck, M. J. (2007). "Mechanism and function of formins in the control of actin assembly." Annu Rev Biochem **76**: 593-627.

Iughetti, P., Otto, P. A., Zatz, M., Passos Bueno, M. R. and Marie, S. K. (1998). "Different behavior in the paternally vs. maternally inherited mutated allele in Brazilian Machado-Joseph (MJD1) families." Am J Med Genet **77**(3): 246-8.

Kierszenbaum, A. L. (2002). "Intramanchette transport (IMT): managing the making of the spermatid head, centrosome, and tail." Mol Reprod Dev **63**(1): 1-4.

Kierszenbaum, A. L. and Tres, L. L. (2004). "The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head." Arch Histol Cytol **67**(4): 271-84.

Le Jeune, I. R., Shepherd, M., Van Heeke, G., Houslay, M. D. and Hall, I. P. (2002). "Cyclic AMP-dependent transcriptional up-regulation of phosphodiesterase 4D5 in human airway smooth muscle cells. Identification and characterization of a novel PDE4D5 promoter." J Biol Chem **277**(39): 35980-9.

Leader, B. and Leder, P. (2000). "Formin-2, a novel formin homology protein of the cappuccino subfamily, is highly expressed in the developing and adult central nervous system." Mech Dev **93**(1-2): 221-31.

Lyon, M. F. (2003). "Transmission ratio distortion in mice." Annu Rev Genet **37**: 393-408.

Lyttle, T. W. (1991). "Segregation distorters." Annu Rev Genet **25**: 511-57.

Meaburn, E., Butcher, L. M., Schalkwyk, L. C. and Plomin, R. (2006). "Genotyping pooled DNA using 100K SNP microarrays: a step towards genomewide association scans." Nucleic Acids Res **34**(4): e27.

Paez, J. G., Lin, M., Beroukhim, R., Lee, J. C., Zhao, X., Richter, D. J., Gabriel, S., Herman, P., Sasaki, H., Altshuler, D., Li, C., Meyerson, M. and Sellers, W. R. (2004). "Genome coverage and sequence fidelity of phi29 polymerase-based multiple strand displacement whole genome amplification." Nucleic Acids Res **32**(9): e71.

Pardo-Manuel de Villena, F. and Sapienza, C. (2001). "Nonrandom segregation during meiosis: the unfairness of females." Mamm Genome **12**(5): 331-9.

Santos, P. S., Hohne, J., Schlattmann, P., Konig, I. R., Ziegler, A., Uchanska-Ziegler, B. and Ziegler, A. (2009). "Assessment of transmission distortion on chromosome 6p in healthy individuals using tagSNPs." Eur J Hum Genet **17**(9): 1182-9.

Shifman, S., Bhomra, A., Smiley, S., Wray, N. R., James, M. R., Martin, N. G., Hetteema, J. M., An, S. S., Neale, M. C., van den Oord, E. J., Kendler, K. S., Chen, X., Boomsma, D. I., Middeldorp, C. M., Hottenga, J. J., Slagboom, P. E. and Flint, J. (2008). "A whole genome association study of neuroticism using DNA pooling." Mol Psychiatry **13**(3): 302-12.

Simpson, C. L., Knight, J., Butcher, L. M., Hansen, V. K., Meaburn, E., Schalkwyk, L. C., Craig, I. W., Powell, J. F., Sham, P. C. and Al-Chalabi, A. (2005). "A central resource for accurate allele frequency estimation from pooled DNA genotyped on DNA microarrays." Nucleic Acids Res **33**(3): e25.

Sun, X., Kovacs, T., Hu, Y. J. and Yang, W. X. "The role of actin and myosin during spermatogenesis." Mol Biol Rep. Published online: 24 november 2010.

Zatz, M., Cerqueira, A., Vainzof, M. and Passos-Bueno, M. R. (1997). "Segregation distortion of the CTG repeats at the myotonic dystrophy (DM) locus: new data from Brazilian DM families." J Med Genet **34**(9): 790-1.

Zöllner, S., Wen, X., Hanchard, N. A., Herbert, M. A., Ober, C. and Pritchard, J. K. (2004). "Evidence for extensive transmission distortion in the human genome." Am J Hum Genet **74**(1): 62-72.

Anexo I

Nesta seção, incluímos terminologias e definições utilizadas pelo algoritmo de mapeamento MPAM (*Modified Partitioning Around Medoids*), necessárias ao cálculo de RAS (*relative allele signal*) e, posteriormente, das frequências alélicas.

- **Célula-sonda** (*probe cell*, também denominada *feature*): diversas cópias de uma sonda (oligonucleotídeo com 25 pb) de sequência definida; pode ser classificada como *perfect match* (PM) ou *mismatch* (MM)

- **Quarteto de sondas** (*probe quartet*) **orientação senso**: composto por:

Sonda alelo A senso – *perfect match* A e *mismatch* A (denomina-se par de sondas A senso)

Sonda alelo B senso – *perfect match* B e *mismatch* B (denomina-se par de sondas B senso)

- **Quarteto de sondas** (*probe quartet*) **orientação antisenso**: composto por:

Sonda alelo A antisenso – *perfect match* A e *mismatch* A (denomina-se par de sondas A antisenso)

Sonda alelo B antisenso – *perfect match* B e *mismatch* B (denomina-se par de sondas B antisenso)

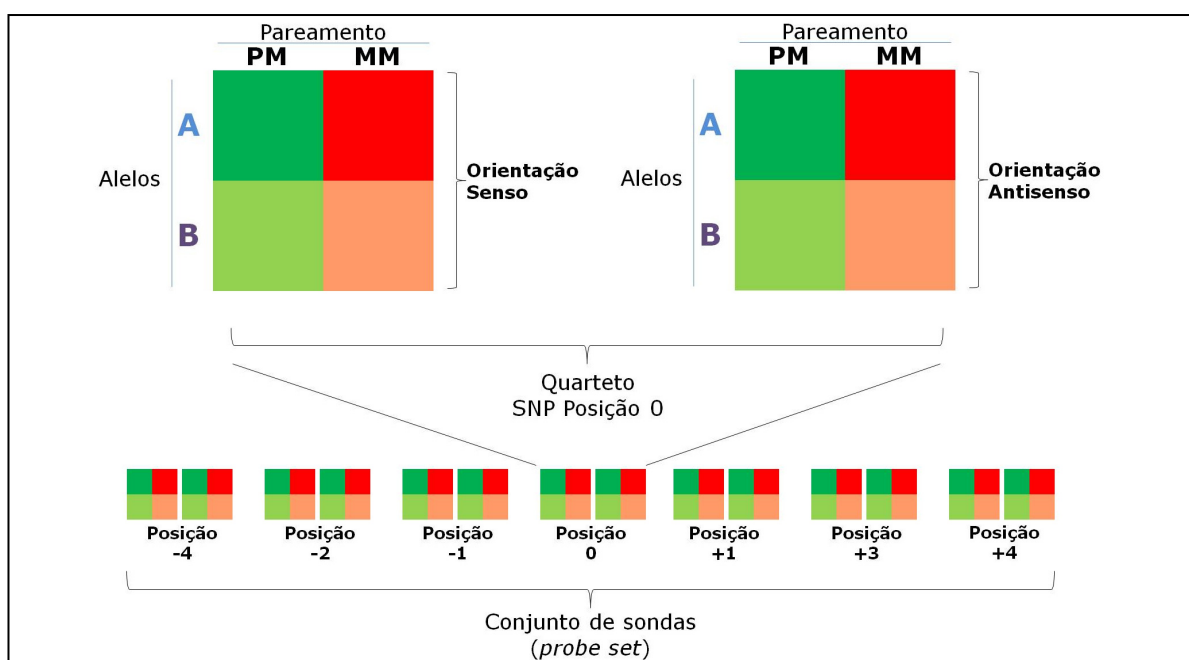


Figura I.1: Composição de um conjunto de sondas (*Affymetrix GeneChip® Mapping 100K Array set*).

- **Conjunto de sondas** (*probe set*): conjunto de células-sonda (PM e MM) usadas para testar um único SNP; reúne quartetos de sondas senso e antisenso com a posição da base interrogada em diferentes localizações da sequência; cada quarteto de sonda apresenta sete posições de deslocamento (t), sendo elas: -4, -2, -1, 0, +1, +3, +4. Isso significa dizer que, quando $t = 0$, o SNP estudado é a própria base interrogada, quando $t = -1$ a base interrogada está há uma posição 5' do SNP estudado, quando $t = +3$ a base interrogada está há três posições 3' do SNP estudado e assim por diante. Em resumo, para cada SNP estudado há sete quartetos, cada um deles composto por 8 sondas (divididas em senso e antisenso, PM e MM, para o alelos A e B)

O algoritmo MPAM avalia, inicialmente, a ocorrência de hibridação específica e não-específica, utilizando, para tanto, um filtro de discriminação que compara as intensidades de fluorescência para as células PM e MM:

$$DS = (P - M)/(P + M),$$

onde: DS = escore de discriminação para o par de sondas

P = valor de intensidade para PM

M = valor de intensidade para MM

A seguir, valores de DS medianos são calculados para as orientações senso e antisenso, bem como para os alelos A e B:

DS (s,A) = mediana dos DS calculados para par de sondas alelo A orientação senso

DS (t,A) = mediana dos DS calculados para par de sondas alelo A orientação antisenso

DS (s,B) = mediana dos DS calculados para par de sondas alelo B orientação senso

DS (t,B) = mediana dos DS calculados para par de sondas alelo B orientação antisenso

Com base nos valores acima, é calculado o DS para o SNP referido (DS_{SNP}):

$$DS_{SNP} = \max\{\min[DS(s,A),DS(t,A)],\min[DS(s,B),DS(t,B)]\}$$

Se $DS_{SNP} < 0,08$ (limiar pré-determinado), o SNP não passa pelo filtro de discriminação e o valor de RAS não é calculado; para os SNPs com valores $DS_{SNP} > 0,08$, calcula-se RAS, que é uma medida das intensidades de PM para os alelos A e B de um SNP.

Para cada quarteto de sondas senso e antisenso, o valor de RAS é obtido da seguinte forma:

a) Cálculo de MM médio do quarteto (M_{av}):

$$M_{av} = (M_A + M_B)/2,$$

onde: M_A = valor de intensidade para o alelo A MM

M_B = valor de intensidade para o alelo B MM

b) Cálculo dos valores de intensidades relativas para os alelos A e B:

$$A = \text{Max} [P_A - M_{av}, 0]$$

$$B = \text{Max} [P_B - M_{av}, 0],$$

onde: P_A = valor de intensidade para o alelo A PM

P_B = valor de intensidade para o alelo B PM

c) Cálculo do valor de RAS para cada um dos quartetos:

$$RAS_{\text{quarteto}} = A/(A+B)$$

Por fim, calcula-se a mediana dos valores RAS_{quarteto} obtidos em (c) para as direções senso (RAS_1) e antisenso (RAS_2), a partir dos quais calcula-se RAS_{av} :

$$RAS_{av} = (RAS_1 + RAS_2)/2$$

Anexo II

As frequências alélicas foram obtidas a partir das variáveis RAS corrigidas por valores de k . Esse processo, denominado correção- k , faz-se necessário devido à fluorescência diferencial observada entre os alelos A e B de um SNP.

Os valores de k foram derivados para cada SNP a partir da equação abaixo (valores de correção obtidos em <http://cogent.iop.kcl.ac.uk/rcorrection.cogx>) (Meaburn *et al.*, 2006):

$$k = \text{valor de correção} / (1 - \text{valor de correção})$$

Assim, a frequência alélica estimada para o alelo A (\hat{A}) de um SNP é dada por:

$$\hat{A} = A / [A + k (1 - A)],$$

onde A é o RAS_{av} para o alelo A de um SNP (cálculo mostrado no anexo I).

Anexo III

Apresentamos abaixo a listagem do programa-fonte em dialeto BASIC (*Liberty BASIC*, ©1992-2003 *Shoptalk Systems*, <http://www.libertybasic.com>), utilizado para a realização do teste de Wilcoxon em cada um dos 45 grupos.

```

REM PROGRAM FILENAME WILCOXON_07.BAS
FOR I8 = 1 TO 45
IF I8 < 10 THEN
  ARCHNAM$ = "Freq_Comb0";STR$(I8);".txt"
  ARCHIVENAME$ = "c:\temp\Freq_Comb0";str$(I8);".txt"
ELSE
  ARCHNAM$ = "Freq_Comb";STR$(I8);".txt"
  ARCHIVENAME$ = "c:\temp\Freq_Comb";str$(I8);".txt"
END IF
OPEN ARCHIVENAME$ FOR INPUT AS #1
PRINT "DATA RETRIEVED FROM FILE ";ARCHNAM$ : PRINT ""
N = 8
DIM A(N), B(N), X1(N), X2(N), R1(N), R2(N)
INPUT #1, N1
FOR I9 = 1 TO N1
N = 8 : TPLUS = 0 : TMINUS = 0 : I = 1
[STARTLOOP]
INPUT #1, A(I), B(I)
  X1(I) = A(I) - B(I)
  X2(I) = ABS(X1(I))
  IF X1(I) = 0 THEN I = I - 1 : N = N - 1
I = I + 1
IF I <= N THEN [STARTLOOP]
FOR I = 1 TO N
  T1 = 0 : T2 = 0 : W = X2(I)
  FOR J = 1 TO N
    IF X2(J) > W THEN [NEXT_J]
    IF X2(J) < W THEN [LABEL_1]
    T2 = T2 + 1: GOTO [NEXT_J]
[LABEL_1] T1 = T1 + 1
[NEXT_J] NEXT J
  R1(I) = T1 + (T2 + 1) / 2
  R2(I) = R1(I) * X1(I)/X2(I)
NEXT I
FOR I = 1 TO N
  IF R2(I) > 0 THEN TPLUS = TPLUS + R2(I) ELSE TMINUS = TMINUS +
ABS(R2(I))
NEXT I
FOR I = 1 TO N
  R1(I) = 0 : R2(I) = 0
NEXT I
IF TMINUS < TPLUS THEN T = TMINUS ELSE T = TPLUS
'IF N = 10 AND T <= 8 THEN ST = ST + 1 : GOTO [NEXT_I9]
'IF N = 9 AND T <= 5 THEN ST = ST + 1 : GOTO [NEXT_I9]
IF N = 8 AND T <= 3 THEN ST = ST + 1 : PRINT USING ("#####",I9) : GOTO
[NEXT_I9]
IF N = 7 AND T <= 2 THEN ST = ST + 1 : PRINT USING ("#####",I9) : GOTO
[NEXT_I9]

```

```
IF N = 6 AND T = 0 THEN ST = ST + 1 :PRINT USING ("#####",I9)
[NEXT_I9]
NEXT I9
CLOSE #1
PRINT ""
PRINT USING ("#####",ST); : PRINT " /";
PRINT USING ("#####",I9-1);
PRINT " = ";
PRINT USING ("#.#####",ST/(I9-1))
PRINT ""
ST = 0
NEXT I8
WAIT
```

Capítulo IV

Discussão geral e conclusões

No presente trabalho, propusemo-nos a investigar o desvio de segregação, evento biológico associado à transmissão, para a progênie, de um alelo ou cromossomo em proporções que fogem à predição mendeliana (Lyttle *et al.*, 1991).

As primeiras descrições desse fenômeno em dípteros e em camundongos foi possibilitada por dois fatores: a numerosa prole oriunda do cruzamento desses animais e um marcador fenotípico que torna visível a distorção ocorrida em nível molecular (Sandler e Novitski, 1957; Sandler *et al.*, 1959; Willison e Lyon, 2000).

Por esse motivo, os estudos de tal processo na espécie humana são pouco abundantes e concentram-se, em grande parte, na avaliação de famílias selecionadas pela presença de uma doença genética (Zatz *et al.*, 1997; Iughetti *et al.*, 1998; Botta *et al.*, 2005; Bettencourt *et al.*, 2008). Entretanto, esses delineamentos experimentais não possibilitam definir se, de fato, há uma correlação direta entre o desvio de segregação e o quadro clínico observado.

Na primeira parte dessa pesquisa, estudamos uma família caracterizada, inicialmente, pela transmissão preferencial paterna de um alelo portador da mutação *CAPN3* c.759_761. Em etapas posteriores, foi possível definir uma região do cromossomo 15 comum à maior parte desses indivíduos e que, interessantemente, não inclui *CAPN3*.

O estudo de 14 genes contidos na região em questão, cuja extensão é de 2,1 Mb, não revelou qualquer variante rara que justificasse o desempenho superior das células gaméticas portadoras da alteração em *CAPN3*. Entretanto, as oito variantes comuns distribuídas ao longo das regiões codificadoras dos genes *DUOX2*, *DUOX2*, *DUOX1*, *SHF* e *SLC30A4* podem estar associadas, independente ou sinergicamente, à distorção observada.

Bastante plausível também é a hipótese de que o desvio de segregação observado decorra da interação entre dois diferentes grupos de genes – aqueles que promovem o desvio (*distorters*) e os que a ele respondem (*responders*) –, como

ocorre em *Drosophila melanogaster* e em *Mus musculus* (Lyttle, 1991; Lyon, 2003). Assim, é possível que, na região definida para a família acima, tenhamos um ou mais genes que respondam à distorção promovida por um ou mais *distorters* que atuariam em *trans* e que, dessa forma, podem não estar localizados nesse intervalo do cromossomo 15.

Dada a complexidade do processo, decidimos, então, investigar não mais a ocorrência de distorção em uma região particular do genoma, mas sim o desvio de segregação global, que envolve diversos locos, como sugerido anteriormente por Zöllner *et al.* (2004) e Deng *et al.* (2009).

Levando-se em consideração que a seleção sobre células gaméticas constitui um dos eventos que podem culminar em progênie com proporções diferentes das predições mendelianas (Pardo-Manuel de Villena e Sapienza, 2001), comparamos subpopulações de espermatozoides com desempenhos desiguais, a fim de identificar regiões cromossômicas distintamente representadas entre células separadas segundo sua motilidade.

Esta estratégia, ainda não descrita, possibilitou-nos identificar SNPs cujas frequências apresentaram diferenças estatisticamente significantes entre espermatozoides lentos e rápidos.

Alguns desses polimorfismos encontram-se em genes previamente associados a processos característicos das células gaméticas masculinas, como, por exemplo, a reação acrossômica e a motilidade espermática, das quais participam *PDE1C* e *PDE4D*, respectivamente (Fisch *et al.*, 1998; Dimitriadis *et al.*, 2008).

Outros genes, como *CTTNBP2NL*, *FMN2*, *PALLD*, *PDE4D* e *PAK1*, parecem estar ligados à constituição do citoesqueleto, que desempenha papel fundamental nas alterações morfológicas ocorridas ao longo da espermatogênese, como a alongação do núcleo e as formações do acrossomo e do flagelo, por exemplo (Fouquet *et al.*, 2000; Kierszenbaum, 2002; Kierszenbaum e Tres, 2004; Sun *et al.*, 2010).

A partir dos resultados obtidos com essa nova estratégia, supusemos que pequenas diferenças em processos de grande importância na espermatogênese, como os citados acima, podem resultar em desempenhos distintos, em relação à motilidade, de subpopulações de células gaméticas. Como consequência, espermatozoides lentos e rápidos apresentariam capacidades desiguais de concluir a fertilização, podendo culminar em desvio de segregação para as gerações subsequentes.

Além do conhecimento do processo biológico *per se*, identificar regiões cromossômicas subrepresentadas nas células gaméticas menos móveis pode ampliar nossos conhecimentos atuais acerca de genes ou de variantes associados à infertilidade masculina, maximizando as abordagens terapêuticas empregadas nessa situação.

Esse tema apresenta grande relevância dado que, recentemente, vem-se observando um declínio na saúde reprodutiva de homens e mulheres, o que é indicado pelo aumento da procura por técnicas de reprodução assistida. Tal condição afeta, em média, um a cada sete casais em idade reprodutiva e aproximadamente 30% dos casos em que se adota fertilização *in vitro* estão associados a fatores masculinos (dados disponibilizados por *Human Fertilisation and Embryology Authority* – HFEA, <http://www.hfea.gov.uk/>).

Sob outra perspectiva, a identificação de regiões do genoma humano sujeitas a desvio de segregação revela-se importante em estudos de ligação que investigam o excesso de compartilhamento de um dado alelo entre irmãos afetados por uma doença em particular – isso porque a maior parte de tais estudos pressupõe que a transmissão de alelos de um loco em heterozigose se dá de acordo com as proporções mendelianas.

Dessa maneira, se a região analisada está sob desvio de segregação, os resultados observados em trabalhos com delineamento como o citado acima podem ser decorrentes exclusivamente da distorção à qual o loco em questão está submetido, sem qualquer associação com o distúrbio investigado. Assim, para que haja a

manutenção do poder estatístico do estudo, o número de indivíduos incluídos nesse tipo de análise deve depender do grau de desvio de segregação ocorrido na região em questão (Greenwood e Morgan, 2000).

Referências bibliográficas

Bettencourt, C., Santos, C., Kay, T., Vasconcelos, J. and Lima, M. (2008). "Analysis of segregation patterns in Machado-Joseph disease pedigrees." J Hum Genet **53**(10): 920-3.

Botta, A., Tacconelli, A., Bagni, I., Giardina, E., Bonifazi, E., Pietropolli, A., Clementi, M. and Novelli, G. (2005). "Transmission ratio distortion in the spinal muscular atrophy locus: data from 314 prenatal tests." Neurology **65**(10): 1631-5.

Deng, L., Zhang, D., Richards, E., Tang, X., Fang, J., Long, F. and Wang, Y. (2009). "Constructing an initial map of transmission distortion based on high density HapMap SNPs across the human autosomes." J Genet Genomics **36**(12): 703-9.

Dimitriadis, F., Giannakis, D., Pardalidis, N., Zikopoulos, K., Paraskevoidis, E., Giotitsas, N., Kalaboki, V., Tsounapi, P., Baltogiannis, D., Georgiou, I., Saito, M., Watanabe, T., Miyagawa, I. and Sofikitis, N. (2008). "Effects of phosphodiesterase-5 inhibitors on sperm parameters and fertilizing capacity." Asian J Androl **10**(1): 115-33.

Fisch, J. D., Behr, B. and Conti, M. (1998). "Enhancement of motility and acrosome reaction in human spermatozoa: differential activation by type-specific phosphodiesterase inhibitors." Hum Reprod **13**(5): 1248-54.

Fouquet, J., Kann, M., Soues, S. and Melki, R. (2000). "ARP1 in Golgi organisation and attachment of manchette microtubules to the nucleus during mammalian spermatogenesis." J Cell Sci **113 (Pt 5)**: 877-86.

Greenwood, C. M. and Morgan, K. (2000). "The impact of transmission-ratio distortion on allele sharing in affected sibling pairs." Am J Hum Genet **66**(6): 2001-4.

Iughetti, P., Otto, P. A., Zatz, M., Passos Bueno, M. R. and Marie, S. K. (1998). "Different behavior in the paternally vs. maternally inherited mutated allele in Brazilian Machado-Joseph (MJD1) families." Am J Med Genet **77**(3): 246-8.

Kierszenbaum, A. L. (2002). "Intramanchette transport (IMT): managing the making of the spermatid head, centrosome, and tail." Mol Reprod Dev **63**(1): 1-4.

Kierszenbaum, A. L. and Tres, L. L. (2004). "The acrosome-acroplaxome-manchette complex and the shaping of the spermatid head." Arch Histol Cytol **67**(4): 271-84.

Lyon, M. F. (2003). "Transmission ratio distortion in mice." Annu Rev Genet **37**: 393-408.

Lyttle, T. W. (1991). "Segregation distorters." Annu Rev Genet **25**: 511-57.

Pardo-Manuel de Villena, F. and Sapienza, C. (2001). "Nonrandom segregation during meiosis: the unfairness of females." Mamm Genome **12**(5): 331-9.

Sandler, L. and Novitski, E. (1957). "Meiotic drive as an evolutionary force." Am Nat **41**: 105-10.

Sandler, L., Hiraizumi, Y. and Sandler, I. (1959). "Meiotic Drive in Natural Populations of *Drosophila Melanogaster*. I. the Cytogenetic Basis of Segregation-Distortion." Genetics **44**(2): 233-50.

Sun, X., Kovacs, T., Hu, Y. J. and Yang, W. X. "The role of actin and myosin during spermatogenesis." Mol Biol Rep. Published online: 24 november 2010.

Willison, K. R. and Lyon, M. F. (2000). "A UK-centric history of studies on the mouse t-complex." Int J Dev Biol **44**(1): 57-63.

Zatz, M., Cerqueira, A., Vainzof, M. and Passos-Bueno, M. R. (1997). "Segregation distortion of the CTG repeats at the myotonic dystrophy (DM) locus: new data from Brazilian DM families." J Med Genet **34**(9): 790-1.

Zöllner, S., Wen, X., Hanchard, N. A., Herbert, M. A., Ober, C. and Pritchard, J. K. (2004). "Evidence for extensive transmission distortion in the human genome." Am J Hum Genet **74**(1): 62-72.

Abstract

The transmission ratio distortion (TRD), a biological process defined as a deviation from Mendelian predictions, is caused by different mechanisms: nonrandom segregation of chromosomes during meiosis or gametic and postzygotic viability selection.

In order to investigate TRD in humans, we have studied a family with an overtransmitted pathogenic deletion in the *CAPN3* gene (*CAPN3* c.759_761del), previously associated to limb-girdle muscular dystrophy type 2A (LGMD2A). Initially, it was possible to define a 2.1 Mb region which was present in most of the individuals. The direct sequencing of 14 genes contained in this interval did not reveal rare variants that could be responsible for the advantage of gametes carrying the *CAPN3* mutation. Nevertheless, common variants identified in five genes could indicate that the observed transmission distortion is caused by the interaction among proteins with small dissimilarities, resulting in differential performance of these gametic cells.

Subsequently we developed another approach: spermatozoa from healthy individuals were sorted according to their motility and allelic frequencies at each locus in heterozygous state were compared in order to identify genomic regions susceptible to TRD. Surprisingly, some statistically significant results were achieved for regions containing genes involved with acrosome reaction and sperm motility, as *PDE1* and *PDE4*, suggesting these processes are targets of the selection that ends in offspring with proportions skewed away from the Mendelian predictions.

These results are important for enlarge our knowledge about TRD and its impact in humans, considering possible effects in male fertility.

Resumo

O desvio de segregação, processo biológico definido pela formação de progênie cujas proporções genótípicas diferem das predições mendelianas, pode apresentar diferentes causas: a segregação não aleatória dos cromossomos durante a meiose, a seleção gamética e a viabilidade pós-zigótica diferencial.

A fim de investigar a distorção de segregação em humanos, estudamos uma família com transmissão preferencial paterna de uma alteração patogênica no gene *CAPN3* (*CAPN3* c.759_761del), previamente associada à distrofia muscular de cinturas do tipo 2A (LGMD2A). Inicialmente, definimos uma região com 2,1 Mb de extensão, presente na maior parte dos indivíduos da família. O sequenciamento direto de 14 genes contidos nesse intervalo não revelou variantes raras que pudessem estar diretamente associadas à vantagem da subpopulação de gametas portadores da alteração em *CAPN3*. Entretanto, a presença de variantes comuns distribuídas em cinco genes da região pode indicar que a distorção de segregação observada é consequência da interação, em nível proteico, de pequenas alterações genômicas, resultando no desempenho diferencial de tais células gaméticas.

Além disso, utilizamos outra abordagem: espermatozoides de indivíduos saudáveis foram selecionados segundo sua motilidade e as frequências alélicas de cada loco em heterozigose foram comparadas entre células lentas e rápidas, a fim de identificarmos regiões suscetíveis ao desvio de segregação. Alguns resultados estatisticamente significantes foram obtidos para regiões que contêm genes envolvidos na reação acrossômica e na motilidade espermática, como *PDE1C* e *PDE4D*. Isso nos sugere que tais processos constituem alvos da seleção, o que pode culminar em formação de progênie com proporções que fogem às predições mendelianas.

Esses achados são importantes porque possibilitam a ampliação de nossos conhecimentos acerca do desvio de segregação e seu impacto na espécie humana, considerando ainda possíveis efeitos na fertilidade masculina.