Mariangela Tuzzolo Missaglia

Pesquisa de mutações no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) em homens brasileiros inférteis portadores de ausência congênita dos ductos deferentes (CAVD)

Dissertação apresentada à Faculdade de
Medicina da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Urologia
Orientador: Dr. Jorge Hallak

São Paulo
2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Preparada pela Biblioteca da
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Missaglia, Mariangela Tuzzolo

Pesquisa de mutações no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) em homens brasileiros inférteis portadores de ausência congênita dos ductos deferentes (CAVD) / Mariangela Tuzzolo Missaglia. -- São Paulo, 2008.

**Dissertação(mestrado)--Faculdade de Medicina da
Universidade de São Paulo.**

Departamento de Cirurgia.

Área de concentração: Urologia.

Orientador: Jorge Hallak.

Descritores: 1.Infertilidade masculina 2.Azoospermia 3.Ducto deferente/anormalidades 4.Regulador de condutância transmembrana em fibrose cística 5.Fibrose cística

USP/FM/SBD-483/08

Normalização adotada

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de *International Committee of Medical Journals Editors* (Vancouver)

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Serviço de Biblioteca e Documentação. *Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias*. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Júlia De A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 2a. ed. São Paulo: Serviço de Biblioteca e Documentação; 2005.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com *List of Journals Indexed in Index Medicus*.

Dedicatória

*Aos meus queridos e amados pais, Mauri e Tedinha e aos meus adorados irmãos,
Maristela, Maurício e Marcella, obrigada pela vida e por fazerem parte dela,
obrigada por terem me ensinado tudo que sei, por terem me formado como pessoa,
pela confiança, pelo amor e carinho e por serem quem são (especiais e fundamentais).
Impossível estimar o valor e a importância que cada um de vocês tem em minha
vida.*

*Aprendi com vocês a não desistir, a não desanimar, a acreditar e a ter coragem para
enfrentar as dificuldades e ultrapassar as pedras que são colocadas em nossos
caminhos, e quantas...*

*Por isso devo tudo a vocês, só cheguei aqui e só sou quem sou, pois vocês fazem
parte de minha vida, meu eterno alicerce.*

AMO MUITO VOCÊS!!!

*Essa é uma dedicatória especial a uma pessoa ímpar, gigante, batalhadora, amiga,
professora e que é fundamental em minha vida profissional.*

Não sei como expressar através de palavras a grande emoção e minha gratidão a

Dra. Patrícia de Campos Pieri,

*esse grande ser humano e excelente profissional que muito abdicou, ensinou e lutou
para que essa trabalho fosse concluído. Sem ela esse mestrado não existiria e eu não
teria chegado onde cheguei!*

*Que Deus ilumine sempre seu caminho e continue lhe dando força para que todos os
seus objetivos sejam alcançados, pois você merece tudo de melhor!!!*

Simplesmente obrigada por tudo.

Agradecimentos...

Á Deus, por sempre ter me iluminado, direcionado meu caminho e principalmente por estar sempre ao meu lado, me dando forças para suportar todos os desafios da vida;

Ao Professor Dr. Jorge Hallak, pela orientação e pelas dicas que foram fundamentais;

Á Dra. Patrícia Pieri, ao diretor clínico da Androscience Dr. Jorge Hallak e ao Secretário da Saúde Dr. Luiz Roberto Barradas Barata pelo suporte financeiro da dissertação;

Ao Dr. Jorge Hallak, Professor Dr. Sami Arap, Dr. Rodrigo Pagani, aos médicos da Reprodução Humana da Universidade Federal do ABC e aos médicos do Centro de Reprodução Humana do HC-FMUSP (na gestão da Clínica Urológica no período de 2003 a 2004), que muito contribuíram com a casuística;

Ao Professor Dr. Carlos Alberto Moreira Filho, que contribuiu de maneira importante para o início do trabalho e pela abertura do laboratório do ICB IV;

Á Professora Dra. Thelma Suelly Okay, pela abertura e disponibilidade do laboratório LIM 36 permitindo a continuação do trabalho, por todo auxílio e apoio em todos os momentos requisitado e pelo exemplo de profissionalismo;

Á querida Valéria Fonseca pela grande profissional que é, e que com muita doçura, carinho e habilidade ilustrou de maneira esplêndida e única esse trabalho;

Á todos da equipe do LIM36 (Maria Luisa, Gilda, Lúdia, Léa, Érika, Mariana, Vagner, Karina), obrigada pelo apoio, a conversa amiga, os ensinamentos, os momentos de festa, os de tristeza, enfim, por tudo, jamais os esquecerei;

Á Juliana Andrietta, minha grande amiga, desde a faculdade, companheira e parceira de todos os momentos, meu carinho e minha eterna gratidão por tudo, não há como explicar tudo o que passamos juntas, mas tenha certeza que Deus sabe e nos abençoa, conte sempre comigo;

Ás Dras. Silvia Yumi e Patrícia Locosque que me ensinaram passo a passo, com muita paciência e grande habilidade, os princípios do seqüenciamento, e a Érica Fuji que me auxiliou em todos os seqüenciamentos realizados no LIM 56;

Aos queridos amigos e companheiros de aprendizado e trabalho, Fernanda, Jerônimo, Juliana Roque e Roberta, que me auxiliaram muito, não só pelas extrações de DNAs, pelos PCRs, géis e seqüenciamentos, mas acima de tudo pelo carinho, amizade e dedicação. Vocês foram fundamentais em todas as horas, obrigada de coração por tudo;

Ás queridas Laís, Ângela e Dna Valéria, pela solicitude, por todo auxílio no pagamento das notas, por todas as informações e principalmente por sempre me manterem em contato com o Dr. Jorge;

Á Elisa, secretária da pós-graduação da Urologia, por todo auxílio e apoio;

Á todos os meus familiares (vovó, tios, tias, primos e primas) por estarem sempre a meu lado torcendo por mim, vocês são muito especiais e importantes nessa trajetória;

Á todos os meus amigos, por milhares de vezes terem me escutado falando “aí meu mestrado...”, por terem me agüentado e me incentivado sempre. Em especial ao Marcelo por não ter medido esforços em me ajudar a scannear os géis de SSCP e os seqüenciamentos;

Á todos os pacientes que participaram desse estudo e emprestaram não só suas histórias clínicas, mas a suas histórias de vida que muito me ensinaram.

“Cada um que passa em nossa vida passa sozinho...

Porque cada pessoa é única para nós, e nenhuma substitui a outra.

Cada um que passa em nossa vida passa sozinho, mas não vai só...

Levam um pouco de nós mesmos e nos deixam um pouco de si mesmos.

Há os que levam muito, mas não há os que não levam nada.

Há os que deixam muito, mas não há os que não deixam nada.

Esta é a mais bela realidade da vida... A prova tremenda de que cada um é importante e que ninguém se aproxima do outro por acaso...”

*OBRIGADO Á TODOS QUE PASSARAM E FIZERAM PARTE DE MAIS
UMA ETAPA DE MINHA VIDA!!!*

Sumário

	Páginas
Lista de Abreviaturas	i
Lista de Figuras	iv
Lista de Tabelas	vi
Vocabulário Inglês-Português	vii
Glossário	viii
Resumo	xiii
Summary	xv
1 - Introdução	1
1.1 Considerações sobre a infertilidade conjugal.....	1
1.2 Considerações sobre a infertilidade masculina.....	2
1.3 Considerações sobre a análise seminal.....	3
1.4 Considerações sobre o desenvolvimento dos ductos mesonéfricos no homem: o normal e o patológico	5
1.5 Considerações sobre a infertilidade masculina causada pela ausência congênita dos ductos deferentes (CAVD) e anomalias urogenitais.....	7
1.6 Considerações sobre a Fibrose Cística (FC).....	10
1.7 Considerações sobre o gene <i>CFTR</i> e sua proteína.....	11
1.8 Considerações sobre as classes de mutações.....	17
1.9 Considerações sobre a CAVD e técnicas de reprodução humana assistida.....	21
1.10 Considerações sobre a Fibrose Cística no Brasil.....	23
2 - Objetivo	25
3 - Pacientes e Métodos	26
Fase 1 do estudo – Extração de DNA.....	26
Fase 1 do estudo – Desenho de oligonucleotídeos iniciadores (<i>primers</i>) e padronização das Reações em Cadeia da Polimerase (PCR).....	29
Fase 1 do estudo – Detecção de mutações – SSCP-HA e seqüenciamento.....	31

Fase 2 do estudo – Reações de PCR e SSCP.....	33
Fase 2 do estudo – Seqüenciamento.....	33
Fase 2 do estudo – Enzima de Restrição.....	34
Fase 2 do estudo – Técnica diagnóstica do alelo 5T.....	35
4 - Resultados	37
5 - Discussão e Conclusões	53
Polimorfismos em <i>CFTR</i> e <i>CAVD</i>	59
6 - Referências Bibliográficas	67
Anexos	

Lista de abreviaturas

a.a. – aminoácido

AMPc – adenosina monofosfato cíclico

ASO – oligonucleotídeo alelo específico (do inglês: *allele-specific oligonucleotide*)

ATP – adenosina trifosfato

CAVD – Ausência congênita dos ductos deferentes (do inglês: *Congenital Absence of Vas Deferens*)

CBAVD – Ausência congênita bilateral dos ductos deferentes (do inglês: *Congenital Bilateral Absence of Vas Deferens*)

CFTR – do inglês para o gene: *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*)

CFTR – do inglês para a proteína: *Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*

Cl – cloro

CUAVD – Ausência congênita unilateral dos ductos deferentes (do inglês: *Congenital Unilateral Absence of Vas Deferens*)

DNA – Ácido desoxirribonucleico (do inglês: *desoxyribonucleic acid*)

dNTP – termo genérico para o composto de um tipo de nucleosídeo deoxi trifosfato utilizado nas reações de polimerização em cadeia (dATP, dCTP, dGTP e dTTP)

EDTA – do inglês: *Ethylene DiamineTetracetic Acid*

FC – Fibrose Cística

FIV – Fertilização *in-vitro*

FSH – hormônio folículo-estimulante (do inglês: *Follicle-stimulating hormone*)

g/L – gramas por litro

HC – Hospital das Clínicas

HCFMUSP – Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

HCO₃⁻ – Bicarbonato de Sódio

Hph I – enzima de restrição extraída do microorganismo *Haemophilus*

parahaemolyticus com sítio de reconhecimento oito pares de base à direita de uma sequência GGTGA

ICSI – injeção intracitoplasmática de espermatozóide (do inglês: *Intracytoplasmic sperm injection*)

IVS – denominação genérica para íntrons

kb – kilo base

kDa – kilodalton

LH – hormônio luteinizante (do inglês: *Luteinizing Hormone*)

MESA – aspiração microcirúrgica de espermatozoides do epidídimo (do inglês: *Microsurgical Epididymal Sperm Aspiration*)

MgCl₂ – cloreto de magnésio

mL – mililitro

mM ou **mmol** – milimolar

NaCl – cloreto de sódio

ng – nanogramas

nm – nanômetros

°C – graus Celsius

pb – pares de base

PCR – reação em cadeia da polimerase (do inglês: *Polymerase chain reaction*)

pH – potencial hidrogeniônico

pmol/μL – picomol por microlitro

PRL - prolactina

RNA – ácido ribonucléico (do inglês: *ribonucleic acid*)

RNA_m – ácido ribonucléico mensageiro (do inglês: *ribonucleic acid*)

rpm – rotações por minuto

SNP – do inglês: *Single Nucleotide Polymorphisms*

SSCP – do inglês: *Single Strand DNA Polymorphism*

SSCP- HA – do inglês: *Single Strand DNA Polymorphism-Heteroduplexes Analysis*

TAE – tampão (Tris+ Ácido Acético + EDTA)

TBE – tampão (Tris+ Ácido Bórico + EDTA)

U – unidades internacionais

UV – ultravioleta

vol – volume

µg – microgramas

µL – microlitro

µM – micromolar

Lista de figuras

	Páginas
Figura 1: Desenvolvimento do rim permanente	6
Figura 2: Anomalias congênitas urogenitais	8
Figura 3: Esquema ilustrando o segmento de DNA com a organização dos 27 éxons do gene <i>CFTR</i>	12
Figura 4: Estrutura modular da proteína CFTR	13
Figura 5: Heredograma representando a herança autossômica recessiva na FC	23
Figura 6: Imagem do gel de SSCP-HA e do seqüenciamento do éxon 13	40
Figura 7: Imagem do SSCP-HA e do eletroferograma obtido no seqüenciamento do éxon 12 do paciente HC06	41
Figura 8: Imagem do gel de SSCP-HA do éxon 4 e do seqüenciamento correspondente ao éxon 4 dos pacientes HC07 e HC08	42
Figura 9: Imagem do seqüenciamento do éxon 6a do paciente HC15	43
Figura 10: Imagem do gel de SSCP-HA do éxon 10	44
Figura 11: Imagem do SSCP-HA e do seqüenciamento do éxon 11 do paciente HC11	45
Figura 12: Imagem do seqüenciamento do IVS8 do paciente HC04	46

Figura 13: Foto do resultado do PCR ASO para IVS8	47
Figura 14: Foto do gel de agarose com o resultado da amplificação do éxon 10 seguida de restrição pela endonuclease HphI	47
Figura 15: Imagem do seqüenciamento do éxon 14a do paciente HC06	48
Figura 16: Imagem do seqüenciamento do éxon 13	50
Figura 17: Imagem do seqüenciamento do íntron 14a do paciente HC06	50
Figura 18: Imagem do gel de SSCP do éxon 20	51
Figura 19: Imagem do seqüenciamento do éxon 20 do paciente HC16	51
Figura 20: Efeito da associação entre as variantes IVS8 poli(TG) e poli(T) na quantidade de proteína CFTR funcional circulante	63

Lista de tabelas

Páginas

Tabela 1:

Esquema ilustrando as classes de mutações no gene *CFTR* 18

Tabela 2a:

Classificação dos pacientes portadores de CAVD de acordo com os principais parâmetros físicos e laboratoriais 27

Tabela 2b:

Exames laboratoriais, diagnóstico por imagem e dados complementares 28

Tabela 3:

Descrição dos *primers* e de parâmetros das amplificações 29

Tabela 4:

Resultado da pesquisa no gene *CFTR* 38

Tabela 5:

Resultados do estudo da variante alélica IVS8 46

Tabela 6:

Resultados de trabalhos da literatura de pacientes com CBAVD 55

Tabela 7:

Resultados de trabalhos da literatura de pacientes com CUAVD 55

Tabela 8:

Resultado da associação entre as repetições TG e T em IVS8 e do polimorfismo M470V 62

Vocabulário inglês-português de termos correntemente utilizados em biologia molecular

Termo em Inglês

Tradução

frameshift

modificação na grade, seqüência, matriz ou quadro de leitura

in frame

Toda alteração que não acarreta mudança na grade, seqüência, matriz ou quadro de leitura

missense

troca de sentido substituição de um determinado aminoácido por outro diferente

nonsense

sem sentido, substituição de aminoácido por códon de terminação

primer

oligonucleotídeo iniciador

splicing

processamento

splicing junction

sítio de processamento no RNAm

Glossário

Ácido nucléico: macromolécula que consiste em polímero de nucleotídeos. São encontrados em duas formas: DNA e RNA. Os ácidos nucléicos podem ser lineares ou circulares, em fita simples ou fita dupla.

Alelo: cada uma das várias formas alternativas do mesmo gene, ocupando um dado locus (posição) num cromossomo.

Brometo de etídio: corante com capacidade de se intercalar entre as fendas criadas pela torção da dupla hélice do DNA e, assim, ser usado para corar o DNA em géis, uma vez que fluoresce quando exposto à luz ultravioleta (UV), permitindo a visualização indireta do DNA. É conhecido como mutagênico potente e também possivelmente carcinogênico e teratogênico.

Códon: uma trinca de bases em uma molécula de DNA ou RNA, especificando aminoácido específico, existem 64 códons compostos pela combinação das 4 bases nitrogenadas ATCG existentes e capazes de codificar os 20 aminoácidos além dos 3 códons de término de leitura (TAA, TAG, TGA).

Congênito: presente ao nascimento, mas não necessariamente genético.

Cromossomo: uma das estruturas filamentosas do núcleo da célula. Consiste em cromatina e porta a informação genética (DNA).

Deleção: a perda de uma sequência de DNA de um cromossomo. O DNA deletado pode ser de qualquer tamanho, desde uma só base até uma grande parte do cromossomo.

Deleção *in frame*: uma deleção que não destrói a grade, sequência, matriz ou quadro de leitura normal do gene.

Denaturação (do DNA): a conversão do DNA de bifilamentar ou também conhecido como fita dupla em um estado unifilamentar ou de fita simples, geralmente feita por aquecimento a 94°C para destruir as pontes de hidrogênio envolvidas no pareamento de bases.

Desequilíbrio de ligação: a ocorrência de combinações específicas de alelos com mais frequência, maior do que se poderia esperar ao acaso.

DNA (ácido desoxirribonucléico): a molécula que codifica os genes

responsáveis pela estrutura e pelo funcionamento dos organismos vivos e permite a transmissão da informação genética de geração para geração.

DNA complementar (cDNA): DNA sintetizado de um molde de RNA mensageiro, pela ação da enzima transcriptase reversa.

DNA de cópia única: o tipo de DNA que constitui a maioria do genoma.

DNA genômico: a sequência de DNA cromossômico de um gene ou segmento de um gene, incluindo a sequência de DNA de regiões não codificantes. Também, o DNA que foi isolado diretamente de células ou cromossomos ou cópias clonadas de todo ou de uma parte de tal DNA.

DNA polimerase: uma enzima que pode sintetizar um novo filamento de DNA, usando um filamento de DNA previamente sintetizado como molde.

Dominante: uma característica é dominante se for fenotipicamente expressa nos heterozigotos.

Eletroforese: uma técnica utilizada para a separação de moléculas de DNA, RNA ou proteínas por diferenças de peso molecular gerando campo elétrico em um gel (agarose, poliacrilamida etc.) onde estão as amostras.

Enzima de restrição: uma enzima derivada de bactéria, que pode reconhecer uma sequência específica de DNA e clivar a molécula de DNA dentro do sítio de reconhecimento ou em algum sítio próximo.

Éxon: uma região transcrita de um gene que está presente em um RNA mensageiro.

Familiar: qualquer característica que seja mais comum nos parentes de uma pessoa afetada do que na população em geral, seja a causa genética, ambiental ou ambas.

Gene: unidade hereditária; em termos moleculares, uma sequência de DNA que é necessária para a produção de uma proteína.

Hemizigoto: um termo para o genótipo de uma pessoa com apenas um representante de um cromossomo ou segmento cromossômico em vez dos dois usuais. Refere-se especificamente a genes ligados ao X no homem, mas também se aplica a genes em qualquer segmento cromossômico que seja deletado no cromossomo homólogo.

Heterozigoto: um indivíduo ou genótipo com dois alelos diferentes em um

determinado locus em um par de cromossomos homólogos.

Homozigoto: um indivíduo ou genótipo com alelos idênticos em um determinado locus em um par de cromossomos homólogos.

Íntron: um segmento de um gene que é inicialmente transcrito, mas é então removido de dentro do RNA primário transcrito, havendo a recomposição das seqüências (éxons) em ambos os lados dele.

Locus: a posição ocupada por um gene em um cromossomo. Formas diferentes do gene (alelos) podem ocupar o locus.

Microdeleção: uma deleção cromossômica que é muito pequena para ser vista ao microscópio.

Motivo: padrão de aminoácidos que é encontrado em grupo de proteínas com atividade bioquímica similar e que freqüentemente é próximo do sítio ativo de proteína.

Mutação com mudança na grade de leitura (*frameshift*): uma inserção ou deleção de um ou mais nucleotídeos, em número diferente de 3 ou de qualquer de seus múltiplos, causando a alteração na grade, seqüência, matriz ou quadro de leitura da tradução.

Mutação de sentido trocado (*missense*): uma mutação que altera um códon específico para um aminoácido passando a codificar outro aminoácido.

Mutação sem sentido (*nonsense*) ou mutação de término de cadeia: qualquer alteração (deleção, inserção ou substituição) que gera um códon finalizador ou *stop codon* (TAA, TGA, TAG), impedindo assim a continuação da síntese da cadeia polipeptídica. Resulta em proteína truncada que pode ser não funcional ou ter uma função alterada.

Mutação silenciosa: mutação que resulta na ausência completa da função de um gene.

Mutação: qualquer alteração herdada permanente na seqüência do DNA genômico.

Nucleotídeo: uma molécula composta de uma base nitrogenada, um açúcar de 5 carbonos e um grupo fosfato. Um ácido nucléico é um polímero de muitos nucleotídeos.

Oligonucleotídeo alelo específico (ASO): par de sondas oligonucleotídicas sintetizadas de modo a distinguir entre dois alelos que diferem apenas por uma única base nitrogenada.

Oligonucleotídeo iniciador (*primer*): um oligonucleotídeo sintético curto destinado a hibridizar-se a um molde unifilamentar de DNA e criar uma ponta livre em 3', à qual a DNA polimerase pode adicionar nucleotídeos e sintetizar uma fita de DNA complementar; são utilizados como sonda ou para uso na reação em cadeia da polimerase.

Polimorfismo de nucleotídeo único (SNP): um polimorfismo na sequência de DNA que consiste na variação em uma única base.

Polimorfismo: a ocorrência conjunta em uma população de dois ou mais genótipos alternativos, cada um com uma frequência maior que a que pode ser mantida apenas pela mutação recorrente. Um locus é arbitrariamente considerado como sendo polimórfico se o alelo mais raro tiver uma frequência de 0,01, de modo que a frequência de heterozigotos seja de pelo menos 0,02. Qualquer alelo mais raro que 0,02 é considerado uma variante rara.

Portador: um indivíduo heterozigoto para um determinado alelo mutante.

Primer : ver definição em oligonucleotídeo iniciador.

Processamento (*Splicing*): processo que remove os íntrons (seqüências não codificadoras de proteínas) dos RNAs transcritos. Alguns éxons (seqüências codificadoras de proteínas) podem ser removidos juntamente com os íntrons. Dependendo de quais éxons são removidos, podem ser formadas diferentes proteínas a partir do mesmo gene ou RNA inicial. As proteínas produzidas dessa forma são chamadas de “variantes de *splicing*” ou isoformas.

Reação em cadeia da polimerase (PCR): técnica de biologia molecular pela qual uma seqüência alvo (ou *template*) de DNA é copiada com o auxílio de dois oligonucleotídicos flanqueadores da seqüência alvo auxiliados por enzima do tipo polimerase.

Recessiva: gene ou característica que é expressa apenas em homozigose.

Resíduo: termo utilizado para cada amino ácido de uma proteína.

RNA (ácido ribonucléico): um ácido nucléico formado sobre um molde de DNA, contendo ribose em vez de desoxirribose.

RNA mensageiro (RNAm): um RNA, transcrito do DNA de um gene, que determina a seqüência de aminoácidos no polipeptídeo codificado.

Sítio de restrição: uma curta seqüência no DNA que pode ser reconhecida e cortada por uma endonuclease de restrição específica.

Splicing: ver processamento.

SSCP (*Single Stranded Conformational Polymorphism*): polimorfismo conformacional de fita simples – baseia-se no fato de que fitas simples de DNA assumem conformação específica na dependência de sua seqüência de nucleotídeos, migrando de forma diferente em eletroforese não-denaturante; a metodologia é utilizada no rastreamento de alterações na seqüência do DNA.

(Mir, 2004; Thompson & Thompson, 2002)

Resumo

Missaglia MT. Pesquisa de Mutações no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) em homens brasileiros inférteis portadores de ausência congênita dos ductos deferentes (CAVD) [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

A Fibrose Cística (FC) é a doença autossômica recessiva mais freqüente em caucasianos e está associada, em seu amplo espectro de apresentação clínica, a mais de 1500 mutações no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance regulator*). O papel de *CFTR* é especialmente relevante no desenvolvimento da porção reprodutiva dos ductos mesonéfricos. Em 98% dos pacientes masculinos portadores da FC, mutações em *CFTR* são responsáveis pela ausência bilateral congênita dos ductos deferentes (CBAVD), associada à anomalias variáveis das vesículas seminais, ductos ejaculatórios e da porção distal dos epidídimos. A ausência uni ou bilateral congênita dos ductos deferentes (CAVD), na ausência de outros sinais clínicos de FC, é conhecida causa de infertilidade masculina, presente em 1%-2% de todos os homens inférteis, e em cerca de 10% dos azoospermicos. A reprodução assistida utilizando a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) obtidos preferencialmente por aspiração microcirurgica de espermatozoides do epidídimo (MESA) permite a paternidade biológica a esses pacientes. Em função da alta morbi-mortalidade da FC e da alta freqüência de portadores assintomáticos, estimada em 1:25, é recomendável que seja realizado teste para identificação de mutações em *CFTR* em todos os pacientes com CAVD antes de serem submetidos à ICSI. Em populações de etnia homogênea, a mutação $\Delta F508$ é identificada em 90% dos pacientes com FC e em 70% a 85% dos pacientes com CAVD. No Brasil, onde diferenças étnicas refletem a heterogeneidade genética, a freqüência da mutação $\Delta F508$ varia entre 23% e 50% em paciente com FC indicando que outras mutações devam estar envolvidas. Este dado levou ao estudo completo do gene *CFTR* de 20 homens inférteis com CAVD visando a identificação das mutações mais

prevalentes em nossa população. Foram identificadas mutações em 17 pacientes (85%): três $\Delta F508$ representando 15% (3/20), uma G542X, uma 875+1G>A e 4 mutações ainda não descritas na literatura, a S753R, G149W identificada em dois irmãos, V580F e a 712-1G>T. A variação no trato polipirimidínico em IVS8 (alelo 5T), seja como segunda mutação ou presente em homozigose, está diretamente relacionada com a CAVD, com freqüências em população caucasiana masculina infértil variando entre 21% e 30%. No presente estudo, 15 (15/20=75%) pacientes apresentaram o alelo a variante alélica 5T sendo que em 8 pacientes essa variante alélica foi identificada em heterozigose composta com outra mutação. Anomalias renais foram identificadas em 6 pacientes, todos com CBAVD. O presente estudo pode correlacionar o fenótipo da CAVD a alterações no genótipo de *CFTR* em 100% dos pacientes investigados.

Descritores: infertilidade masculina; azoospermia; ducto deferente/anormalidades, Regulador de Condutância Transmembrana em Fibrose Cística (*CFTR*); Fibrose Cística

Summary

Missaglia MT. Screening of mutations in the *CFTR* (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) gene of Brazilian infertile men with congenital absence of vas deferens (CAVD) [Dissertation]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2008.

Cystic Fibrosis (CF) is the most common autosomal recessive disorder in caucasians and is associated, in a wide variety of different clinical manifestations. More than 1500 mutations in the *CFTR* gene (Cystic Fibrosis regulator Transmembrane conductance) have been described and an even growing number of mutations are being currently studied worldwide. The role of *CFTR* gene is especially important in reproductive tissues of the mesonephric tract sensitive to the expression of the *CFTR* gene. The great majority of infertile males with CF (98%) have clinical manifestations and mutations in *CFTR* are responsible for the congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD), associated to the abnormalities of the seminal vesicles, ejaculatory ducts and/or the distal portion of the epididymis. The congenital absence, uni or bilateral, of the vas deferens (CAVD), in the absence of other clinical signals of CF is a known cause of male infertility present in 1%-2% of all men investigated and in about 10% of men with obstructive azoospermia. Serious considerations should be drawn about the lack of proper diagnosis of infertile males with *CFTR* that seek reproductive clinics for assisted reproductive techniques (ARTs), as well as the lack of proper considerations of the existence of this disease as a potential cause of male infertility among male partners, like urologists, andrologists and gynecologists that rush for the misuse of ARTs. The introduction of Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI), has given new reproductive potential for these couples, but again as in the majority of cases it is obstructive azoospermia, couples should be advised about proper microsurgical sperm retrieval, preferentially microsurgical epididymal sperm aspiration (MESA). As a consequence of the potential high mortality rate of the CF descendants and the high frequency of carriers, estimated in

1:25, it is highly recommended that tests for correct identification of mutations in *CFTR* gene are carried out for all patients with CAVD before considered being submitted to ICSI. In populations of homogeneous ethnic origin, the mutation $\Delta F508$ is identified in 90% of the patients with CF and between 70% and 85% of the patients with CAVD. In Brazil, where ethnic differences reflect the genetic heterogeneity, the frequency of the mutation in $\Delta F508$ varies between 23% and 50%, indicating that other mutations must have a role. Our data looked carefully in the *CFTR* gene of 20 infertile men with CAVD aiming at the identification of the most prevalent mutations in our population. Mutations had been identified in 17 patients (85%): three $\Delta F508$ representing 15% (3/20), one G542X, one 875+1G>A and 4 mutations not yet described in literature, S753R, G149W identified in two brothers, V580F and 712-1G>T. In the literature the allelic variant in IVS8 (allele 5T), either as a second mutation or in homozygosis, is directly related with the CAVD, with reported frequencies in the infertile caucasian male population varying between 21% and 30%. In the present study, 15 (15/20=75%) patients presented the *CFTR* mutation in the IVS8/5T: eight of them in heterozygosis composed with another mutation. Regarding genitourinary tract malformations, kidney anomalies were identified in 6 patients, all with CBAVD. In the present study we could correlationate the phenotype of the CAVD with the genotype alterations of *CFTR* gene in 100% of the investigated patients.

Descriptors: infertility, male; azoospermia; vas deferens/ abnormalities; Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (*CFTR*); Cystic Fibrosis.

1 – Introdução

“Disse Deus a Abraão: Quando a Sarai, tua mulher, não lhe chamarás mais Sarai, porém Sara será o seu nome. Abençoa-la-ei, e também dela te darei um filho; sim, abençoa-la-ei, e ela será mãe de nações; reis de povos sairão dela. Ao que se prostrou Abraão com o rosto em terra, e riu-se, e disse no seu coração: A um homem de cem anos há de nascer um filho? Dará a luz Sara, que tem noventa anos?” (Gn 17.15.17)

1.1 Considerações sobre a infertilidade conjugal

Infertilidade é o termo utilizado para descrever a incapacidade de um casal para obter, em espontaneamente uma gestação após doze meses de relações sexuais sem proteção e sem a utilização de métodos contraceptivos. Em doze meses é esperado que aproximadamente 85% dos casais alcancem gravidez espontaneamente (Rowe *et al.*, 2000).

Entre 10% e 15% dos casais da população mundial são considerados inférteis e, muitos deles, procuram clínicas de reprodução assistida em busca de gravidez (Evers, 2002). As causas da infertilidade variam amplamente e são diferentes nos países desenvolvidos e naqueles de regiões em desenvolvimento (Cates *et al.*, 1985). Em 1993 estimou-se que cerca de dois milhões de novos casos de infertilidade conjugal sejam diagnosticados (Rowe *et al.*, 1993).

A infertilidade é um problema que afeta homens e mulheres em todo o mundo. O homem é responsável por cerca de 40% dos problemas de infertilidade, problemas femininos correspondem a outros 40% e os 20% restantes são a somatória dos problemas de fertilidade do casal (Rowe *et al.*, 2000).

Alguns fatores de infertilidade são comuns aos homens e às mulheres, como: medicamentos, drogas, doenças infecciosas, doenças crônicas, fatores ocupacionais e ambientais, estresse, fatores imunológicos, tabagismo, idade avançada, radiações ionizantes, alterações hormonais, alterações genéticas, agentes químicos, desnutrição e neoplasias (Rowe *et al.*, 2000).

Portanto, quando um casal procura as clínicas de reprodução

assistida, é importante que eles passem por uma investigação completa que inclui: anamnese, exame físico, exames laboratoriais e complementares, para a detecção da causa da infertilidade podendo, assim, o especialista orientar o casal acerca do melhor tratamento a ser seguido, sempre visando menor risco, buscando como primeira opção oferecer gravidez natural ou, por fim, optar pela técnica de reprodução humana assistida mais adequada a cada caso.

1.2 Considerações sobre a infertilidade masculina

As causas da infertilidade masculina, além das supracitadas, são: varicocele, criptorquidia, ectopia testicular, testículos retráteis, hipoplasia testicular, caxumba, vasectomia, torção testicular, azoospermia obstrutiva e azoospermia não obstrutiva (WHO, 1992).

Para a adequada caracterização da infertilidade e de sua causa, é fundamental que seja realizada anamnese detalhada do casal. O registro das informações deve ser feito em ficha padrão contendo dados epidemiológicos do paciente e da esposa, com atenção especial à etnia, ascendência e procedência do casal e de suas famílias, tempo de casamento, filhos, perdas gestacionais anteriores ou anos de tentativa de obtenção de gestação sem sucesso. A história clínico-cirúrgica deverá incluir dados sobre doenças da infância, informações sobre os diversos aparelhos e sistemas, cirurgias, uso crônico ou não de medicamentos ou de drogas ilícitas, consumo de cafeína e álcool. O exame físico deverá ser minucioso, realizado em sala à temperatura ambiente com iluminação externa permitindo contraste suficiente para que seja possível distinguir as varicosidades do plexo pampiniforme sob a pele. O diagnóstico de varicocele é usualmente realizado no exame físico (com o paciente em posição ortostática) pela palpação do cordão espermático antes e durante a manobra de Valsalva (Jarow, 2001). Essas alterações vasculares foram arbitrariamente divididas em três graus, baseado nos achados clínicos: varicoceles grau III são visíveis sem Valsalva, as grau II são visíveis com Valsalva e as grau I são palpáveis somente durante a manobra de Valsalva.

Varicoceles detectadas apenas com a utilização de ultra-som são denominadas sub-clínicas.

Devem também ser identificadas envergadura, distância pube-planta e estatura em metros (m), peso em kilogramas (kg), índice de massa corpórea ($IMC = \text{peso}/\text{estatura}^2$), estágios da maturação sexual segundo TANNER. Para a medida do volume testicular emprega-se o orquidômetro de Prader, capaz de estimar volumes variando de 1mL a 25 mL (Prader, 1966), e também o paquímetro, que permite a mensuração testicular em seus três eixos.

Dentre os exames laboratoriais devem ser solicitadas dosagens dos hormônios FSH, LH, testosterona livre e total, prolactina e duas amostras de ejaculado obtido por masturbação com tempo de abstinência entre 2 e 5 dias para a realização da análise seminal, com uma janela de no mínimo 15 dias entre elas para melhor avaliação (WHO, 1992).

1.3 Considerações sobre a análise seminal

A análise seminal é um exame realizado em duas etapas: a) macroscópica, que verifica os parâmetros como: volume, cor, viscosidade, liquefação e pH; b) microscópica, que verifica a concentração total dos espermatozóides e por mililitro de ejaculado, motilidade e morfologia, existência de células redondas (leucócitos e/ou células germinativas imaturas) que, quando em número superior a 1 milhão/mL, pode indicar infecção devendo, então, ser realizado o teste para verificação de leucocitospermia (Teste de Endtz), capaz de distinguir os polimorfonucleados (neutrófilos) por meio da reação de peroxidase (WHO, 1992).

Na análise seminal os parâmetros verificados na etapa macroscópica do exame são preditivos de alguns quadros clínicos. Quando, por exemplo, o volume do ejaculado for inferior ao normal (ref: 2mL a 5mL) pode ser indicativo de processo inflamatório crônico, ejaculação retrógrada, anormalidades de glândulas sexuais acessórias, ausência ou hipoplasia de vesículas seminais, obstrução do ducto ejaculatório ou ausência dos ductos

deferentes. Quando o volume é acima do normal deve-se suspeitar de infecção aguda nas glândulas anexas, grandes períodos de abstinência ou uso de antibióticos (WHO, 1992).

Alterações no pH (ref: 7,2 a 7,8) também podem indicar alguma afecção. O pH seminal é determinado pelas secreções da próstata e das vesículas seminais e, quando superior ao valor normal deve-se suspeitar de infecção ou prostatite; porém quando o pH for menor que o normal deve-se suspeitar de agenesia ou oclusão das vesículas seminais e/ou obstrução do ducto ejaculatório (WHO, 1992).

A análise seminal, juntamente com o exame físico e outros exames laboratoriais, sugere infertilidade quando apresenta resultados diferentes dos valores estabelecidos como referência. Quanto à concentração (ref: ≥ 20 milhões/mL), valores inferiores ao normal caracterizam as oligozoospermias, que podem ser leves (> 5 milhões/mL e ≤ 20 milhões/mL), moderadas (> 1 milhão/mL e ≤ 5 milhões/mL) ou graves (≤ 1 milhão/mL); existem ainda as azoospermias, caracterizadas pela ausência total de espermatozóides no ejaculado, mesmo após centrifugação em tubo com posterior citocentrifugação e a criptozoospermia, quando são encontrados somente alguns raros espermatozóides em todo o ejaculado. Quanto à motilidade total (ref: $\geq 50\%$ móveis) valores inferiores ao de referência definem a astenozoospermia e finalmente, quanto à morfologia (ref: critério estrito $\geq 14\%$), valores inferiores ao normal caracterizam a teratozoospermia (Kruger, 1987; WHO, 1992).

Dentre os 40% da população masculina que apresenta problemas de fertilidade, aproximadamente 15% são causados por azoospermia (Bhasin, 2007). A azoospermia pode ter duas formas, uma causada pela ausência de espermatogênese, ou seja, azoospermia não obstrutiva, como em alguns casos de microdeleção do cromossomo Y, síndrome de Klinefelter e uso de quimioterápicos (ESHRE, 2007; Bhasin, 2007), e a outra em que a espermatogênese é normal, mas os espermatozóides falham em serem eliminados na ejaculação devido a processos obstrutivos congênitos ou adquiridos nos ductos deferentes ou ejaculatórios, ou seja, azoospermia

obstrutiva como é o caso da pós-vasectomia e da ausência congênita bilateral dos ductos deferentes (CBAVD) (Jequier & Holmes, 1984; Schlegel & Girardi, 1996; Schlegel, 2004; Bhasin, 2007).

1.4 Considerações sobre o desenvolvimento dos ductos mesonéfricos no homem: o normal e o patológico

Os aparelhos urinário e genital possuem origem embriológica em comum, uma vez que ambos se formam a partir do mesoderma intermediário, ambos têm relação com a cloaca e tanto os genitais masculino quanto o feminino se constituem a partir de modificações dos pronefros e mesonefros (Moore & Persaud, 2005).

No início da 4ª semana de gestação o mesoderma intermediário da região cérvico-torácica dá origem aos pronefros, cujos ductos orientam-se no sentido caudal abrindo-se na cloaca. Como são estruturas transitórias, ao longo da 4ª semana os pronefros degeneram enquanto seus ductos persistem e se transformam nos ductos mesonéfricos. Ao longo dos ductos mesonéfricos desembocam aproximadamente 40 túbulos mesonéfricos, que partem de suas respectivas cápsulas glomerulares, compondo os mesonefros ou rins provisórios (Moore & Persaud, 2005).

Durante a quinta semana os ductos mesonéfricos, em sua porção mais próxima à cloaca, evaginam originando os brotos uretéricos ou divertículos metanéfricos, primórdios dos rins permanentes dos vertebrados superiores (figura 1).

A porção proximal de cada ducto mesonéfrico torna-se altamente contorcida e, ao final, resulta na formação do epidídimo. A porção medial do ducto mesonéfrico adquire um espesso revestimento de músculo liso e origina o ducto deferente. Evaginações laterais na extremidade caudal de cada ducto mesonéfrico dão origem às vesículas seminais e ao ducto mesonéfrico, entre o ducto das vesículas e a uretra evolui para ducto ejaculatório (Moore & Persaud, 2005).

Figura 1: Desenvolvimento do rim permanente

Figura 1: **a** Representação esquemática de embrião de 5 semanas em vista lateral mostrando o mesonefro em processo de degeneração e o primórdio do metanefro ou rim permanente; nos esboços indicados pelas letras **a**, **b** e **c** o desenvolvimento entre a 5ª e a 8ª semanas de gestação indicando o surgimento da pelve renal em **b**; dos cálices em **c**; e em **d** o rim já com cálices renais (em bege) e a medula / pirâmides renais (em magenta) inseridas no córtex renal (em rosa).

A ausência simultânea de todas essas estruturas resulta de erro na expressão gênica durante a fase embrionária, podendo também resultar em estruturas rudimentares ou vestigiais (Moore & Persaud, 2005).

A ausência congênita dos ductos deferentes está presente em cerca de 1% dos homens inférteis e em 0,5% das autópsias (Wagenknecht *et al.*, 1983). Entre os homens atendidos por infertilidade a ausência bilateral é quatro vezes e meia mais freqüente (Casals *et al.*, 2000; Schlegel *et al.*, 1996) uma vez que a forma unilateral é compatível com fertilidade dentro dos limites da normalidade. Dentre as formas unilaterais existe ligeiro predomínio de ausência à esquerda (Schlegel *et al.*, 1996).

Com freqüência, a ausência de deferentes está acompanhada de

agenesia renal e, quando isso acontece, a ausência de deferente é mais freqüentemente unilateral (Donohue & Fauver, 1989).

1.5 Considerações sobre a infertilidade masculina causada pela ausência congênita dos ductos deferentes (CAVD) e anomalias urogenitais

A CAVD é responsável por 1% a 2% de todos os casos de infertilidade masculina e é responsável por 10% dos casos de azoospermia obstrutiva (Radpour *et al.*, 2007).

A ausência dos ductos deferentes pode ser unilateral (CUAVD), ou bilateral (CBAVD) como mostra a figura 2, e é causada por mutações no gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) em número variável de casos (Vohra & Morgentaler, 1997).

A associação entre a ausência dos ductos deferentes e o gene *CFTR*, causador da doença fibrose cística deu-se, pois entre 65% a 95% dos homens com a doença fibrose cística (FC) (Ginzburg *et al.*, 1995) apresentam ausência congênita ou obstrução dos ductos deferentes (CAVD) bilateralmente e da porção distal dos epidídimos (Heaton & Pryor, 1990).

Anomalias urogenitais originadas do mau desenvolvimento do ducto mesonéfrico (Wolffian), antes da sétima semana da gestação, no momento em que a separação do bulbo uretral é definitiva, podem coexistir com a ausência dos ductos deferentes devido à origem embriológica dessas estruturas ser muito próxima (Hall & Oates, 1993). Homens com CBAVD a incidência de anomalias renais varia de 14% a 21% (Augarten *et al.*, 1994; Dumur *et al.*, 1995; Schlegel *et al.*, 1996).

Figura 2: Anomalias congênitas urogenitais

Figura 2: A) Foram consideradas apenas as anomalias congênitas renais associadas à anomalias dos ductos deferentes; A1) representação do aparelho urogenital masculino normal, A2) Rim pélvico à direita associado a ausência bilateral dos ductos deferentes, A3) Agenesia renal à esquerda ipsilateral à ausência do ducto deferente; B) Foram considerados somente as anomalias congênitas das vesículas seminais com as demais estruturas normais; B1) representação de hipoplasia bilateral; B2) representação de agenesia à direita e normal à esquerda; B3) representação de agenesia bilateral; C1) hipoplasia de cabeça e corpo do epidídimo associada à hipoplasia de ducto deferente; C2) ausência da cauda do epidídimo; C3) ausência segmentar do ducto deferente e de parte do epidídimo. Todas as associações de malformações são apenas ilustrativas e não representam todas as anomalias existentes clinicamente.

Na grande maioria dos casos de CAVD uni ou bilateral, a espermatogênese encontra-se preservada podendo, esses espermatozoides, ser utilizados nas técnicas de reprodução humana

assistida como a injeção intracitoplasmática de espermatozóides (do inglês: *intracytoplasmic sperm injection* ou ICSI) (Vohra & Morgentaler, 1997).

A maioria desses casos, a agenesia renal é unilateral, podendo estar associada a ocasionais anormalidades como ectopia ou má rotação renal (Vohra & Morgentaler, 1997). Para alguns autores os casos de CBAVD com agenesia renal associada a resultados negativos nas pesquisas de mutação, sugerem que as anomalias urogenitais possuem diferentes etiologias que não mutações em *CFTR* (Augarten *et al.*, 1994; Casals *et al.*, 1995, Schlegel *et al.*, 1996).

Pacientes com ausência unilateral congênita dos ductos deferentes (CUAVD) podem ser classificados em dois subgrupos: férteis e inférteis (Donohue & Fauver, 1989). A grande maioria dos homens com CUAVD apresenta desenvolvimento testicular normal e, na ausência de anomalias dos ductos ipsilaterais eles podem se apresentar com a fertilidade preservada (Vohra & Morgentaler, 1997). Quando os pacientes com CUAVD se apresentam, é necessário que se investigue a presença de anomalias mesonéfricas contralaterais (Vohra & Morgentaler, 1997) como ausência das vesículas seminais, obstrução epididimária ou do ducto ejaculatório (Hall & Oates, 1993).

Homens férteis com CUAVD usualmente são reconhecidos somente no momento da cirurgia de vasectomia (Donohue & Fauver, 1989).

A incidência da CUAVD permanece em aberto, Mulhal e Oates em 1995 consideraram incidência entre 0,5% a 1% da população masculina geral. Quando a cirurgia de vasectomia é realizada, a frequência de CUAVD encontrada foi de 0,06% a 0,8% (Klapproth & Young, 1973; Schmidt, 1966).

A incidência de anomalias renais com CUAVD depende da população estudada. No estudo realizado por Donohue e Favuer, 79% dos homens com CUAVD apresentam agenesia renal ipsilateral. A maioria dos pacientes era fértil e apresentavam problemas no trato urinário, incluindo falência renal (Donohue & Favuer, 1989).

A frequência de pelo menos uma mutação em um dos alelos de *CFTR* de homens com CUAVD pode chegar a 43% (Mickle *et al.*, 1993).

1.6 Considerações sobre a Fibrose Cística (FC)

A fibrose cística é a afecção autossômica recessiva de maior prevalência nos caucasianos, sendo que 1 em cada 2.500 nativos apresenta a doença (homozigotos) e 1 em cada 25 indivíduos é portador “sub-clínico”, ou seja, heterozigotos na Europa (Stuppia *et al.*, 2005).

A doença, conhecida desde a Idade Média como “Feitiço da criança salgada”, pois já naquela época a presença do suor salgado apresentava valor preditivo importante no óbito precoce dessas crianças, é hoje conhecida como Fibrose Cística (FC). O termo FC foi atribuído durante a década de 30, e em 1945 Farber propôs a denominação Mucoviscidose, em função do aumento generalizado da viscosidade dos mucos corpóreos nos indivíduos afetados (Farber, 1945).

A incidência da FC e a frequência de mutações causadoras da doença variam entre os diferentes grupos étnicos e regiões geográficas do mundo (Kerem *et al.*, 1997), dificultando o diagnóstico e a prevenção da doença.

Recentemente, De Boeck e colaboradores classificaram pacientes com fibrose cística em duas categorias: os portadores típicos e os atípicos (De Boeck *et al.*, 2006).

O quadro completo da FC é caracterizado por: infecção broncopulmonar crônica, disfunção intestinal secundária a insuficiência pancreática, elevação dos níveis de cloreto no suor tornando-o salgado e, nos indivíduos do sexo masculino, ausência dos ductos deferentes resultando em infertilidade (Tuerlings & Kremer, 2000). Os pacientes diagnosticados como portadores da fibrose cística típica ou clássica, devem apresentar mais de uma característica fenotípica da doença e ter o teste do suor com concentração do íon cloreto superior a 60mmol/L (De Boeck *et al.*, 2006).

Os pacientes classificados como atípicos ou portadores da forma não clássica da FC são aqueles que apresentam pelo menos um sistema afetado (pancreatite exócrina, ou doença pulmonar ou ausência dos ductos deferentes) e o teste do suor indicando valores normais (inferiores a

30mmol/L) ou limítrofes (entre 30 a 60mmol/L). A identificação das mutações em *CFTR* tanto nos indivíduos com forma típica quanto nos atípicos, é importante para aconselhamento genético mais adequado, na medida em que a FC tem padrão de herança autossômica recessiva conferindo risco de recorrência de 25% à irmandade dos afetados (De Boeck *et al.*, 2006).

1.7 Considerações sobre o gene *CFTR* e sua proteína

O gene envolvido na etiologia da FC é o *CFTR*, mapeado em 1989 no braço longo do cromossomo 7 na região 31.2 a 31.3 (7q31.2q31.3) (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989). *CFTR* é constituído por 27 éxons (figura 3) que se estendem por aproximadamente 250kb (Zielenski *et al.*, 1991).

CFTR se expressa minimamente em vários tecidos, mas é nas células epiteliais de tecidos com função exócrina como pele, pulmão, pâncreas, glândulas sudoríparas, fígado, intestino grosso, testículo e ductos deferentes que sua produção é expressiva, resultando em proteína transmembrana de 1480 aminoácidos, ricamente glicosilada, que funciona como canal regulador do fluxo do íon cloreto (Kerem *et al.*, 1989; Riordan *et al.*, 1989).

Figura 3: Esquema ilustrando o segmento de DNA com a organização dos 27 éxons do gene *CFTR*

Figura 3: A) Proteína com os respectivos domínios e um modelo da proteína situada na membrana (modificado de Welsh & Smith, 1995); B) esquema indicando quais os éxons que determinam cada um dos domínio da proteína CFTR.

CFTR possui estrutura modular composta por dois grandes blocos de domínios transmembrana (MSD1 e MSD2 do inglês: *membrane spanning domain*) que revestem o canal, dois domínios citoplasmáticos de ligação a nucleotídeos (NBD1 e NBD2, NBD do inglês: *nucleotide*

binding domain), com motivos para interação com o ATP, e um único domínio Regulador (R) que controla a atividade do canal de acordo com seu estado de fosforilação (Ostedgaard *et al.*, 2001). A organização da molécula evidencia dois grandes motivos ligados por um domínio regulador (NH₂-MSD1-NBD1-R-NBD2-MSD2-COOH), conforme mostra a figura 4.

Figura 4: Estrutura modular da proteína CFTR

Figura 4: Representação esquemática da estrutura da proteína CFTR inserida na membrana apical celular. Os domínios MSD1 e MSD2 correspondem aos doze domínios transmembrana que formam o revestimento interno do canal (em verde estão representados os dois sítios importantes de glicosilação). Nos sítios NBD1 e NBD2 ocorre a ligação do ATP, que regula a abertura e o fechamento do canal para os íons cloreto (representados em azul), auxiliados pelo domínio regulador.

CFTR é sintetizada no retículo endoplasmático como proteína imatura de 140kDa, que sofre glicosilação inicial apenas em sua porção

central (núcleo de glicosilação), o que lhe confere peso molecular de 150kDa. Essa forma ainda imatura é precursora da forma madura com 170-190kDa, completamente glicosilada, especialmente em sua quarta alça extracelular, nas asparaginas de posição 894 e 900 (N894 e N900; Sheppard & Welsh, 1999). Enquanto a forma imatura é sensível à endoglicosidase H (endo-H), a forma madura é resistente à endo-H (Riordan, 2005).

A síntese de CFTR núcleo-glicosilado leva 45 minutos e sua meia vida é de trinta minutos. Proteínas com mutação ficam completamente sujeitas à degradação proteossômica em pouco tempo, enquanto 50% a 80% das formas normais são degradadas, dependendo do tecido. Apenas 20% a 50% são convertidas na forma madura de CFTR (Riordan *et al.*, 1989). Essa demora e ineficiência na maturação conformacional de CFTR é fruto da complexidade na síntese de seus segmentos hidrofílicos e hidrofóbicos que vão se ligando incorretamente à membrana do retículo endoplasmático, interrompendo a adequada dobradura de seus domínios. Além disso, como a forma imatura é bem menos compacta, ela é muito sensível à ação de proteases (Riordan *et al.*, 1989).

Nesse sentido, qualquer alteração na seqüência de aminoácidos que aumente, ainda que de forma sutil, o tempo de permanência da proteína nascente no retículo endoplasmático, será desastroso para a concentração total do produto final maduro da proteína, na medida em que a expõe por mais tempo à ação das proteases e, conseqüentemente, ao controle de qualidade do retículo endoplasmático (Riordan *et al.*, 1989).

Após sua síntese no retículo endoplasmático, CFTR deverá ser transportada para que assuma sua posição definitiva de proteína transmembrana. CFTRs que não adquirem sua conformação final não transpõem o controle de qualidade do retículo endoplasmático e são eliminadas pelo sistema de degradação associado ao retículo endoplasmático (ERAD – do inglês: *Endoplasmic Reticulum Associated*

Degradation) (Gelman *et al.*, 2002). O controle de qualidade do retículo endoplasmático é constituído por várias enzimas e chaperones, que reconhecem as proteínas maduras e completamente glicosiladas, interiorizando as mesmas em vesículas do retículo endoplasmático recobertas por COPII, que coordenam o brotamento de vesículas de exportação do retículo endoplasmático. Assim, CFTRs íntegras e maduras são cooptadas pela maquinaria de exportação do retículo endoplasmático associada à COPII (Yoo *et al.*, 2002).

A seqüência de aminoácidos de CFTR participa com sinais que são reconhecidos pelo sistema COPII de exportação do retículo endoplasmático. Os aminoácidos responsáveis por isso são motivos diacídicos ou hidrofóbicos localizados no NBD1 que, reconhecidos pelas COPII, empacotam a proteína dentro da vesícula facilitando sua exportação. Assim, mutações como a $\Delta F508$, situada no NBD1, impedem o adequado dobramento e empacotamento de CFTR, aumentando o tempo de permanência da proteína no retículo endoplasmático, e reduzem a ativação do sistema COPII de exportação, garantindo sua total degradação pelo controle de qualidade do retículo endoplasmático. Nesse sentido, variantes polimórficas como o M470 (M470V), que atrasa a mobilidade de CFTR em 25%, podem ser cruciais no quadro geral da fisiologia do canal, e a associação de polimorfismos que individualmente possuem pouco impacto sobre CFTR pode ser desastrosa e atuar como mutações graves (Yoo *et al.*, 2002). No entanto, a variante V470 possui outra característica ainda mais dramática, que consiste na alteração da eficiência do processamento do RNAm de *CFTR* com proporção aumentada de ausência do éxon 9 (Meeus *et al.*, 1997; Cuppens *et al.*, 1998).

Outro domínio importante no reconhecimento para a adequada exportação de CFTR é o PDZ, representado pelo tetrapeptídeo DTRL codificado pelo éxon 24 de *CFTR*. Esse tetrapeptídeo é reconhecido por determinadas proteínas PDZ e é fundamental para a ancoragem de CFTR ao citoesqueleto celular (Short *et al.*, 1998), bem como regula a

endocitose que recicla a proteína dentro da célula (Swiatecka-Urban *et al.*, 2002).

A partir da sequência de aminoácidos fica evidente que CFTR é uma proteína que pertence à família dos transportadores regulados pela ligação ao ATP (ATP Binding Cassete) também denominado transportadores ABC. CFTR, no entanto, possui uma adaptação do tradicional motivo estrutural ABC de transporte, pois, ao contrário dos demais canais de ânions que dimerizam ou necessitam e agregam sub-unidades para seu funcionamento, o canal CFTR não dimeriza nem necessita qualquer outra sub-unidade para seu adequado funcionamento que, ainda hoje, não tem elucidado todo o seu mecanismo de ação (Swiatecka-Urban *et al.*, 2002).

Como proteína ABC, CFTR é regulada pelo AMPc que, por sua vez, regula as interações entre o ATP e seus domínios NBD. CFTR também é regulado pela fosforilação, pela PKA, de pelo menos nove sítios representados pelas serinas com posição 660*, 686, 700, 712, 737, 768, 788, 795*, 813* (os asteriscos indicam os sítios mais importantes) além de um sítio alternativo de fosforilação na serina de posição 753. Com a fosforilação pela PKA ocorre mudança de conformação espacial de toda a proteína CFTR e também no domínio R (Grimard *et al.*, 2004).

A abertura e o fechamento do canal CFTR são regulados pelo balanço entre a atividade das quinases e fosfatases, bem como pelos níveis de AMPc celular (Cai *et al.*, 1999). A ativação da PKA, dependente de AMPc acarreta a fosforilação de vários resíduos de serina no domínio R (mencionados acima). Uma vez fosforilado o domínio R, a abertura do canal é regulada por ciclos de hidrólise dos ATPs ligados aos NBD1 e NBD2. Por fim, ocorre a desfosforilação do domínio R pelas fosfatases o que leva o canal novamente a seu estado quiescente (Grimard *et al.*, 2004).

O canal CFTR mede aproximadamente 5,3Å de diâmetro, é permeável a um grande número de ânions como o cloreto e o

bicarbonato (HCO_3^-) que direciona para o exterior da célula (Egan *et al.*, 1992). Aminoácidos conservados e com carga positiva localizados em determinados domínios transmembrana, determinam a condutância e a especificidade aniônica do canal, além de influenciar o aporte de ATP extracelular (Reisin *et al.*, 1994) e o transporte do HCO_3^- (Choi *et al.*, 2001).

1.8 Considerações sobre as classes de mutações

Mais de 1.500 mutações já foram descritas em *CFTR* e refletem todas as classes de mutações com graus variados de comprometimento da função da proteína como descrito no site (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>). As mutações em *CFTR* podem ser divididas em cinco classes (Welsh & Smith, 1993; Wilschanski *et al.*, 1995) de acordo com o grau de comprometimento que acarretam (Tabela 1).

Classe I: mutações que resultam na ausência da proteína por parada prematura na leitura ou alteração nos sítios de processamento do RNAm (do inglês *ribonucleic acid*, ácido ribonucléico mensageiro) resultando em proteína truncada, instável e facilmente degradável.

Classe II: resultam em proteínas incapazes de sofrer maturação sendo rapidamente degradadas; o melhor exemplo de mutação desta classe é a mutação mais comum, a ΔF508 .

Classe III: mutações que não impedem a maturação da proteína e sua migração e localização na membrana apical das células, porém resultam em proteína com propriedades regulatórias anômalas do canal de cloro.

Classe IV: mutações que resultam em canais com propriedades de condutância anormal, pois estão localizadas em aminoácidos que compõem o poro condutor.

Classe V: mutações que resultam em proteínas com alguma função preservada.

Tabela 1: Esquema ilustrando as classes de mutações no gene *CFTR*

Classificação das mutações em <i>CFTR</i>		
Classe da Mutação	Efeito da mutação sobre a Proteína	Mecanismos mutacionais (exemplos)
I	Síntese reduzida ou ausente	Mutações <i>nonsense</i> , <i>frameshift</i> , ou de <i>splice-junction</i> (G542X; 2184delA; 1717-1G>A)
II	Bloqueio no processamento protéico com aumento da degradação no retículo endoplasmático.	Mutações <i>missense</i> ou deleções de aminoácidos (Δ F508)
III	Bloqueio na regulação do canal de cloro por alteração nos domínios que respondem ao AMPc	Mutações <i>missense</i> (G551D; N1303K; G85E)
IV	Alteração na condutância do canal de cloro reduzindo seu tempo de abertura	Mutações <i>missense</i> (R117H; R347H; S1251N)
V	Redução na síntese ou defeito no processamento de uma proteína normal	Mutações <i>missense</i> e processamento alternativo (A455E; 3849+10KbC>T)

Tabela 1: termos em *itálico*, do inglês traduzidos no vocabulário e descritos no glossário, fonte (modificado do artigo Wilschanski *et al.*, 1995)

As classes de mutações I, II e III são consideradas mutações graves, e as classes IV e V são mutações consideradas moderadas (Welsh & Smith, 1993; Wilschanski *et al.*, 1995).

A maioria das mutações em *CFTR* é constituída por mutação de ponto, em que somente um nucleotídeo encontra-se alterado na seqüência do DNA (Cuppens & Cassiman, 2004). No entanto, a Δ F508, que é uma das mutações mais comuns, é causada por uma deleção de três nucleotídeos no gene, correspondendo à ausência de um único aminoácido, a fenilalanina,

na posição 508 da proteína CFTR.

Pacientes com a forma clássica de FC têm mutações graves em cada um dos alelos de *CFTR*, geralmente mutações classes I, II ou III, como a $\Delta F508$, presente em 70% dos cromossomos dos pacientes com FC (Quinton, 1999). Pacientes com fenótipo menos graves, como aqueles que apresentam função pancreática normal e apenas leves sinais pulmonares podem ser heterozigotos compostos por mutações que comprometam menos a função protéica ou por uma mutação grave em um alelo de *CFTR*, e uma mutação menos grave no outro, ou ainda mutações com perda moderada em ambos os alelos do gene (The Cystic Fibrosis Genotype Phenotype Consortium, 1993).

Mutações específicas, usualmente com menor comprometimento da função da proteína CFTR, podem manifestar isoladamente a CAVD, com ausência de outros sintomas. Entre 60% e 70% dos homens com ausência congênita bilateral dos ductos deferentes (CBAVD) sem sintomas clínicos de fibrose cística, têm mutações detectáveis no gene *CFTR* (Ferlin *et al.*, 2007).

A sequência intrônica 8 do gene *CFTR*, conhecida como alelo 5T, é de relevância para a caracterização de alguns quadros clínicos relacionados à FC. A variação do número de timinas presentes na porção final do íntron 8, próximo ao sítio de processamento do éxon 9 (processamento do pré RNAm é altamente regulado onde os íntrons são removidos de forma eficiente para produzir o RNAm maduro), determinará a perda ou não do éxon 9 (Noone *et al.*, 2000). O éxon 9 codifica os primeiros 21% de NBF1, uma região crítica na função da proteína CFTR (Chu *et al.*, 1993).

Dentre os três tipos de alelos identificados no íntron 8 (IVS8) 5T, 7T e 9T, o alelo 9T está associado à maior eficiência do processamento que remove o íntron 8, reunindo os éxons 8 e 9. Na presença de apenas 5 timidinas, ou seja, no alelo 5T, o processamento promove a excisão total do éxon 9, resultando na redução dos níveis normais de proteína madura e funcional (Noone *et al.*, 2000).

Em pacientes 9T homozigotos a perda do éxon 9 ocorre em 1% a 13%, nos pacientes 7T homozigotos é de 12% a 25% e nos 5T homozigotos

a perda chega a ser de 66% a 90% (Dahl *et al.*, 2005).

Os alelos 5T e 7T foram descritos por Niksic e colaboradores (1999) como polimorfismos responsáveis pela expressão variável de *CFTR* e da mutação R117H (presente no éxon 4). Por exemplo, a mutação R117H associada à presença do alelo 7T resulta no quadro de CBAVD e, quando associado ao alelo 5T, a expressão fenotípica pode estar associada com doenças pulmonares com moderada gravidade e insuficiência pancreática (Noone *et al.*, 2000).

Pacientes homozigotos para o alelo 5T produzem quase que somente proteínas com ausência dos 61 aminoácidos codificados pelo éxon 9 em função de sua excisão durante o processamento do RNAm. A proteína resultante apresenta significativa redução da atividade do canal de cloro, tornando seus portadores suscetíveis às manifestações pulmonares como asma e a doença pulmonar obstrutiva crônica (DPOC) (Dahl *et al.*, 2005). O conhecimento do genótipo pode ser particularmente relevante para os indivíduos expostos a fatores de riscos adicionais, como os fumantes ou os pré-dispostos a doenças pulmonares familiares e os expostos à inalação de elementos particulados em níveis maiores que os da média da população (Garred *et al.*, 1999).

A principal associação do alelo 5T é, no entanto, com a CBAVD presente em indivíduos do sexo masculino (Dahl *et al.*, 2005). Enquanto a frequência do alelo 5T na população caucasiana é de 5%, ela é de 21% a 30% nos homens com CBAVD (Cuppens *et al.*, 1994).

1.9 Considerações sobre a CAVD e técnicas de reprodução humana assistida

Desde o primeiro nascimento resultante do uso das técnicas de fertilização *in-vitro* (FIV) e transferência embrionária em 1978 (Steptoe & Edwards, 1978), muitos casais inférteis, por causa principalmente da infertilidade feminina, vêm sendo tratados com sucesso utilizando tais procedimentos, porém outros casais, nos quais a causa da infertilidade

deriva do fator masculino grave (oligoastenoteratozoospermia – baixa concentração de espermatozóides, defeitos morfológicos ou de motilidade) ou por idade avançada da mulher, as técnicas artificiais de fertilização nem sempre são bem sucedidas sendo caracterizadas por repetidas falhas nos ciclos de FIV (Osmanagaoglu *et al.*, 1999).

Em 1992 Palermo e seus colaboradores introduziram a técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), surgindo assim novas perspectivas para esses casais (Palermo *et al.*, 1992; Van Steirteghem *et al.*, 1993). Contudo, muitas pacientes submetem-se a repetidos ciclos de ICSI antes de alcançarem a gravidez (Osmanagaoglu *et al.*, 1999).

Apesar disso, a experiência com ICSI mostra que as taxas de fertilização obtidas são melhores quando comparada com outras técnicas de fertilização *in-vitro*; os embriões obtidos possuem melhor potencial de implantação, levando em consideração o fato de que a técnica de ICSI é utilizada somente nos casos em que a infertilidade é masculina, por isso encontra-se melhores taxas de implantação (Van Steirteghem *et al.*, 2002).

A principal indicação para a ICSI são as causas graves de infertilidade masculina como os casos de oligozoospermia ou por azoospermia (Devroey & Van Steirteghem, 2004), não havendo a possibilidade do restabelecimento da fertilidade natural.

Homens com CBAVD isolada, na ausência de outros sintomas clássicos da FC, são inférteis, e se enquadram na categoria de azoospermia obstrutiva congênita. Técnicas de recuperação de espermatozóides a partir dos testículos e epidídimos, no entanto, indicam que a espermatogênese nesses homens geralmente é normal (Vohra & Morgentaler, 1997). Os gametas recuperados podem ser utilizados em técnicas de reprodução assistida como a FIV associada a ICSI. Assim, esses procedimentos transpõem a infertilidade masculina (Wong *et al.*, 2004), mas por causa da associação da CBAVD com mutações no gene *CFTR*, a prole desses homens inférteis possui risco aumentado de vir a apresentar a doença fibrose cística.

Os pacientes com CAVD portadores de uma única mutação em *CFTR*

têm risco de transmissão dessa mutação de 50% para a prole (Cuppens & Cassiman, 2004). Assumindo a chance de 1/25 da parceira ser também portadora de alguma mutação, o risco do casal vir a ter uma criança com fibrose cística é de 1/64 ($1/2 \times 1/4 \times 1/2 \times 1/4$), comparado a risco de 1/2500 na população geral (figura 5). O aconselhamento genético deve ser feito para esses casais antes que eles passem pelas técnicas de reprodução assistida, para que o cálculo do risco possa ser efetuado (Williamson, 1993; Cuppens & Cassiman, 2004), e alternativas reprodutivas possam ser analisadas, oferecidas e consentidamente realizadas.

Esses dados, em conjunto, sugerem que a análise das mutações no gene *CFTR* para os casais inférteis (Meschede *et al.*, 1998; Spurgeon, 1999; Pieri *et al.*, 2007) seja mandatória. Os métodos padrão para a pesquisa de mutações utilizados no mundo todo estão baseados na frequência das mutações para uma dada população. Usualmente esses métodos incluem a pesquisa das 20 a 80 mutações mais frequentes na população em questão e são suficientes para detectar todas as mutações nos homens inférteis dessas populações. No entanto, estudos têm mostrado que em número substancial de homens inférteis por CAVD não são detectadas mutações em *CFTR* na pesquisa de rotina (Spurgeon, 1999). Isso é particularmente verdade para populações não caucasianas ou populações heterogêneas, como a brasileira.

Figura 5: Heredograma representando a herança autossômica recessiva na FC

Figura 5: Representação esquemática da herança autossômica recessiva e de cromossomos com gene normal (integralmente em azul) e com a mutação (indicada por retângulo verde dentro do cromossomo). Quando os progenitores são portadores (heterozigotos, assintomáticos ou não), o risco para a prole é distribuído em 25% de filhos sem qualquer mutação, materna ou paterna, 50% de portadores, seja da mutação materna ou paterna com fenótipo não previsível e 25% de afetados, com fenótipo dependendo da composição de tipos de mutações presentes e de sua relação com o *background* genético específico.

1.10 Considerações sobre a Fibrose Cística no Brasil

A proporção de heterozigotos varia de um país para outro. Na Inglaterra, Dinamarca e na cidade de Quebec mais de 95% dos heterozigotos são portadores da mutação $\Delta F508$ (EWGCFG, 1990; Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium, 1990; Ferec *et al.*, 1992; Rozen *et al.*, 1992). No sul da Europa a frequência da mutação $\Delta F508$ é menor que 30% (Lucotte & Hazout, 1990) e no Brasil sua distribuição varia de 30% no norte do país a 50% na região sul (Araújo *et al.*, 2005).

Exceção feita à mutação $\Delta F508$, nenhuma outra mutação possui

freqüência maior de 1%, embora possam, em regiões específicas do globo, ser encontradas mutações com freqüências maiores como as mutações G542X, G551D, R553X, W1282X e N1303K. Para a maioria da população mundial, essas mutações constituem aproximadamente 85% a 95% de todas as mutações no gene *CFTR* (Cuppens & Cassiman, 2004). No Brasil, no entanto, a Δ F508 e a G551D não fazem mais do que 25% dos diagnósticos de FC no norte do país (Araújo *et al.*, 2005).

A população brasileira é de difícil caracterização, pois é formada por grupo de etnia heterogênea, sendo complicado calcular com precisão a freqüência das mutações e dos polimorfismos no gene *CFTR*.

No Brasil, a freqüência da Δ F508 varia entre 30,7% a 50,8% (Martins *et al.*, 1993; Raskin *et al.*, 1993; Parizotto *et al.*, 1997; Maróstica *et al.*, 1998; Cabello *et al.*, 1999; Bernardino *et al.*, 2000), o que mostra que de fato o Brasil é um país geneticamente heterogêneo (Salzano & Pena, 1987).

Mesmo em países onde a população é homogênea, é necessário aumentar o número de mutações pesquisadas. O fato é que os testes direcionados à detecção de mutações associadas à FC clássica não detectam as mutações em número substancial de homens inférteis com CAVD (Wong *et al.*, 2004). O Brasil como um país construído por várias e diferentes etnias, o adequado seria realizar a pesquisa completa no gene *CFTR*, tanto para o homem quanto para a mulher, para que dessa forma todas as possíveis mutações possam ser identificadas e os riscos associados às técnicas de reprodução humana assistida sejam minimizados (Pieri *et al.*, 2007).

No Brasil os estudos da totalidade do gene *CFTR* foram realizados dentro de programas de pós-graduação, sendo posteriormente descontinuados. O objetivo do presente estudo foi a padronização da investigação de mutações em toda a extensão do gene *CFTR*, e a tentativa de disponibilização do serviço na rede pública de saúde.

2- Objetivo

O presente estudo visou à realização da pesquisa de mutações em toda a extensão do gene *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) e dos sítios importantes de processamento do RNA, em homens onde a avaliação inicial de infertilidade masculina revelou ou sugeriu a presença de ausência ou alteração de um ou dos dois ductos deferentes e azoospermia de baixo volume.

3 – Pacientes e Métodos

Pacientes

Os 20 pacientes que constituem o presente estudo foram referidos por médicos urologistas ou eram provenientes do ambulatório de urologia/andrologia da Divisão de Clínica Urológica do Hospital das Clínicas de São Paulo da Faculdade de Medicina de São Paulo (HCFMUSP).

Após explicitação detalhada do propósito do estudo, bem como de suas limitações, os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre Esclarecido (TCLE) (anexo 1) e foram encaminhados à coleta de sangue para a extração de DNA. O projeto obteve aprovação da Comissão de Ética para Análise de projetos de Pesquisa (CAPPesq) sob o número 1013/05.

Nas tabelas 2a e 2b constam os dados clínicos e laboratoriais fornecidos pelos médicos urologistas de cada paciente. O critério de inclusão utilizado neste estudo considerou a presença de infertilidade (primária ou secundária) caracterizada por azoospermia no momento da consulta e ausência congênita uni ou bilateral dos ductos deferentes detectada ao exame físico ou azoospermia com volume do ejaculado menor que 1,5 mL em duas análises seminais.

Métodos

Fase 1 do estudo - Extração de DNA

A primeira fase deste estudo foi realizada no Laboratório do Instituto de Ciências Biomédicas da USP. Para a pesquisa foram coletadas amostras de sangue periférico em tubo a vácuo com EDTA que foram então submetidos à extração de DNA pelo método do “*Salting Out*” (Miller *et al.*, 1988). Após a extração, o DNA genômico foi submetido à quantificação, realizada por eletroforese em gel de agarose a 1% corrido juntamente com padrão *Low Mass* (Invitrogen, USA), corado com brometo de etídio e fotografado. As amostras foram identificadas e estocadas a -20°C, e alíquotas na concentração de uso (25ng/μl) foram mantidas a 4°C.

Tabela 2a: Classificação dos pacientes portadores de CAVD de acordo com os principais parâmetros físicos e laboratoriais.

Identif	idd	Ascendência	DefDir	DefEsq	EpidDir	EpidEsq	VTD (ml)	VTEs (ml)	Vol.Ejac (ml)	VarDir	VarEsq	Classif
P28	28	Português	Ausente	Ausente	não inf	não inf	não inf	não inf	não inf	não inf	não inf	CBAVD
P81	48	Libanes	Ausente	Ausente	nl	nl	14	4,5	1,2	1	2	CBAVD
P201	38	Espanhol/Portugues	Hipopl	Presente	nl	anteriorizado	17	14	3,5	1	3	CUAVD
FC01	39	Espanhol/Portugues	Ausente	Ausente	nl	nl	nl	nl	0,9	3	2	CBAVD
FC02	28	Italianos	Presente	Presente	cisto grande de cordão	cisto de cabeça	nl	nl	1,2	0	0	CBAVD
HC02	37	Brasileiro (caucasiano)	Ausente	Ausente	nl	nl	13,5	13,5	1,1	3	3	CBAVD
HC03	30	Espanhol	Ausente	Ausente	cisto cabeça	nl	nl	nl	1	0	1	CBAVD
HC04	29	Português	Ausente	Ausente	agenesia de corpo e cauda	nl	nl	nl	não inf	0	0	CBAVD
HC05	28	Português	Hipopl	Ausente	agenesia parcial	agenesia de corpo/ cauda	nl	nl	4	2	2	CBAVD?
HC06	40	Português	Ausente	Ausente	cisto cabeça	nl	20	20	1,5	0	0	CBAVD
HC07	28	Brasileiro (pardo)	Ausente	Ausente	não inf	não inf	não inf	não inf	não inf	não inf	não inf	CBAVD
HC08	25	Brasileiro (pardo)	Ausente	Ausente	não inf	não inf	20	10	não inf	não inf	não inf	CBAVD
HC09	27	Brasileiro (caucasiano)	Ausente	Ausente	nl	agenesia de corpo/cauda	13	6,7	0,6	0	0	CBAVD
HC10	36	Português	Ausente	Ausente	nl	nl	nl	nl	0,5	sc	0	CBAVD
HC11	32	Brasileiro (pardo)	Presente	Ausente	nl	Cisto cabeça	10	10	0,3	sc	sc	CUAVD
HC12		Brasileiro (caucasiano)	Ausente	Ausente	não inf	não inf	não inf	não inf	1,2	não inf	não inf	CBAVD
HC13	39	Brasileiro (caucasiano)	Hipopl	Hipopl	cheio cabeça	Cheiro cabeça	16	16	0,2	0	0	CBAVD
HC14		Português	Ausente	Presente	não inf	não inf	8,2	8	0,1	2	2	CUAVD
HC15	38	Italiano/Espanhol	Ausente	Ausente	Cabeça endurecida, agenesia de cauda	Cabeça endurecida, agenesia de cauda	13,7	11	1,4	sc	sc	CBAVD
HC16	30	Brasileiro (caucasiano)	Ausente	Hipopl	nl	nl	20	16	2	não inf	não inf	CBAVD

Identif: identificação; idd: idade; DefDir: deferente direito; DefEsq: deferente esquerdo; EpidDir: epidídimo direito; EpidEsq: epidídimo esquerdo; VTD: volume testicular direito; VTEs: volume testicular esquerdo; Vol. Ejac: volume ejaculado; VarDir: varicocele direita; VarEsq: varicocele esquerda; classif: classificação; não inf: não informado; nl: normal; Hipopl: hipoplásico; sc: sub-clínica.

Tabela 2b: Exames laboratoriais, diagnóstico por imagem e dados clínicos complementares.

Identif	Classif	VSDir	VSEsq	RimD	RimE	Cloro no Suor (mmol/L)	FSH	LH	Testo Total	PRL	Observações
P28	CBAVD	não inf	não inf	Ausente	Pélvico	não inf	não inf	não inf	não inf	não inf	
P81	CBAVD	não inf	não inf	Ausente	Presente	não inf	3,3	4,4	381	34	filho de primos 1G, calcificações pulmonares, dispepsia,proteinúria; 4 ICSI, 1 gestação, perda por rotura de membranas com 28 semanas
P201	CUAVD	nl	nl	Presente	Presente	não inf	1,0	3,9	400	3,8	1 filho de 4 anos; evoluiu para azoospermia em 1 ano [7 milhões em 2002]; BX: parada em espermátide poucos espermatozóides em 5% dos túbulos
FC01	CBAVD	não inf	não inf	Presente	Ausente	não inf	não inf	não inf	não inf	não inf	5 ICSI sem sucesso
FC02	CBAVD	nl	nl	Presente	Presente	não inf	3,4	7	12,8	6,1	3 ICSI com 1 gestação de termo e RN normal
HC02	CBAVD	não inf	não inf	Presente	Presente	46 lim	não inf	não inf	não inf	não inf	nefrite com 11anos
HC03	CBAVD	não inf	não inf	Presente	Presente	não inf	não inf	não inf	não inf	não inf	sinusite e rinite crônicas, bronquite e pneumonias
HC04	CBAVD	não inf	não inf	Presente	Presente	não inf	1	3	383	não inf	pedra nos rins
HC05	CBAVD	nl	nl	Presente	Presente	51 lim	3,13	4,4	761	5,7	testículo amolecido
HC06	CBAVD	atrófica	atrófica	Presente	Pélvico	não inf	não inf	não inf	não inf	não inf	
HC07	CBAVD	nl	Ausente	Presente	Presente	24 nl	não inf	não inf	não inf	não inf	ICSI sem diagnóstico pré-implantacional; RN saudável
HC08	CBAVD	não inf	não inf	Presente	Presente	45 lim	não inf	não inf	não inf	não inf	
HC09	CBAVD	Ausente	Ausente	Presente	Presente	49 lim	1,9	5,6	541	5,1	criptorquidia esquerda com orquidopexia aos 18anos
HC10	CBAVD	nl	nl	Ausente	Presente	43 lim	2,05	3,6	não inf	não inf	infecções urinárias de repetição na infância
HC11	CUAVD	Atrófica	Atrófica	Presente	Presente	38 lim	3,2	1,8	776	4,6	testículo com áreas hipocogênicas sugestivas de infarto
HC12	CBAVD	não inf	não inf	Presente	Presente	não inf	não inf	não inf	não inf	não inf	biópsia testicular com parada em espermátide
HC13	CBAVD	Ausente	Ausente	Presente	Presente	48 lim	3,2	1,7	263	26	fezes pastosas e gordurosas
HC14	CUAVD	Ausente	nl	Presente	Presente	não inf	2,8	5,7	638	3,9	Durante o estudo foi identificado CA de próstata;cistos renais
HC15	CBAVD	não inf	não inf	Presente	Presente	41 lim	não inf	não inf	não inf	não inf	5 ICSI sem sucesso
HC16	CBAVD	Ausente	nl	Ausente	Presente	41 lim	não inf	não inf	não inf	não inf	trauma testicular à direita

classif: classificação; VSDir: vesícula seminal direita; VSEsq: vesícula seminal esquerda; RimD: rim direito; RimE: rim esquerdo; Testo total: testosterona total; PRL: prolactina; nL: normal; não inf: não informado; 1G: primeiro grau; lim: limitrofe; BX: biópsia testicular; CA=câncer; RN=recém nascido.

Fase 1 do estudo - Desenho de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) e padronização das Reações em Cadeia da Polimerase (PCR)

A partir da sequência selvagem (NT_007933. *Homo sapiens chromosome 7* [gi:51493052]) do gene CFTR disponível no site <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, e da delimitação do início e término de cada éxon, foram desenhados pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) para cada um dos 27 éxons do gene, bem como para o íntron 8 (IVS8). O programa utilizado para o desenho dos *primers* foi o *PrimerOut* versão 3. As reações de PCR (reação em cadeia da polimerase) foram então padronizadas para um volume final de 25µl utilizando 50ng de DNA e para cada um dos pares de *primers* foram realizados ajustes nas temperaturas de anelamento e nas concentrações de cloreto de magnésio, até que padrões bem definidos e reprodutíveis tivessem sido obtidos para todos os 27 éxons do gene *CFTR*.

As reações de PCR foram realizadas para todos os pacientes utilizando os 27 pares de *primers* para cada um deles. A sequência dos *primers* bem como sua temperatura de anelamento e a concentração de cloreto de magnésio estão indicados na Tabela 3.

Tabela 3: Descrição dos *primers* e de parâmetros das amplificações

Éxon	Temperatura °C	pb	[MgCl ₂]
1F:CAAATGACATCACAGCAGGT 1R:TCAGCTTCAGTTCATTCTTCC	56	375	[1,5uM]
2F:CCATATGCCAGAAAAGTTGA 2R:CCACCATACTTGGCTCCTAT	56	325	[1,5uM]
3F:TCTCCTTGGATATACTTGTGTGA 3R:TGGAGTTGGATTCATCCTTT	57	333	[1,5uM]
4F:TGTGTTGAAATTCTCAGGGT 4R:CCCATGGCACATATATTCTG	57	329	[1,5uM]
5F:AATGAATGCATAATAACTGAA 5R:ACTATTATCTGACCCAGGAA	53	278	[1,5uM]

Tabela 3: continuação

Éxon	Temperatura °C	pb	[MgCl₂]
6aF: TGGAAGATACAATGACACCTG 6aR: AAACCAGGACTGCTCTATGC	54	295	[1,5uM]
6bF: AAAACCTTGAGCAGTTCTTA 6bR: CAAATATGAGGTGGAAGTCT	56	301	[1,5uM]
7F: CCATTCCAAGATCCCTGATA 7R: GCACATTTTTGCAAAGTTCA	57	402	[1,5uM]
8F: GAATCCTAGTGCTTGCAAAT 8R: TTCGCCATTAGGATGAAATC	57	359	[1,5uM]
IVS8F: CCGCCGCTGTGTGTGTGTGTGTTTT IVS8R: GGATCCAGCAACCGCCAACA	60	74	[1,5uM]
9F: TAATGGATCATGGGCCATGT 9R: ACAGTGTTGAATGTGGTGCA	60	294	[1,5uM]
10F: GAATCCTGAGCGTGATTGA 10R: TTTGGGTAGTGTGAAGGGTTC	57	303	[1,5uM]
11F: TGCCTTTCAAATTCAGATTG 11R: ACAGCAAATGCTTGCTAGAC	57	210	[1,5uM]
12F: CAGTGAATCGATGTGGTGAC 12R: CCATGCTACATTCTGCCATA	56	340	[1,5uM]
13-1F: GCTAAAATACGAGACATATTGC 13-1R: TTTTTGTTTCTGTCCAGGAG	54	354	[1,5uM]
13-2F: AACTGAGACCTTACACCGTTTC 13-2R: CTGTTGTCTTTCGGTGAATG	57	380	[1,5uM]
13-3F: CACGAAGGAGGCAGTCTGT 13-3R: TGCATTCTACTCAATTGCATTC	58	339	[1,7uM]
14aF: TGACATCATACATGGCATT 14aR: CCATTATATACTGTAAAATCACAA	52	487	[1,7uM]
14bF: CACAAAGCAAAGGAAGATGA 14bR: ACCATAATGCTTGGGAGAAA	55	300	[1,5uM]
15F: AGGGTGCATGCTCTTCTAAT 15R: GGTTCAACAAAGGGCACAT	58	498	[1,5uM]
16F: TTCTGAATGCGTCTACTGTGA 16R: GCCAGGTAAGCAGTTCTGA	56	381	[1,5uM]

Tabela 3: continuação

Éxon	Temperatura °C	pb	[MgCl ₂]
17aF:ACACACTTTGTCCACTTTGC 17aR:CAAAATGAAGTCACATGGTCA	54	286	[1,5uM]
17bF:TTGTGTTTATGTTATTTGCAATG 17bR:AAATTGATAACCTATAGAATGCAG	54	360	[1,5uM]
18F:AGATGCTGTGATGAACTGAGA 18R:CAGTGACCCCTCAATTTATCTGT	55	397	[1,5uM]
19F:TGTGAAATTGTCTGCCATTG 19R:CACTTGCTTCAGGCTACTG	56	374	[1,5uM]
20F:TGAATTATGTTTATGGCATGG 20R:TGAGAAAAGTGCCTGGAGA	56	366	[1,5uM]
21F:CTTGATGGTAAGTACATGGGTGT 21R:CCCCTTTCAAAATCATTTCA	60	259	[1,8uM]
22F:GTAGTGGGGGTAGAGGGATT 22R:CCACTGGGCAATTATTTCA	56	440	[1,5uM]
23F:AAAGCTGATTGTGGCTAACG 23R:AAGCTGGATGGCTGTATGAT	56	400	[1,5uM]
24F:TGATTGTTCAAAATGCAAGG 24R:TCAATTCCCCTTACCAAATG	56	499	[1,5uM]

pb: pares de base; **[MgCl₂]:** concentração de Cloreto de magnésio

Fase 1 do estudo - Detecção de mutações-SSCP-HA e seqüenciamento

As técnicas para detecção de mutações utilizadas foram o SSCP-HA (*Single Strand DNA Polymorphism-Heteroduplexes Analysis*) em duas temperaturas e o seqüenciamento automatizado.

A detecção de mutações envolveu procedimento preliminar por SSCP-HA, técnica baseada no fato de que a conformação tridimensional de fragmentos de DNA de simples fita depende da seqüência de nucleotídeos. A diferença de um único nucleotídeo é suficiente para alterar o padrão de migração eletroforética, e se em uma reação de PCR estiverem presentes

moléculas de DNA selvagem e mutante, durante os últimos ciclos poderão se formar heteroduplexes entre esses dois tipos de moléculas (mutante/selvagem). Os heteroduplexes também terão padrão de migração eletroforética diferente dos homoduplexes (selvagem/selvagem; mutante/mutante), podendo ser diferenciados.

Os produtos de PCR foram então adicionados à 8uL solução denaturante (1:1 vol/vol) e o conjunto foi denaturado à 98°C por 5 minutos e imediatamente colocados no gelo por 20 minutos, após o que, foram aplicados em gel de poliacrilamida (*Genegel Excel Kit* – Amersham Pharmacia Biotech-GE Healthcare Life Sciences, Brasil).

Para cada fragmento foram realizadas duas corridas de eletroforese, uma a 7°C e outra a 20°C. A corrida eletroforética foi realizada em aparelho *GenePhor (Electrophoresis Unit-Genephor* – Amersham Pharmacia Biotech-GE Healthcare Life Sciences, Brasil), utilizando uma corrida de 2 horas e meia com voltagem entre 400mV e 600mV, amperagem entre 25mA e 15W. A coloração do gel foi realizada manualmente utilizando protocolo com nitrato de prata (anexo 2).

Como não estavam disponíveis controles sabidamente não portadores de mutação para nenhum dos exons, diferentes padrões de bandas foram identificados e esses fragmentos com padrão de migração diferente entre si foram submetidos a seqüenciamento automatizado.

Para o seqüenciamento foram realizadas novas amplificações por PCR do fragmento em questão, e os produtos foram purificados com o *DNA purification kit* (Amersham Pharmacia Biotech-GE Healthcare Life Sciences, Brasil) segundo protocolo do fabricante. Os fragmentos purificados foram utilizados para a montagem da reação de seqüenciamento, utilizando separadamente os *primers* direto e reverso, e os nucleotídeos do kit *CyTM5 Thermo SequenaseTM Dye terminator* (Amersham Pharmacia Biotech-GE Healthcare Life Sciences, Brasil). A leitura automática do seqüenciamento foi feita num sistema *ALF Express* (Amersham Pharmacia Biotech-GE Healthcare Life Sciences, Brasil)

Fase 2 do estudo – Reações de PCR e SSCP

Esta parte do estudo foi realizada no Instituto da Criança Professor Pedro de Alcântara do Hospital das Clínicas de São Paulo, no laboratório de investigação médica em Pediatria Clínica, LIM 36, utilizando a cuba refrigerada (*MultiTemp II thermostatic circulator*) vertical da GE Healthcare, Brasil (Hoefer SE 600 Series).

Utilizando essa metodologia, foram realizados SSCPs para os pacientes HC 15 e HC 16, que entraram por último no estudo, SSCPs para os 27 éxons, desta vez utilizando controles alterados e normais para cada éxon proveniente dos pacientes previamente estudados e seqüenciados. Esse procedimento possibilitou a validação dessa outra metodologia que foi aplicada para que o estudo fosse factível de ser aplicado na rotina do laboratório.

Dois géis de acrilamida 10% foram corridos a 10°C por 6 horas (variando de acordo com o tamanho dos fragmentos), a 47 watts em tampão TBE 1X concentrado.

A coloração do gel foi feita com nitrato de prata, em protocolo desenvolvido e adaptada no próprio laboratório, a partir de outros protocolos descritos na literatura previamente testados e utilizados (anexo 2). Depois de corado e fixado o gel foi secado na secadora de géis da Bio-Rad (*model 583 gel dryer*) por duas horas na temperatura de 80°C.

Fase 2 do estudo - Seqüenciamento

As amostras do primeiro lote de SSCPs que ainda não haviam sido seqüenciadas e as amostras com padrão alterado de SSCP em cuba vertical foram seqüenciadas utilizando o seqüenciador *MegaBace Analysis System* (Amersham Pharmacia Biotech-GE Healthcare Life Sciences, Brasil), que utiliza capilares permitindo que as amostras sejam analisadas. O seqüenciador utilizado em questão fica no Laboratório de Investigação Médica de imunologia e dermatologia, LIM 56, na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

A reação do seqüenciamento foi montada em placa para PCR

(Axygen PCR Microplate PCR-96-C 96 well PCR microplate clear) utilizando o kit *DYEnamic ET* (Amersham Pharmacia Biotech-GE Healthcare Life Sciences, Brasil) para o seqüenciador *MegaBace Analysis System*, seguindo o protocolo do fabricante e foi colocada na termocicladora a 55°C por 30 ciclos.

Após o término da reação procedeu-se a purificação e precipitação das amostras com isopropanol 80% e etanol 70%, aplicação da *Loading Solution* e introdução na câmara de aspiração do *MegaBace*.

Os eletroferogramas foram analisados visualmente utilizando o programa *Chromas Lite* (<http://www.technelysium.com.au/chromas.html>)

Fase 2 do estudo - Enzima de Restrição

Para estudo do polimorfismo presente no éxon 10, que consiste na mudança do códon GTG (Valina) para ATG (Metionina), foi utilizada a técnica de amplificação por PCR seguida de digestão por restrição. O par de primers utilizado produz um fragmento de 302p.b. que pode conter um sítio de digestão para a endonuclease (enzima de restrição) *HphI* (NewEngland BioLabs Inc., USA), que reconhece a seqüência GGTGA como mostra o esquema abaixo.

Sítio de Restrição da *HphI*

Fragmento do éxon 10 amplificado

...CTTCTAATGGTGATTATGGGA / GAA ... (Valina)

...CTTCTAATGATGATTATGGGAGAA ... (Metionina)

Após a digestão são produzidos dois fragmentos, um de 80p.b e outro de 222p.b., quando o alelo amplificado possuir o sítio de restrição, isto é, apresentar o códon para Valina (GTG). Assim, indivíduos homozigotos para Metionina, que não possuem o sítio de restrição, apresentam apenas a banda de 302p.b., indivíduos homozigotos para a Valina apresentam apenas

os dois fragmentos resultado da digestão, ou seja, um de 80p.b. e outro de 222p.b. Os heterozigotos apresentam as três bandas, de 302pb., de 80p.b. e de 222p.b.

O protocolo para análise do polimorfismo M470V utilizando a enzima HphI consistiu na utilização de 20µL de produto de PCR aos quais foram adicionados 20uL de solução contendo o tampão específico da enzima diluído em água e 3Unidades da enzima. O conjunto foi então incubado a 37°C por 18 horas. Após a digestão os produtos foram integralmente aplicados em gel de agarose 2% e submetidos à eletroforese, corado com brometo de etídio e visualizado em transiluminador utilizando luz U.V.

Fase 2 do estudo - Técnica diagnóstica do alelo 5T

O estudo do alelo 5T para os 20 pacientes foi realizado diretamente por seqüenciamento automatizado; utilizando o *primer* IVS8 especialmente desenhado para essa região polimórfica do gene *CFTR*.

De posse desses seqüenciamentos decidiu-se padronizar e validar outra técnica capaz de identificar de forma mais econômica, essa variante alélica, o PCR ASO (*allelic specefic oligonucleotyde*).

O PCR ASO é uma técnica simples e rápida capaz de distinguir os alelos 5T, 7T e 9T, e é baseada no uso de oligonucleotídeos iniciadores específicos que são adicionados ao PCR com posterior amplificação em condições pré-determinadas. Para cada paciente são feitos, 3 minitubos contendo misturas de reagentes diferentes; em todos os minitubos é colocado o *primer* direto (5`TAATGGATCATGGGCCATGT 3`) e em cada um dos 3 minitubos é colocado o *primer* reverso específico: no primeiro minitubo primers específicos para o alelo 5T (5`CCCCAAATCCCTGTTAAAAAC 3`), no segundo minitubo adiciona-se o *primer* reverso para o alelo 7T (5`CCCCAAATCCCTGTTAAAAAAAC 3`), e no terceiro minitubo o primer reverso específico para o alelo 9T (5`CCCCAAATCCCTGTTAAAAAAAAC 3`). Após a amplificação, os produtos do PCR-ASO foram submetidos a corrida eletroforética em gel de agarose 2% para verificar a presença das

bandas correspondentes a cada um dos alelos. Como padronização, as amostras são aplicadas lado a lado, na seqüência 5T, 7T e 9T para melhor identificação.

4 - Resultados

Os resultados obtidos neste estudo estão resumidos na tabela 4, e descrevem as mutações e polimorfismos encontrados nos 20 homens inférteis investigados no presente estudo.

Quanto ao fenótipo, 17 (17/20 = 85%) homens apresentaram quadro de azoospermia obstrutiva caracterizada por CBAVD e 3 (15%) por CUAVD. Dos 17 pacientes com CBAVD, 6 (6/17 = 35,3%) mostraram anomalias renais associadas, sendo 5 (5/17 = 29,4%; 5/20 = 25%) agenesias renais e um rim pélvico (1/17 = 5,9%; 1/20 = 5%); nenhum dos 3 pacientes com fenótipo de CUAVD apresentou agenesia renal associada.

Foram identificadas mutações em 10 dos 20 (50%) pacientes estudados e suas localizações podem ser vistas na tabela 4. As mutações encontradas foram: 3 mutações p.Phe508del (3/20 = 15%), uma mutação p.Gly542X, uma c.875+1G>A e 4 mutações ainda não descritas na literatura, 1) p.Ser753Arg; 2) p.Val580Phe; 3) p.Gly149Trp; 4) c.712-1G>T. As mutações p.Ser753Arg e a p.Gly149TRp foram publicadas em 2007 por nosso grupo (Pieri *et al.*, 2007).

Todas as mutações encontradas foram detectadas no rastreamento inicial por meio do SSCP e confirmadas por seqüenciamento automatizado realizado pelo menos em duplicata.

Tabela 4: Resultado da pesquisa no gene *CFTR*

Paciente	Fenótipo	Mutações	IVS8 TG _n T _n	Polimorfismos							
				Região promotora e IVS1	Íntron 6b	Éxon 10 M470V	Éxon 13	Íntron 14 a	Éxon 14a	Éxon 20	Éxon 24
P28	CBAVD + Agenesia renal		10/7 11/7			MV					
P81	CBAVD + Agenesia renal		11/5 11/7			VV	C2446T _{ht}				
P201	CUAVD		12/5 12/7			MV			T2694G _{ht}		
FC01	CBAVD + Agenesia renal		11/5 11/7			VV					
FC02	CBAVD		11/5 11/7			VV		2751+ 84ΔAT _{ht}	T2694G _{hm}		
HC02	CBAVD	ΔF508 _{ex10}	11/5 11/7			VV					
HC03	CBAVD	S753R _{ex13}	12/5 12/7			MV					
HC04	CBAVD	ΔF508 _{ex10}	12/5 10/9			MV					
HC05	CBAVD		12/5 11/7	-124delAA _{ht} -8G>C _{ht} 185+38G>T _{ht}		VV					

Tabela 4 *continuação*

Paciente	Fenótipo	Mutações	IVS8 TG _n T _n	Polimorfismos							
				Região promotora e IVS1	Íntron 6b	Éxon 10 M470V	Éxon 13	Íntron 14 a	Éxon 14a	Éxon 20	Éxon 24
HC06	CBAVD + rim pélvico	V580F _{ex12}	12/5 10/7			MM		2751+ 84ΔAT _{ht}	T2694G _{hm}		G4521A _{hm}
HC07	CBAVD	G149W _{ex4}	12/5 10/7			MV			T2694G _{ht}		G4521A _{ht}
HC08	CBAVD	G149W _{ex4}	12/5 10/7			MV			T2694G _{ht}		G4521A _{ht}
HC09	CBAVD		12/5 12/7			VV					
HC10	CBAVD + Agenesia renal		10/9 11/7			MV					
HC11	CUAVD	G542X _{ex11}	12/5 12/7		1001+11C>T _{ht}	MV					G4521A _{ht}
HC12	CBAVD		12/5 12/7	-78G>C _{ht}		VV					
HC13	CBAVD	ΔF508 _{ex10}	11/5 11/7		1001+11C>T _{ht}	MM			T2694G _{ht}		G4521A _{ht}
HC14	CUAVD	875+1G>A _{IVS 6a}	12/7 12/9			VV	G2208A _{ht}				G4521A _{ht}
HC15	CBAVD	712-1G>T _{IVS 5}	13/7 10/9			MM			T2694G _{ht}		
HC16	CBAVD+ Agenesia renal		12/7 12/9			MV	C2446T _{ht}		T2694G _{ht}	A4002G _{ht}	G4521A _{ht}

O paciente HC03 é portador da mutação nova p.S753R descrita por nosso grupo, que consiste na substituição do aminoácido serina (S) que ocupa a posição 753 na proteína e codificado pelo códon AGC no éxon 13, por uma arginina (R), resultado da alteração do códon para AGG em heterozigose. Essa alteração pode ser visualizada no seqüenciamento representado na figura 6, juntamente com imagem da alteração do padrão eletroforético do fragmento amplificado por PCR em gel de SSCP.

HC03 é caucasiano descendente de espanhóis e refere ter sido atendido por pneumologista desde a infância, por problemas respiratórios graves e crônicos, caracterizados por rinite, bronquite e pneumonias de repetição. Aos trinta anos foi encaminhado ao urologista, que identificou azoospermia por CBAVD em exame físico.

Figura 6: Imagem do gel de SSCP-HA e do seqüenciamento do éxon 13

Figura 6: A – Gel de poliacrilamida a 12,5% (*GenePhor*) do éxon 13. A seta mostra a alteração na migração das bandas do paciente HC03 **B** – Seqüenciamento, realizado no *ALF Express*, do éxon 13 do paciente HC03 mostrando a região da mutação S753R (imagem correspondente ao gel de SSCP, confirmação da alteração através do seqüenciamento).

HC06 é caucasiano de ascendência portuguesa e apresenta somente CBAVD associado a rim pélvico. O paciente é portador da mutação nova p.Val580Phe localizada no éxon 12. Essa mutação resulta da alteração do códon GTT, que codifica uma valina (V), para TTT, resultando em uma substituição da valina por uma fenilalanina na posição 580 da proteína (figura 7).

Figura 7: Imagem do SSCP-HA e do eletroferograma obtido no seqüenciamento do éxon 12 do paciente HC06

Figura 7: A – Gel de poliacrilamida a 12,5% (*GenePhor*) do éxon 12. A seta mostra a alteração na migração das bandas do paciente HC06 B – Seqüenciamento, realizado no *ALF Express*, do éxon 12 do paciente HC06 mostrando a região da mutação nova V580F (imagem correspondente ao gel de SSCP, confirmação da alteração através do seqüenciamento).

HC07 e HC08 são irmãos, pardos, filhos de brasileiros caracterizados pela miscigenação racial típica do Brasil. Ambos apresentam azoospermia por CBAVD provavelmente devida à mutação nova p.Gly149Trp (Pieri *et al*, 2007) presente nos dois e herdada no alelo materno. A mutação caracteriza-se pela troca do aminoácido glicina, codificado pelo códon GGA, pelo aminoácido triptofano, codificado pelo

códon TGG, na posição 149 da proteína, como mostra a figura 8. A alteração no códon foi resultado de uma dupla mutação, em que a base G da posição 1 do códon foi alterada para T e a base da terceira posição, representada por uma Adenina, foi alterada para Guanina. Ambas as alterações encontram-se no mesmo alelo materno, uma vez que tanto o pai dos pacientes HC07 e HC08 quanto o irmão (que apresenta duplicação dos deferentes) possuem ambos, os alelos com o códon selvagem GGA.

Apesar de possuírem o mesmo genótipo, HC07 e HC08 são discordantes quanto ao teste de cloro no suor como indicado na Tabela 2b.

Figura 8: Imagem do gel de SSCP-HA do éxon 4 e do seqüenciamento correspondente ao éxon 4 dos pacientes HC07 e HC08

Figura 8: A – Gel de poliacrilamida a 12,5% (*GenePhor*) do éxon 4. A seta indica o padrão alterado de migração do fragmento para os pacientes HC07 e HC08, na região do heteroduplex do gel. B – Seqüenciamento do fragmento revelou a mutação nova G149W (confirmando a alteração encontrada no gel de SSCP).

A quarta mutação ainda não descrita na literatura foi identificada no paciente HC15, caucasiano de ascendência européia (espanhóis/italianos), que se apresentou com azoospermia devida à CBAVD sem outras manifestações além de teste do suor com valores limítrofes (41mmol/L). A mutação foi identificada no sítio de *splicing* imediatamente anterior ao éxon 6a, portanto ainda no íntron 5 (IVS5). O sítio de *splicing* entre os exons 5 e 6a é do tipo clássico gt/ag, como mostrado abaixo:

éxon5 éxon 6a
 GATGAA[gt ag]GGACTT

Mutação com troca da base g (guanina) sublinhada por um t (timina) promove a perda do reconhecimento do local do *splicing* pelo complexo protéico responsável pelo processamento do RNAm. Assim, a denominação da nova mutação se escreve: IVS5 c.712-1G>T, onde o nucleotídeo de número 712 é a guanina que inicia o éxon 6a (figura 9).

Figura 9: Imagem do seqüenciamento do éxon 6a do paciente HC15

Figura 9: Seqüenciamento do éxon 6a (*MegaBace Analysis System*) do paciente HC15. A seta indica a região onde aparece a mutação nova IVS5 c.712-1G>T em heterozigose.

A mutação Phe508del (ou DeltaF508), presente em heterozigose nos pacientes HC02, HC04 e HC13 (todos CBAVD sem agenesia renal associada), é uma mutação de classe II, caracterizada pela deleção dos nucleotídeos CTT de número 1653 a 1655 (c.1653_1655delCTT; p.Phe508del, de acordo com <http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>), resultando na deleção do aminoácido fenilalanina na proteína, mais precisamente na posição 508.

A Phe508del acarreta falha na maturação representada por um atraso na migração da proteína nascente no retículo endoplasmático, com conseqüente degradação da proteína, que não consegue assumir sua posição na região apical da célula epitelial. No gel de SSCP é possível observar duas bandas localizadas entre a região da simples fita e do heteroduplex (HA), como mostra a figura 10, que caracteriza a presença da mutação em heterozigose.

Figura 10: Imagem do gel de SSCP-HA do éxon 10

Figura 10: Gel de poliacrilamida a 12,5% (*GenePhor*) do éxon 10. A seta indica as bandas características da mutação $\Delta F508$ em heterozigose dos pacientes HC02, HC04 e HC13. As setas indicam também a região no gel de poliacrilamida da fita simples e do heteroduplex (HA).

HC11 é portador de CUAVD e apresentou, em heterozigose, a mutação p.Gly542X (figura 11) presente no éxon 11, caracterizada pela alteração do códon GGA para códon de terminação de leitura (TGA). Como resultado, a proteína CFTR, que usualmente possui 1480

aminoácidos, fica com apenas 542 aminoácidos, o que faz da mutação p.Gly542X uma mutação de classe I, com perda total de sua função.

Figura 11: Imagem do SSCP-HA e do seqüenciamento do éxon 11 do paciente HC11

Figura 11: **A** – Gel de poliacrilamida a 10% (cuba vertical) do éxon 11 do paciente HC11. A seta mostra a banda indicativa da mutação G542X em heterozigose (os controles utilizados nesse gel foram gentilmente cedidos pelo LIM 36, Ht G542X= controle heterozigoto, Hm G542X= controle homozigoto, Ht G549= controle heterozigoto para a mutação G549 também do éxon 11). **B** – Seqüenciamento do éxon 11, realizado no *ALF Express*, do paciente HC11 mostrando a região onde aparece a alteração de um G para um T em heterozigose, responsável pela mutação p.Gly542X.

A variante alélica presente na região intrônica 8 do gene *CFTR* (IVS8), é caracterizada pela presença de 5, 7 ou 9 timinas (IVS8 5T, IVS8

7T, IVS8 9T). Os resultados estão resumidos na tabela 5. O alelo IVS8 5T é a principal mutação associada com a CAVD e, neste estudo, foi identificada em heterozigose em 15 pacientes (75%) dos pacientes, (15 dos 40 cromossomos analisados ou 37,5%). O alelo IVS8 7T foi identificado em 20 dos 40 (50%) cromossomos estudados; em heterozigose em 18 pacientes e em homozigose em um deles. O alelo IVS89T foi identificado em apenas 5 dos 40 (12,5%) cromossomos, sempre em heterozigose. As figuras 12 e 13 mostram o seqüenciamento do íntron 8 do paciente HC04 e a respectiva eletroforese em agarose com o resultado do PCR ASO do mesmo paciente.

Tabela 5: Resultados do estudo da variante alélica IVS8

Variante IVS8	9/7	9/5	7/7	7/5
CBAVD / n=11	1	1	-	9
CBAVD + anomalia renal / n=6	2	-	1	3
CUAVD / n=3	1	-	-	2
no. de pacientes	4	1	1	14
% do total n=20	20%	5%	5%	70%

Figura 12: Imagem do seqüenciamento do IVS8 do paciente HC04

Figura 12: Seqüenciamento realizado no *ALF Express*, da região do íntron 8 do paciente HC04 mostrando a seqüência de TG e T (10TG/9T e 12TG/5T) .

Figura 13: Foto do resultado do PCR ASO para IVS8

Figura 13: Gel de agarose a 2% mostrando o resultado do PCR ASO para a região do intron 8 do paciente HC04, confirmando o resultado de 5T e 9T obtido no seqüenciamento.

O polimorfismo p.M470V presente no éxon 10, em que o códon ATG, responsável pela síntese do aminoácido metionina (M) é substituído pelo códon GTG, que corresponde à síntese do aminoácido valina (V), foi investigado pela técnica de amplificação seguida de restrição enzimática utilizando a enzima HphI (figura 14), e os resultados foram confirmados por meio de seqüenciamentos. O polimorfismo M470 foi identificado em 15 dos 40 (37,5%) cromossomos estudados, estando presente em 12 dos 20 (60%) pacientes, tendo sido encontrado em homozigose em 3 deles e em heterozigose nos outros 9. O polimorfismo V470 foi identificado em 25 dos 40 (62,5%) cromossomos estudados, estando presente em 17 dos 20 (85%) pacientes, tendo sido encontrado em homozigose em 8 deles e em heterozigose nos outros 9.

Figura 14: Foto do gel de agarose com o resultado da amplificação do éxon 10 seguida de restrição pela endonuclease HphI

Figura 14: Foto do gel de agarose a 2% com o resultado da digestão da enzima de restrição HphI para todos os 20 pacientes.

Outros polimorfismos foram também encontrados neste estudo como: o polimorfismo d.T2694G, representado pela substituição de uma timina (T) por uma guanina (G) na posição 2694 do gene, resultando em uma alteração do códon 854 presente no éxon 14a de ACT para ACG, sem modificação do aminoácido correspondente (mutação silenciosa), uma vez que tanto ACT quanto ACG codificam para uma treonina p.T854T). Esse polimorfismo foi encontrado nos pacientes P201, HC07, HC08, HC13, HC15 e HC16 em heterozigose e em homozigose nos pacientes FC02 e HC06.

O polimorfismo d.G4521A no éxon 24 também é resultado de uma substituição da base de Wobble no códon 1463 (CAG por CAA) não resultando em troca do aminoácido glutamina na proteína (p.Q1463Q). Esse polimorfismo aparece em heterozigose nos pacientes HC07, HC08, HC11, HC13, HC14 e HC16 e em homozigose no paciente HC06.

Figura 15: Imagem do seqüenciamento do éxon 14a do paciente HC06

Figura 15: Seqüenciamento do éxon 14a, realizado no *MegaBace Analysis System*. A base G selecionada indica o polimorfismo T2694G em homozigose, presente no paciente HC06.

Três tipos diferentes de polimorfismos foram encontrados em heterozigose no paciente HC05: o primeiro polimorfismo consiste em

deleção de duas adeninas e foi encontrado 124 bases à montante do códon iniciador ATG no éxon 1 (-124 del AA); o segundo polimorfismo consiste na troca de guanina por citosina 8 bases antes do início do éxon 1 (-8 G>C) e o terceiro polimorfismo, representado pela troca de guanina por citosina, foi identificado no íntron 1 (IVS1), 38 bases após seu término (185+38 G>C)

Um terceiro tipo de polimorfismo de região promotora foi encontrado em heterozigose no paciente HC12 (-78G>C).

No íntron 6b foi encontrado o polimorfismo 1001+11C>T nos pacientes HC11 e HC13, ambos em heterozigose.

O polimorfismo d.G2208A presente no éxon 13 foi encontrado em heterozigose no paciente HC14, e consiste em alteração da do códon 691 de GAG para GAA sem troca do aminoácido da ácido glutâmico na proteína (p.E691E).

Outro polimorfismo encontrado no éxon 13 foi o d.C2446T, em heterozigose nos pacientes P81 e HC16 (figura 16). Embora consista na alteração da primeira base do códon 772, de CTG para TTG, não resulta na troca da leucina na proteína (p.L772L).

No íntron 14a foi identificado o polimorfismo d.2751+84ΔAT, uma deleção em heterozigose de adenina/timina na posição +84 de CFTR dos pacientes FC02 e HC06, como mostra a figura 16.

No éxon 20 foi identificado o polimorfismo d.A4002G (CCA>CCG; p.P1290P), único dos polimorfismos encontrados no presente estudo que já foi descrito na literatura. Esse polimorfismo, claramente visualizado no gel de SSCP (figura 18), foi encontrado em heterozigose no paciente HC16 e confirmado por seqüenciamento (figura 19).

Figura 16: Imagem do seqüenciamento do éxon 13

Figura 16: Seqüenciamento do éxon 13, realizado no *MegaBace Analysis System*, do paciente HC16. A base N selecionada indica a região onde aparece o polimorfismo C2446T.

Figura 17: Imagem do seqüenciamento do íntron 14a do paciente HC06

Figura 17: Seqüenciamento do íntron 14a, realizado no *MegaBace Analysis System*. A base A selecionada indica a região da deleção em homozigose das bases AT presente no paciente HC06.

Figura 18: Imagem do gel de SSCP do éxon 20

Figura 18: Gel de poliacrilamida a 10% (cuba vertical) do éxon 20 do paciente HC16. A seta mostra a banda indicativa do polimorfismo A4002G (Normal = controle normal, HC16M = esposa do paciente HC16).

Figura 19: Imagem do seqüenciamento do éxon 20 do paciente HC16

Figura 19: Seqüenciamento do éxon 20 (*MegaBace Analysis System*) do paciente HC16. A base N selecionada indica o polimorfismo A4002G em heterozigose.

Em resumo, o presente estudo identificou 11 tipos diferentes de polimorfismos (excetuado M470V), sendo 10 deles ainda não descritos na

literatura.

Polimorfismos sem associação a qualquer outra mutação ou IVS8 5T foram identificados em apenas 3 (P28, HC10 e HC16), todos portadores de CBAVD com agenesia renal associada.

Polimorfismos associados a outras mutações (incluído IVS8 5T) foram identificados em 14 pacientes e 3 pacientes (FC01, HC02 e HC09) apresentaram apenas mutações, sem qualquer associação de polimorfismos.

5 - Discussão e Conclusões

Em 1971 foi sugerido que homens com CBAVD seriam portadores de uma forma pouco usual e leve de FC, inadequadamente denominada forma genital da FC. Com o mapeamento de *CFTR*, estudos sistemáticos de fato identificaram mutações e selaram a associação entre *CFTR* e CAVD. Mas a questão estava longe de haver sido solucionada. Hoje, após mais de 1.500 mutações e quase 600 polimorfismos identificados em *CFTR*, ainda existem dificuldades de classificação da doença e estabelecimento de estratégias eficientes de rastreamento de mutações, especialmente daquelas mais raras.

Segundo a mais recente classificação, proposta por De Boeck e seus colaboradores em 2006, existem duas formas de FC, a clássica, em que os pacientes se apresentam com pelo menos um sinal clínico característico da FC associado com níveis superiores a 60mmol/L de cloreto no teste do suor, e a forma não-clássica, em que os pacientes apresentam acometimento de um órgão ou sistema e teste do suor com resultados limítrofes (30 a 60 mmol/L) ou normais, usualmente acompanhados de suficiência pancreática (De Boeck *et al.*, 2006).

Dos 20 pacientes analisados no presente estudo, somente em 50% deles foi possível o acesso aos resultados do teste do suor, e destes somente um apresentou valor dentro dos limites da normalidade; os outros nove tiveram resultados limítrofes. Todos eles apresentavam pelo menos um sistema afetado, ou seja, anomalias urogenitais caracterizadas por CAVD uni ou bilateral, associada ou não a anomalias renais (agenesia, ectopia ou cálculos). Partindo da classificação proposta por DeBoeck e colaboradores (2006), podemos afirmar que os pacientes do presente estudo são portadores da forma não-clássica de FC.

Uma das dificuldades de se trabalhar com doenças genéticas de caráter autossômico recessivo, como a Fibrose Cística (FC), é que há mais portadores, ou seja, indivíduos heterozigotos, do que pessoas afetadas pela doença. Além disso, a grande maioria dos portadores é constituída por indivíduos saudáveis, que não sabem que carregam uma cópia mutada do

gene, possuindo, assim, risco de virem a ter um filho afetado caso o parceiro ou parceira também seja portador.

Embora seja conhecida a associação entre CAVD e mutações em *CFTR*, a utilização das técnicas de reprodução humana assistida tem se sobreposto e, muitas vezes até se interposto, ao diagnóstico, valendo-se de argumentos que vão desde a indisponibilidade de testes no mercado nacional, seu alto custo e o baixo poder de detecção de mutações nos homens azoospermicos por CAVD.

De fato existe uma carência nacional por diagnósticos moleculares de todas as afecções geneticamente determinadas e o custo dos exames disponíveis ainda é elevado para a maior parcela da população, uma vez que poucos seguros de saúde proporcionam cobertura para essa finalidade, o Sistema Único de Saúde ainda não inclui a pesquisa em sua tabela de serviços disponíveis, e os laboratórios particulares enviam as amostras para serem analisadas no exterior, com populações que não necessariamente possuem o mesmo perfil genético. Colaborando com essas dificuldades, a literatura está repleta de artigos científicos com séries que variam de dezessete a pouco mais de cem homens estudados, indicando problemas na identificação de mutações em *CFTR* associadas especificamente à CAVD. As tabelas 6 e 7 apresentam alguns dos resultados encontrados em diferentes estudos.

Estudo realizado por Spurgeon em 1999, mostrou que em um número substancial de casos de CAVD não são detectadas quaisquer mutações em *CFTR* na pesquisa de rotina. As porcentagens de identificação de mutações em *CFTR* variam de 9% a 85% dos casos de CAVD. (Casals *et al.*, 2000; Phillipson *et al.*, 2000; Dohle *et al.*, 2002; Levy *et al.*, 2004 ; Claustres *et al.*, 2005). Em 1996, artigo com a revisão de 572 casos de CBAVD provenientes de 33 estudos diferentes, relata que em 65% dos pacientes foram identificadas mutações em *CFTR* (De Braekeleer & Férec, 1996). No Brasil, após extensa busca nas bibliotecas do país, foi encontrada uma única tese de doutorado que refere estudo completo de *CFTR* em 17 homens com CBAVD e em 60% deles não foi identificada qualquer mutação, variante

alélica ou polimorfismo (Bernardino, 2001 – tese de doutorado, não publicada).

Tabela 6: Resultados de trabalhos da literatura de pacientes com CBAVD

Trabalhos	Mutação nos 2 alelos (homo ou heterozigotos compostos)	Mutação em 1 alelo + variante IVS8 5T	Mutação em 1 alelo	Variante IVS8 5T (homo ou heterozigose)	Ausência de Mutações
Mercier <i>et al.</i> , 1995 67 pacientes	24%	–	42%	–	34%
Chillón <i>et al.</i> , 1995 102 pacientes	19%	33%	20%	7%	21%
Casals <i>et al.</i> , 2000 110 pacientes	25,50%	30%	20%	11%	14,50%
Bernardino <i>et al.</i> , 2001 17 pacientes	15%	25%	–		60%
Radpur <i>et al.</i> , 2007 112 pacientes	40%	–	35%	8%	18,50%
Presente estudo 17 pacientes	–	41,2%*	5% [@]	76,5% ^{&}	17,7% ⁺

* HC02, HC03, HC04, HC06, HC07, HC08, HC13; @ HC15; & P81, FC01, FC02, HC02, HC03, HC04, HC05, HC06, HC07, HC08, HC09, HC12, HC13; + P28, HC10 e HC16

Quando se consideram os casos de CUAVD ou obstrução apenas do epidídimo a situação é ainda mais crítica, e a freqüência de identificação de mutações em *CFTR* cai para a casa dos 40% (Casal *et al.*, 2000).

Tabela 7: Resultados de trabalhos da literatura de pacientes com CUAVD

Trabalhos	Mutação em 1 alelo + variante IVS8 5T	Mutação em 1 alelo	Variante IVS8 5T	Ausência de Mutações
Casals <i>et al.</i> , 1995 10 pacientes	–	1%	–	–
Casals <i>et al.</i> , 2000 24 pacientes	21%	17%	–	62%
Radpur <i>et al.</i> , 2007 7 pacientes	–	–	28,5%	–
Presente estudo 3 pacientes	33%*	33% [@]	66% ^{&}	–

* Hc11; @ HC14; & P201 e HC11

O presente estudo visou o rastreamento por SSCP de todos os 27 éxons de *CFTR* e o seqüenciamento direto do éxon 9, que inclui a variante IVS8 poli(T), e identificou alterações em 85% (17/20) dos homens

estudados, sejam essas alterações mutações (10 casos) ou a variante alélica isolada IVS85T (7). Se considerarmos o polimorfismo M470 (3 casos em homozigose e 9 casos em heterozigose) e outros múltiplos polimorfismos como o caso do paciente HC16 (CBAVD+agenesia renal) que apresentou-se com 5 polimorfismos diferentes, a detecção sobe para 100% dos casos com alguma alteração associada à disfunção de *CFTR* já descrita na literatura.

Podemos atribuir essa diferença entre nossos achados e os descritos na literatura a pelo menos três motivos consistentemente sublevados, sobre os quais pautamos a presente investigação:

1. Quando se considera o estudo de mutações em *CFTR* em pacientes com CBAVD, é necessário considerar que o fenótipo deve estar sendo causado por alterações em *CFTR* de natureza diversa das alterações existentes e decorrentes de mutações causadoras da FC clássica. Em outras palavras, o genótipo em CAVD difere daqueles observados em pacientes com FC.

Diferentes mutações em *CFTR* estão envolvidas nas diversas apresentações clássicas e não-clássicas da FC. Pacientes com a forma clássica, mas com fenótipos menos graves da FC, podem ser heterozigotos compostos por mutações que comprometem menos a função protéica ou por uma mutação que cause disfunção grave (classe I ou II) em um alelo e uma mutação com disfunção moderada (classe III ou IV) no outro alelo (The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium, 1993). Por outro lado, nas formas atípicas, usualmente os indivíduos apresentam mutação classe I ou II necessariamente em apenas um dos alelos, sendo o outro alelo acompanhado de mutação com perda parcial ou mesmo sutil da função da proteína (classe IV ou V). Dentre esses casos destacam-se os homens com CAVD, em que a composição do genótipo é bastante variada e, se inclui mutações de classe I ou II em um dos alelos, necessariamente o outro deverá conter mutações mais leves (Classe IV ou V), ou ainda incluir duas mutações Classe IV ou V ou até mesmo apenas dois alelos contendo a variante IVS8 5T.

2. A abordagem diagnóstica dos pacientes com CBAVD está circunscrita a um problema maior que se associa à questão da abordagem da infertilidade no mundo, isto é, comparada à gravidade da FC, o quadro de CBAVD têm merecido menos atenção. Além das mutações específicas em *CFTR* associadas à CAVD serem diferentes das usualmente investigadas, essas mutações são extremamente raras, com freqüências que muitas vezes não excedem 0,5% em determinadas populações. Assim, painéis que incluem a pesquisa de mutações usuais e específicas para FC são ineficientes na detecção das mutações em homens com CAVD.

O que tem sido desconsiderado é que a infertilidade é um problema de relevância que afeta entre 10% a 15% da população mundial (Evers, 2002), e muitos casais procuram diretamente as clínicas de Reprodução Humana Assistida (RHA). Este seria o momento para uma adequada avaliação do homem, com pedido de exames mais amplos que dosagens hormonais e análise seminal. Ao exame físico, nem sempre é fácil fazer o diagnóstico de ausência dos ductos deferentes que, muitas vezes podem estar presente, mas hipoplásicos, “escapando” de profissionais menos experientes. A análise seminal, nesses casos, auxilia a suspeita clínica, pois grande parte dos casos de CAVD vem acompanhados de baixo volume seminal em função de anomalias das vesículas seminais, que contribuem com 85% do volume do ejaculado. Após o diagnóstico clínico de ausência dos ductos deferentes, é obrigatória a solicitação de pesquisa de mutações em *CFTR*, e fundamental o encaminhamento do casal ao geneticista, antes da realização de qualquer das técnicas de RHA.

Como, em populações de origem caucasiana, a freqüência de portadores de mutações em *CFTR* é de 1 em cada 25 indivíduos (Tsui, 1992), é fundamental realizar a pesquisa de mutações em *CFTR* nos homens com CAVD (De Boeck *et al.*, 2006), mesmo na ausência de outros sintomas associados à FC. Se for identificada alguma mutação no homem, torna-se necessário realizar a pesquisa na esposa para que se tenha uma avaliação completa do casal, possibilitando assim realizar o cálculo mais preciso do risco desse casal vir a conceber um filho com FC. Caso seja

identificada mutação na esposa, o risco para a prole desse casal é de 25%, risco clássico para afecções autossômicas recessivas. Caso não seja realizada pesquisa na esposa, o risco estimado para a prole fica em torno de 1% (risco de $\frac{1}{2} \times \frac{1}{25} \times \frac{1}{2}$). Caso a esposa realize apenas a pesquisa básica, que rastreia as mutações mais comuns associadas à FC clássica, e essa pesquisa resulte normal, o risco para a prole é de aproximadamente 1:400 (McCallum *et al.*, 2000).

3. Enquanto a pesquisa de mutações em *CFTR* de populações de origem homogeneamente caucasiana chega a identificar até 95% dos alelos com mutação em pacientes com FC clássica, o estudo de *CFTR* em populações de diferente etnia é muito mais complexo, pois não há um painel com as mutações mais freqüentes a serem analisadas, seja nos pacientes com FC clássica, e ainda mais naqueles com CAVD.

Mais de 1.500 mutações no gene *CFTR* já foram descritas, sendo que a mais comumente encontrada em indivíduos portadores de FC é a $\Delta F508$, com média de prevalência mundial de 66% em 43.849 cromossomos analisados (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr/resource>). Entretanto a freqüência da mutação $\Delta F508$ não é a mesma nas diferentes partes do mundo (The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium, 1993). Entre os pacientes com a forma clássica de FC, a freqüência da $\Delta F508$ varia de população para população, ficando entre 26% na Turquia e 88% na Dinamarca (Tsui, 1990; Estivill *et al.*, 1997; Murray *et al.*, 1999).

Diversos estudos publicados mostram que em diferentes estados do Brasil a freqüência da $\Delta F508$ e de outras mutações em *CFTR* não tem distribuição uniforme nos pacientes com FC (Raskin *et al.*, 2007), variando entre 30,7% e 50,8% (Martins *et al.*, 1993; Raskin *et al.*, 1993; Parizotto *et al.*, 1997; Maróstica *et al.*, 1998; Cabello *et al.*, 1999; Bernardino *et al.*, 2000; Okay *et al.*, 2005). Neste estudo a freqüência encontrada da $\Delta F508$ foi de apenas 15%.

O Brasil possui uma população com cerca de 170 milhões de habitantes, o que faz dele o quinto país mais populoso do mundo e o maior da América do Sul (IBGE, 2000). A formação do povo brasileiro está

marcada por grande miscigenação racial e essa heterogeneidade é um dos fatores que explica a grande variação na composição e na frequência das diferentes mutações entre os estados.

Nosso estudo, com uma amostra de 20 pacientes com CAVD analisados, encontrou 4 novas mutações ainda não descritas na literatura a S753R e a G149W que já foram publicadas (Pieri *et al.*, 2007) e a V580F e a 875 +1G>A. A mutação nova G149W foi encontrada em dois brasileiros típicos, de cor parda.

Isso evidencia a importância de oferecer o estudo completo de *CFTR* e não somente a análise das mutações mais comuns no mundo. Mesmo as populações mais homogêneas devem considerar o estudo completo do gene principalmente quando a pesquisa é direcionada para homens inférteis por CAVD, uma vez que as mutações nesses casos são mutações raras ou polimorfismos variados que, em conjunto, podem explicar o fenótipo.

Polimorfismos em *CFTR* e CAVD

Stuppia e colaboradores (2005) realizaram análise da variante IVS8 5T em 1195 parceiros (721 mulheres e 474 homens) integrantes de casais com infertilidade por diversas causas, antes de serem submetidos à realização das técnicas de Reprodução Assistida. A frequência geral de IVS8 5T nessa população foi de 6,5%, não diferente da referida na literatura para a população geral (5-10%). Dentre os 474 homens estudados, 67 (14%) apresentaram o alelo 5T, todos inférteis, sendo 13 (13/67 = 19,4%) por CBAVD, 6 azoospermicos não obstrutivos e 24 oligozoospermicos.

Em 1998, Meeus e colaboradores obteve resultados para 60 homens com CBAVD, tendo encontrado IVS8 5T em 20 dos 120 (16,7%) cromossomo investigados, distribuídos em 18 heterozigotos compostos com outra mutação no segundo alelo, e um paciente com IVS8 5T em homozigose. Em 2004, Grangeia e colaboradores, estudando 38 pacientes com CAVD (31CBAVD; 4CUAVD), identificaram 14 (45%) pacientes com IVS8 5T associado a outra mutação, 3 (9,7%) em homozigose e 11 (35,5%) com IVS8 5T como única alteração.

O alelo 5T é encontrado em freqüências maiores em portadores de CAVD do que em indivíduos controle (Cuppens *et al.*, 1998); na verdade, em pacientes com CAVD o genótipo mais freqüentemente encontrado é a presença do alelo 5T no IVS8 (Chillón *et al.*, 1995). No presente estudo, 15 (75%) pacientes mostraram a presença da variante IVS8 5T em heterozigose, uma das mais altas associações relatadas na literatura, que indica freqüências variando de 8% a 40% (Cuppens *et al.*, 1994; Chillón *et al.*, 1995; Casals *et al.*, 2000; Rapdur *et al.*, 2007). O alelo 5T apesar de ter penetrância incompleta e expressividade variável na manifestação fenotípica (Meeus *et al.*, 1998), é considerado mutação causativa de CAVD.

Na literatura, os estudos realizados com pacientes portadores de FC, indicam um desequilíbrio de ligação entre a mutação $\Delta F508$ e a variante IVS8 9T. De fato, dos 62 cromossomos portadores da mutação $\Delta F508$ estudados em 31 crianças portadoras de FC matriculadas no Instituto da Criança do HC-FMUSP, 59 (95%) apresentaram o alelo 9T associado (Missaglia *et al.*, 2007).¹ No entanto, nos três pacientes com $\Delta F508$ deste estudo a composição da variante IVS8 foi 5T/7T, indicando que os cromossomos dos indivíduos com formas não-clássicas da FC, como a CAVD, são diferentes daqueles causadores das formas clássicas.

Outro polimorfismo importante é o M470V. Segundo Cuppens e colaboradores (1998), a forma completamente glicosilada da proteína com a variante M470, possui uma permeabilidade maior aos íons e maior tempo de permanência de abertura do canal, matura mais facilmente apesar de transitar entre o retículo endoplasmático e a membrana apical, de forma mais lenta. No entanto, estudos indicaram que esse tempo maior não implica em maior degradação protéica pelo complexo COPII. Já a variante V470 aumenta o erro do complexo protéico de processamento do RNAm, favorecendo a formação de proteínas com ausência completa dos aminoácidos correspondentes ao éxon 9 (Cuppens *et al.*, 1996 apud: Meeus

¹ Missaglia MT. (Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo) *The IVS8 poly(T) splicing acceptor of the CFTR gene in brazilian CAVD infertile men and deltaF508 homozygous cystic fibrosis children*. (Pôster apresentado durante o 1º Simpósio dos Laboratórios de Investigações Médicas-LIMs); 2007.

et al., 1997). O alelo V470 não pode, isoladamente, ser considerado como fator de predisposição às diversas apresentações da FC, uma vez é encontrado com frequência na população geral de indivíduos saudáveis, o mesmo podendo ser dito da variante M470. Quando V470 se encontra associado ao alelo 5T, acentua o mecanismo defeituoso de *splicing* e, conseqüentemente, contribuir para a redução dos níveis de CFTR em até 12 vezes (Cuppens *et al.*, 1998; Meeus *et al.*, 1998).

Na literatura os dados apontam para uma forte associação entre o alelo 5T e V470 em homens com CBAVD, sugerindo que V470 contribua para a expressão variável e para a penetrância do alelo 5T (Cuppens *et al.*, 1998).

Em nosso estudo, dos 40 cromossomos investigados, 25 apresentaram V470 (62,5%) estando presente em 17 dos 20 (85%) pacientes (8 em homozigose e 9 em heterozigose); 15 (37,5%) cromossomos apresentaram M470, estando presente em 12 dos 20 (60%) pacientes (3 em homozigose e 9 em heterozigose)

Estudos têm demonstrado que o número de repetições da sequência TG (IVS8 TG) adjacente à sequência das bases T em IVS8 correlaciona-se diretamente com a eficiência da inclusão do éxon 9 no processamento do RNAm (Cuppens *et al.*, 1998; Niksic *et al.*, 1999). Relata-se que quanto maior o número de repetições TG e menor o número T, maior o erro no processamento com perda do éxon 9 (Cuppens *et al.*, 1998). Comparado à associação 10TG/7T quanto à eficiência do processamento, por exemplo, a composição 11TG/7T forma três vezes mais proteínas com exclusão do éxon 9, e doze vezes mais proteínas truncadas na composição 12TG/7T.

Conforme mostra a tabela 8, no presente estudo foram encontrados, na presença do alelo 5T, 5 pacientes com 11TG (11TG/5T) e 10 com 12 TG (12TG/5T). Na literatura, a associação 12TG/5T se apresenta em frequência estatisticamente superior em homens com CAVD (Stuppia *et al.*, 2005).

Tabela 8: Resultado da associação entre as repetições TG e T em IVS8 e do polimorfismo M470V

	IVS8 poli(TG) poli(T)										V470M
Pact	10/9	11/9	10/7	11/7	12/9	12/7	11/5	12/5	13/7	13/5	
P28											MV
P81											VV
P201											MV
FC01											VV
FC02											VV
HC02											VV
HC03											MV
HC04											MV
HC05											VV
HC06											MM
HC07											MV
HC08											MV
HC09											VV
HC10											MV
HC11											MV
HC12											VV
HC13											MM
HC14											VV
HC15											MM
HC16											MV
N=	3	0	4	8	2	7	5	10	1	0	25V; 15M

Outro fator relevante no estudo dos pacientes com CAVD é sua relação com a agenesia renal ou outras anomalias urogenitais. Aproximadamente 11% a 26% dos pacientes com CAVD têm agenesia renal associada (Schlegel *et al.*, 1996). Em vários relatos da literatura, pacientes com CAVD e agenesia renal apresentam resultados negativos na pesquisa de mutação em *CFTR*, sugerindo que as anomalias urogenitais possuam etiologia distinta (Augarten *et al.*, 1994; Casals *et al.*, 1995, Schlegel *et al.*, 1996). Neste estudo, 30% (n=6) dos pacientes se apresentou com CBAVD associada à anomalias urogenitais: um caso com rim pélvico, em que foi identificada mutação nova em um dos alelos, 12TG/5T no outro alelo, além

de 3 polimorfismos ainda não descritos. Nos outros 5 pacientes as anomalias urogenitais consistiam em agenesia renal e o resultado da pesquisa revelou em dois pacientes a presença de IVS8 5T sem outra mutação no segundo alelo, porém o polimorfismo V470 em homozigose. Assim, dos 6 pacientes, apenas 2 não apresentaram alterações classicamente aceitas, no entanto, no paciente HC16 o genótipo 12TG/7T num alelo e 12TG/9T no outro, além de V470 em heterozigose e 4 polimorfismos ao longo do gene.

Apesar dos achados no paciente HC16 não serem conclusivos, podemos supor que a associação das alterações tenha contribuído e resultado no fenótipo do paciente, uma vez que 12TG em IVS8 reduz de forma expressiva a quantidade de proteína CFTR funcional circulante, conforme mostra a figura abaixo extraída do trabalho de Cuppens e Cassiman (2004).

Figura 20: Efeito da associação entre as variantes IVS8 poli(TG) e poli(T) na quantidade de proteína CFTR funcional circulante

Fonte: Cuppens & Cassiman, 2004.

Mais de 1% de todos os homens da população apresentam ausência congênita unilateral dos vasos deferentes (CUAVD) (Schmidt, 1966; Klapproth & Young, 1973 apud: Vohra & Morgentaler, 1997). Estudo

realizado por Donohue e Fauver em 1989 relatou que as anomalias renais ipsilaterais estão presentes em 91% dos homens com CUAVD (Donohue & Fauver, 1989). Neste estudo temos 3 pacientes com CUAVD (15%) e nenhum deles têm agenesia renal associada, em contrapartida 5 pacientes (25%) têm CBAVD com agenesia renal associada e um paciente também com CBAVD e rim pélvico.

Pacientes com CUAVD apresentam 43% de mutações no gene *CFTR* (Casals *et al.*, 1995; Mickle *et al.*, 1995), frequência menor do que os pacientes com CBAVD que apresentam até 73% de mutações (Chillón, 1995).

Os pacientes com CUAVD podem apresentar fertilidade preservada (Vohra & Morgentaler, 1997), e análise seminal apresenta resultados normais quando o ducto contralateral é normal e pervio. Como as vesículas seminais são responsáveis pela produção de 70% do volume seminal, nos casos de CUAVD este volume pode estar minimamente reduzido pela ausência da vesícula seminal ipsilateral (Hall & Oates, 1993). Por esses motivos, a maioria deles desconhece ser portador dessa malformação, que somente é descoberta no momento em que passam pela cirurgia de vasectomia (Donohue & Fauver, 1989). Este fato justifica a menor frequência de pacientes referidos por infertilidade e, conseqüentemente, uma menor casuística analisada quanto às mutações em *CFTR*. Pode-se até supor que as mutações presentes nos casos de CUAVD sejam específicas e diferentes daquelas encontradas em CBAVD. Neste estudo dos 3 pacientes com o fenótipo de CUAVD dois mostraram-se heterozigotos compostos pelas mutações G542X/5T e 875+1G>A/5T e o outro apresentou o alelo 5T em heterozigose.

A sequência de DNA de dois indivíduos é aproximadamente 99,9% idêntica. O restante que é 0,1% contém variações (polimorfismos), que influenciam na probabilidade e gravidade do desenvolvimento de doenças e também na resposta às drogas (Davies *et al.*, 2005).

O termo polimorfismo inclui a substituição de uma única base os SNPs (do inglês - *single nucleotide polymorphisms*), deleção de várias bases

ou inserção, e variação na repetição de sequência de bases. Em contraste as mutações, que ocorrem na maioria dos casos numa frequência menor que 1% na população em geral, os polimorfismos são variações genéticas comuns ocorrem com frequência maior que 1% (Davies *et al.*, 2005).

Mais de 200 polimorfismos já foram identificados no gene *CFTR* (<http://www.genet.sickkids.on.ca/cftr>). Esses polimorfismos não causam FC, mas podem alterar a produção e a função da proteína CFTR. Essas alterações podem ser clinicamente não significativas em indivíduos sem mutações no gene *CFTR*, mas exercem influência no fenótipo da doença em pacientes com mutações *CFTR* (Davies *et al.*, 2005). Neste estudo foram encontrados 12 tipos diferentes de polimorfismos, e nos 20 pacientes estudados, três (P28, HC10 e HC16) apresentaram polimorfismos sem associação a mutação no outro alelo. Esses achados justificam a necessidade de realizar a pesquisa no gene *CFTR* das parceiras desses pacientes, pois caso a parceira seja portadora de uma mutação e essa mutação se combinar com os polimorfismos, eventuais filhos do casal podem vir a apresentar FC, ainda que, possivelmente, nas apresentações menos graves da doença.

Nossos resultados indicam que infertilidade por causa obstrutiva, quando associada à agenesia renal ou qualquer outra anomalia urogenital, não exclui mutações em heterozigose como sugerido na literatura (Augarten *et al.*, 1994; Schlegel *et al.*, 1996; Mickle *et al.*, 1995), devendo ser incluída na investigação do homem, como também sugere Daudin *et al.* (2000).

Dentre os polimorfismos encontrados no presente estudo, 5 (E691E; L772L, T854T; P1290P e Q1436Q) deles representam, na verdade, mutações silenciosas, que envolvem troca de base no códon, sem troca do aminoácido na proteína. Muito tem sido discutido acerca do significado de alterações dessa natureza em sítios específicos que possuem função importante na regulação da eficiência da transcrição e da tradução. Esses sítios são constituídos por pequenas seqüências exônicas que variam de 6 a 8 nucleotídeos altamente conservados, e fundamentais para o reconhecimento pelo complexo protéico de *splicing*. Recentemente foi dado

a essa seqüência o codinome CERES (do inglês *Composite Exonic Regulatory Elements of Splicing*) (Pagani *et al.*, 2000). Estudos de Pagani e colaboradores demonstraram que o códon 452 (CAG) localizado no éxon 9, quando alterado para CCG, altera o CERES e exerce função reguladora negativa (ESS do inglês *exonic splicing silencer*) reduzindo a inclusão do éxon 9 durante o processamento do RNAm, resultando em proteína truncada (Pagani *et al.*, 2000; Pagani *et al.*, 2005). Todos os 20 pacientes do presente estudo foram investigados quanto à ESS 452 e todos apresentaram seqüenciamento normal (452 CAG), por esse motivo não foram mencionados nos resultados.

Assim, um número crescente de mutações silenciosas em localizações estratégicas tem se mostrado, de fato, importantes na regulação da eficiência do processamento do RNAm e, por esse motivo foram, neste estudo, consideradas polimorfismos pois não se sabe ao certo seu impacto na função de CFTR.

A análise completa de toda a extensão do gene *CFTR* e dos sítios importantes de processamento do RNA em 20 pacientes, possibilitou a caracterização de 100% deles, o que corrobora nossa posição acerca da necessidade do estudo completo do gene *CFTR* nas apresentações não clássicas da FC, como a CAVD, seja devido aos genótipos específicos que a compõem, seja pela especificidade das mutações associadas à CAVD ou pela composição étnica da população brasileira.

Para esses pacientes, a identificação da causa associada ao quadro clínico apresentado, abre a possibilidade de uma opção consciente quanto à utilização das tecnologias de reprodução assistida.

7- Referências

- Araújo FG, Novaes FC, Santos NP, Martins VC, Souza SM, Santos SE, Ribeiro-dos-Santos AK. Prevalence of deltaF508, G551D, G542X, and R553X mutations among cystic fibrosis patients in the North of Brazil. *Braz J Med Biol Res.* 2005; 38(1):11-5.
- Augarten A, Yahav Y, Kerem BS, Halle D, Laufer J, Szeinberg A, Dor J, Mashiach S, Gazit E, Madgar I. Congenital bilateral absence of vas deferens in the absence of cystic fibrosis. *Lancet.* 1994;344(8935):1473-4.
- Bernardino A. *Estudo molecular do gene CFTR em pacientes com fibrose cística, agenesia congênita bilateral dos vasos deferentes e pancreatites* [tese]. São Paulo: Instituto de biociências, Universidade de São Paulo; 2001
- Bernardino AL, Ferri A, Passos-Bueno MR, Kim CE, Nakaie CM, Gomes CE, Damaceno N, Zatz M. Molecular analysis in Brazilian cystic fibrosis patients reveals five novel mutations. *Genet Test.* 2000; 4(1):69-74.
- Bhasin S. Approach to the infertile man. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 92(6):1995-2004 apud Baker HWG. Male Infertility. In: DeGroot LG, Jameson JL. *Endocrinology*. 4th ed. Philadelphia: Saunders Company. 2001; 3199-3228.
- Bhasin S. Approach to the infertile man. *J Clin Endocrinol Metab.* 2007 92(6):1995-2004.
- Cabello GM, Moreira AF, Horovitz D, Correia P, Santa Rosa A, Llerena JJr, Greg J, Grody WW, Degraive WM, Fernandes O, Cabello PH. Cystic fibrosis: Low frequency of Δ F508 mutation in 2 population samples from Rio de Janeiro, Brazil. *Hum Biol.* 1999; 71(2):189-196.

- Cai Z, Lansdell KA, Sheppard DN. Inhibition of heterologously expressed cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channels by non-sulphonylurea hypoglycaemic agents. *Br J Pharmacol*. 1999; 128(1):108-18.
- Casals T, Bassas L, Egozcue S, Ramos MD, Giménez J, Segura A, Garcia F, Carrera M, Larriba S, Sarquella J, Estivill X. Heterogeneity for mutations in the CFTR gene and clinical correlations in patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum Reprod*. 2000; 15(7):1476-83.
- Casals T, Bassas L, Ruiz-Romero J, Chillón M, Giménez J, Ramos MD, Tapia G, Narváez H, Nunes V, Estivill X. Extensive analysis of 40 infertile patients with congenital absence of the vas deferens: in 50% of cases only one CFTR allele could be detected. *Hum Genet*. 1995;95(2):205-11.
- Cates W, Farley TM, Rowe PJ. Worldwide patterns of infertility: is Africa different? *Lancet*. 1985; 2(8455):596-8.
- Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S, Romey MC, Ruiz-Romero J, Verlingue C, Claustres M, et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Med*. 1995; 332(22):1475-80.
- Choi JY, Lee MG, Ko S, Muallem S. Cl⁻-dependent HCO₃⁻ transport by cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *JOP*. 2001; 2(4 Suppl):243-6.
- Chu CS, Trapnell BC, Curristin S, Cutting GR, Crystal RG. Genetic basis of variable exon 9 skipping in cystic fibrosis transmembrane conductance regulator mRNA. *Nat Genet*. 1993; 3(2):151-6.
- Claustres M. Molecular pathology of the CFTR locus in male infertility. *Reprod Biomed Online*. 2005; 10(1):14-41.

Cuppens H, Cassiman JJ. CFTR mutations and polymorphisms in male infertility. *Int J Androl.* 2004; 27(5):251-6.

Cuppens H, Lin W, Jaspers M, Costes B, Teng H, Vankeerberghen A, Jorissen M, Droogmans G, Reynaert I, Goossens M, Nilius B, Cassiman JJ. Polyvariant mutant cystic fibrosis transmembrane conductance regulator genes. The polymorphic (Tg)m locus explains the partial penetrance of the T5 polymorphism as a disease mutation. *J Clin Invest.* 1998; 101(2):487-96.

Cuppens H, Teng H, Jaspers M, Willems T, Jorissen M, Cassiman JJ. Functional characterization of the M470V locus within the CFTR gene. *Isr J Med Sci.* 1996; 32(suppl):S226.

Cuppens H, Teng H, Raeymaekers P, De Boeck C, Cassiman JJ. CFTR haplotype backgrounds on normal and mutant CFTR genes. *Hum Mol Genet.* 1994;3(4):607-14.

Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. Worldwide survey of the $\Delta F508$ mutation-report from the Cystic Fibrosis Genetic Analysis Consortium. *Am J Hum Genet.* 1990; 47:354-359.

Dahl M, Tybjaerg-Hansen A, Lange P, Nordestgaard BG. Asthma and COPD in cystic fibrosis intron-8 5T carriers. A population-based study. *Respir Res.* 2005;6:113.

Daudin M, Bieth E, Bujan L, Massat G, Pontonnier F, Mieusset R. Congenital bilateral absence of the vas deferens: clinical characteristics, biological parameters, cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations, and implications for genetic counseling. *Fertil. Steril.* 2000; 74(6):1164-74.

- Davies J, Alton E, Griesenbach U. Cystic fibrosis modifier genes. *J R Soc Med.* 2005; 98 Suppl 45:47-54.
- De Boeck K, Wilschanski M, Castellani C, Taylor C, Cuppens H, Dodge J, Sinaasappel M, Diagnostic Working Group. Cystic fibrosis: terminology and diagnostic algorithms. *Thorax.* 2006;61(7):627-35.
- De Braekeleer M, Férec C. Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of vas deferens. *Mol. Hum. Reprod.* 1996; 2:669-77.
- Devroey P, Van Steirteghem A. A review of ten years experience of ICSI. *Hum Reprod Update.* 2004;10(1):19-28.
- Dohle GR, Halley DJ, Van Hemel JO, Van den Ouwel AM, Pieters MH, Weber RF, Govaerts LC. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod.* 2002; 17(1):13-6.
- Donohue RE, Fauver HE. Unilateral absence of the vas deferens. A useful clinical sign. *JAMA.* 1989; 261: 1180.
- Dumur V, Gervais R, Rigot JM, Delomel-Vinner E, Lafitte JJ, Roussel P. Congenital bilateral absence of vas deferens in absence of cystic fibrosis. *Lancet.* 1995;345(8943):200-1.
- Egan M, Flotte T, Afione S, Solow R, Zeitlin PL, Carter BJ, Guggino WB. Defective regulation of outwardly rectifying Cl⁻ channels by protein kinase A corrected by insertion of CFTR. *Nature.* 1992; 358(6387):581-4.
- ESHRE Capri Workshop Group. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in 2006: Evidence and Evolution. *Hum Reprod Update.* 2007; 13(6): 515-526.

- Estivill X, Bancells C, Ramos C. Geographic distribution and regional origin of 272 cystic fibrosis mutations in European populations. The Biomed CF Mutation Analysis Consortium. *Hum Mutat.* 1997;10(2):135-54.
- Evers JL. Female subfertility. *Lancet.* 2002; 360: 151-159.
- EWGCFG. Gradient of distribution in Europe of the major CF mutation and of its associated haplotype. *Hum Genet.* 1990; 85(4):436-441.
- Farber S. Some organic digestive disturbances in early life. *J Mich State Med Soc.* 1945; 44:587-594.
- Ferec C, Audrezet MP, Mercier B, Guillermit H, Moullier P, Quere I, Verlingue C. Detection of over 98% cystic fibrosis mutations in a Celtic population. *Nat Genet.* 1992;1(3):188-91.
- Ferlin A, Raicu F, Gatta V, Zuccarello D, Palka G, Foresta C. Male infertility: role of genetic background. *Reprod Biomed Online.* 2007; 14(6):734-45.
- Garred P, Pressler T, Madsen HO, Frederiksen B, Svejgaard A, Hoiby N, Schwartz M, Koch C. Association of mannose-binding lectin gene heterogeneity with severity of lung disease and survival in cystic fibrosis. *J Clin Invest.* 1999;104(4):431-7.
- Gelman MS, Kannegaard ES, Kopito RR. A principal role for the proteasome in endoplasmic reticulum-associated degradation of misfolded intracellular cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *J Biol Chem.* 2002; 277(14):11709-14.
- Ginzburg BM, Buckspan MB, Bain J, Margolis M, Asch MR, Jarvi K, Tullis DE, Wilschanski M, Durie PR. Transrectal and scrotal ultrasound abnormalities in cystic fibrosis. *J Urol.* 1995; 153: 259a.

- Grangeia A, Niel F, Carvalho F, Fernandes S, Ardalan EG, Silva J, Ferras L, Sousa M, Barros A. Characterization of cystic fibrosis conductance transmembrane regulator gene mutations and IVS8 poly (T) variants in Portuguese patients with congenital absence of the vas deferens. *Hum. Reprod.* 2004; 19(11):2502-8.
- Grimard V, Li C, Ramjeesingh M, Bear CE, Goormaghtigh E, Ruyschaert JM. Phosphorylation-induced conformational changes of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator monitored by attenuated total reflection-Fourier transform IR spectroscopy and fluorescence spectroscopy. *J Biol Chem.* 2004; 279(7):5528-36.
- Hall S, Oates RD. Unilateral absence of the scrotal vas deferens associated with contralateral mesonephric duct anomalies resulting in infertility: laboratory, physical and radiographic findings, and therapeutic alternatives. *J Urol.* 1993;150(4):1161-4.
- Heaton ND, Pryor JP. Vasa aplasia and cystic fibrosis. *Br J Urol.* 1990; 66(5):538-40.
- IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística, Rio de Janeiro, Brasil. Censo Demográfico de 2000. <http://www.ibge.gov.br>2007.
- Jarow JP. Effects of varicocele on male fertility. *Hum. Reprod. Update.* 2001; 7: 59-64.
- Jequier AM, Holmes SC. Aetiological factors in the production of obstructive azoospermia. *Br J Urol.* 1984; 56(5): 540-3.
- Kerem B, Chiba-Falek O, Kerem E. Cystic fibrosis in Jews: frequency and mutation distribution. *Genet Test.* 1997; 1(1):35-39.

- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A, Buchwald M, Tsui LC. Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science*. 1989; 245(4922):1073-80.
- Klapproth HJ, Young IS. Vasectomy, vas ligation and vas occlusion. *Urology*. 1973;1(4):292-300.
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Veeck LL, Morshedi M, Brugo S. New method of evaluating sperm morphology with predictive value for human in vitro fertilization. *Urology*. 1987; 30(3): 248-51.
- Levy EM, Granados P, Rawe V, Olmedo SB, Luna MC, Cafferata E, Pivetta OH. Mutations in CFTR gene and clinical correlation in Argentine patients with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Medicina (B Aires)*. 2004; 64(3):213-8.
- Lucotte G & Hazout SA. NW-SE. Decreasing gradient of the $\Delta F508$ frequencies in Europe. *Newslett*. 1990; EC Cystic Fibrosis Consort 1.
- Maróstica PJ, Raskin S, Abreu e Silva FA. Analysis of the $\Delta F508$ mutations Brazilian cystic fibrosis population: Comparison of pulmonary status of homozygotes with other patients. *Braz J Med Biol Res*. 1998; 31(4):529-532.
- Martins CS, Ribeiro F, Costa FF. Frequency of the cystic fibrosis $\Delta F508$ mutation in a population from São Paulo State, Brazil. *Braz J Med Biol Res*. 1993; 26(10):1037-1040.
- McCallum TJ, Milunsky JM, Cunningham DL, Harris DH, Maher TA, Oates RD. Fertility in men with cystic fibrosis: an update on current surgical practices and outcomes. *Chest*. 2000; 118(4):1059-62.

- Meeus A, Guittard C, Desgeorges M, Carles S, Demaille J, Claustres M. Linkage disequilibrium between the M470V variant and the IVS8 polyT alleles of the CFTR gene in CBAVD. *J Med Genet.* 1998; 35(7):594-6.
- Meschede D, Dworniczak B, Nieschlag E, Horst J. Genetic diseases of the seminal ducts. *Biomed Pharmacother.* 1998; 52(5):197-203.
- Mickle J, Milunsky A, Amos JA, Oates RD. Congenital unilateral absence of the vas deferens: a heterogeneous disorder with two distinct subpopulations based upon aetiology and mutational status of the cystic fibrosis gene. *Hum Reprod.* 1995; 10(7):1728-35.
- Mickle JE, Oster RD, Colin A, Maher TA, Milunsky A, Amos JA. Increased frequency of cystic fibrosis (CF) mutation in males with unilateral absence of the vas deference. *Am. J. Hum. Genet.* 1993; 53(Suppl.): 1204.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 1988; 16(3):1215.
- Mir L. *Genômica*. São Paulo: Editora Atheneu; 2004.
- Missaglia, MT; Hallak, J; Rodrigues, JC; Okay, TS; Pieri, PC. *The IVS8 poly(T) splicing acceptor of the CFTR gene in brazilian CAVD infertile men and deltaF508 homozygous cystic fibrosis children*. Trabalho apresentado no Simpósio dos LIMs do HC-FMUSP, São Paulo; 2007
- Moore KL, Persaud TVN. *Embriologia Clínica*. Tradução da 7ª americana. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005. p341.
- Murray J, Cuckle H, Taylor G, Littlewood J, Hewison J. Screening for cystic fibrosis. *Health Technol Assess.* 1999; 3(8):i-iv, 1-104.

- Niksic M, Romano M, Buratti E, Pagani F, Baralle FE. Functional analysis of cis-acting elements regulating the alternative splicing of human CFTR exon 9. *Hum Mol Genet.* 1999; 8(13):2339-49.
- Noone PG, Pue CA, Zhou Z, Friedman KJ, Wakeling EL, Ganeshanathan M, Simon RH, Silverman LM, Knowles MR. Lung disease associated with the IVS8 5T allele of the CFTR gene. *Am J Respir Crit Care Med.* 2000;162(5):1919-24.
- Okay TS, et al. Frequency of the $\Delta F508$ mutation in 108 cystic fibrosis patients in São Paulo: comparison with reported Brazilian data. *Clinics.* 2005; 60(2): 131-134.
- Osmanagaoglu K, Tournaye H, Camus M, Vanderyorst M, Van Steirteghem A, Devroey P. Cumulative delivery rates after intracytoplasmic sperm injection: 5 year follow-up of 498 patients. *Hum Reprod.* 1999; 10:2651-5.
- Ostedgaard LS, Baldursson O, Welsh MJ. Regulation of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator Cl⁻ channel by its R domain. *J Biol Chem.* 2001; 276(11):7689-92.
- Pagani F, Buratti E, Stuaní C, Romano M, Zuccato E, Niksic M, Giglio L, Faraguna D, Baralle FE. Splicing factors induce cystic fibrosis transmembrane regulator exon 9 skipping through a nonevolutionary conserved intronic element. *J Biol Chem.* 2000; (28):21041-7.
- Pagani F, Raponi M, Baralle F. Synonymous mutations in CFTR exon 12 affect splicing and are not neutral in evolution. *PNAS.* 2005; 102(18): 6368-72.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet.* 1992; 340(8810):17-8.

Parizotto EA, Bertuzzo CS, Ribeiro AF. Molecular characterization of cystic fibrosis patients in the state of São Paulo (Brazil). *J Med Genet.* 1997; 34(10):877.

Phillipson GT, Petrucco OM, Matthews CD. Congenital bilateral absence of the vas deferens, cystic fibrosis mutation analysis and intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 2000; 15(2):431-5.

Pieri P de C, Missaglia MT, Roque J de A, Moreira-Filho CA, Hallak J. Novel CFTR missense mutations in Brazilian patients with congenital absence of vas deferens: counseling issues. *Clinics.* 2007;62(4):385-90.

Prader A. Testicular size: assessment and clinical importance. *Triangle.* 1966; 7:240.

Quinton PM. Physiological basis of cystic fibrosis: a historical perspective. *Physiol Rev.* 1999; 79 (1 Suppl): S3-S22.

Radpour R, Gourabi H, Gilani MA, Dizaj AV. Correlation Between CFTR Gene Mutations in Iranian Men With Congenital Absence of the Vas Deferens and Anatomical Genital Phenotype. *J Androl.* 2007; 29(1):35-40.

Raskin S, Pereira-Ferrari L, Reis FC, Abreu F, Marostica P, Rozov T, Cardieri J, Ludwig N, Valentin L, Rosario-Filho NA, Camargo Neto E, Lewis E, Giugliani R, Diniz EM, Culp L, Phillip JA, Chakraborty R. Incidence of cystic fibrosis in five different states of Brazil as determined by screening of p.F508del, mutation at the CFTR gene in newborns and patients. *J Cyst Fibros.* 2008 Jan;7(1):15-22. Epub 2007 Jun 4.

Raskin S, Phillips III JA, Krishnamani MR, Vnencak-Jones C, Parker RA, Rozoy T, Cardieri JM, Marostica P, Abreu F, Giugliani R, *et al.* DNA analysis of cystic fibrosis patients in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. *Am J Med Genet.* 1993; 46(6):665-669.

Reisin IL, Prat AG, Abraham EH, Amara JF, Gregory RJ, Ausiello DA, Cantiello HF. The cystic fibrosis transmembrane conductance regulator is a dual ATP and chloride channel. *J Biol Chem*. 1994; 269(32):20584-91.

Riordan JR, JM Rommens, B Kerem, N Alon, R Rozmahel, Z Grzelczak, J Zielenski, S Lok, N Plavsic, JL Chou, and et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*.1989;245(4922):1066-73. Erratum in: *Science* 1989;245(4925):1437.

Riordan JR. Assembly of functional CFTR chloride channels. *Annu Rev Physiol*. 2005; 67:701-18.

Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mahmoud AMA. WHO (World Health Organization) *manual for the standardized investigation and diagnosis of infertile male*. Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press, 2000.

Rowe PJ, Comhaire FH, Hargreave TB, Mellows H. WHO (World Health Organization). *Manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple*. First edition. Cambridge, UK: Cambridge Press; 1993. Página 1-6.

Rozen R, De Braekeleer M, Daigneault J, Ferreira-Rajabi L, Gerdes M, Lamoureux L, Aubin G, Simard F, Fujiwara TM, Morgan K. Cystic fibrosis mutations in French Canadians: three CFTR mutations are relatively frequent in a Quebec population with an elevated incidence of cystic fibrosis. *Am J Med Genet*. 1992;42(3):360-4.

Salzano FM, Pena SDJ. Ethics and medical genetics in Brazil. *Ethics and Human Genetics*. Wertz D, Fletcher JC. New York, NY: Springer Verlag. 1987; 100-118.

Schlegel PN, Girardi SK. *In Vitro* fertilization for male factor infertility. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 1996; 82(3): 709-716.

Schlegel PN, Shin D, Goldstein M. Urogenital anomalies in men with congenital absence of the vas deferens. *J Urol*. 1996;155(5):1644-8.

Schlegel PN. Causes of azoospermia and their management. *Reprod Fertil Dev*. 2004; 16(5):561-72.

Schmidt SS. Techniques and complications of elective vasectomy. The role of spermatic granuloma in spontaneous canalization. *Fertil Steril*. 1966; 17(4):487-492.

Sheppard DN, Welsh MJ. Structure and function of the CFTR chloride channel. *Physiol Rev*. 1999;79(1 Suppl):S23-45.

Short DB, Trotter KW, Reczek D, Kreda SM, Bretscher A, Boucher RC, Stutts MJ, Milgram SL. An apical PDZ protein anchors the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator to the cytoskeleton. *J Biol Chem*. 1998; 273(31):19797-801.

Spurgeon D. Men using IVF inadequately screened for cystic fibrosis. *BMJ*. 1999; 318(7200):1720B.

Stephoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978; 2:366.

Stuppia L, Antonucci I, Binni F, Brandi A, Grifone N, Colosimo A, De Santo M, Gatta V, Gelli G, Guida V, Majore S, Calabrese G, Palka K, Ravani A, Rinaldi R, Tiboni GM, Ballone E, Venturoli A, Ferlini A, Torrente I, Grammatico P, Calzolari E, Dallapiccola B. Screening of mutations in the CFTR gene in 1195

couples entering assisted reproduction technique programs. *Eur J Hum Genet.* 2005; 13(8):959-64.

Swiatecka-Urban A, Duhaime M, Coutermarsh B, Karlson KH, Collawn J, Milewski M, Cutting GR, Guggino WB, Langford G, Stanton BA. PDZ Domain Interaction Controls the Endocytic Recycling of the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator. *J. Biol. Chem.* 2002; 277(42):40099-40105.

The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. Correlation between genotype and phenotype in patients with cystic fibrosis. The Cystic Fibrosis Genotype-Phenotype Consortium. *N Engl J Med.* 1993; 329(18):1308-13.

Thompson & Thompson. *Genética Médica*. Rio de Janeiro: Editora Guanabara Koogan; 6ª edição traduzida; 2002. página 350.

Tsui LC. Population analysis of the major mutation in cystic fibrosis. *Hum Genet.* 1990; 85(4):391-2.

Tsui LC. The spectrum of cystic fibrosis mutations. *Trends Genet.* 1992; 8(11):392-8.

Tuerlings JH, Kremer JA. Genetics of male factor subfertility. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol.* 2000; 89(2):117-21.

Van Steirteghem A, Devroey P, Liebaers I. Intracytoplasmic sperm injection. *Mol Cell Endocrinol.* 2002; 186(2):199-203.

Van Steirteghem AC, Nagy Z, Joris H, Liu J, Staessen C, Smits J, Wisanto A, Devroey P. High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod.* 1993; 8(7):1061-6.

Vohra S, Morgentaler A. Congenital Anomalies of the vas deferens, epididymis, and seminal vesicles. *Urology*. 1997; 49 (3):313-321.

Wagenknecht LV, Lotzin CF, Sommer HJ, Schirren C. Vas deferens aplasia: clinical and anatomical features of 90 cases. *Andrologia*. 1983; 15:605-13.

Welsh MJ, Smith AE. Cystic fibrosis. *Sci Am*. 1995;273(6):52-9.

Welsh MJ, Smith AE. Molecular mechanisms of CFTR chloride channel dysfunction in cystic fibrosis. *Cell*. 1993;73(7):1251-4.

WHO (World Health Organization). *Laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucous interaction*. Third Edition. Cambridge, UK: Cambridge Press. 1992.

Williamson R. Universal community carrier screening for cystic fibrosis? *Nat Genet*. 1993; 3(3):195-201.

Wilschanski M, Zielenski J, Markiewicz D, Tsui LC, Corey M, Levison H, Durie PR. Correlation of sweat chloride concentration with classes of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene mutations. *J Pediatr*. 1995; 127(5):705-10.

Wong LJ, Alper OM, Hsu E, Woo MS, Margetis MF. The necessity of complete CFTR mutational analysis of an infertile couple before in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2004; 82(4):947-9.

Yoo JS, Moyer BD, Bannykh S, Yoo HM, Riordan JR, Balch WE. Non-conventional trafficking of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator through the early secretory pathway. *J Biol Chem*. 2002; 277(13):11401-9.

Zielenski J, Rozmahel R, Bozon D, Kerem B, Grzelczack Z, Riordan JR, Rommens J, Tsui LC. Genomic DNA sequence of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) gene. *Gen*

ANEXOS

Anexo 2

Protocolo de Coloração Géis de SSCP

Etapa 1 - Fixação

Tempo: no mínimo 5 minutos

Reagentes: Etanol 10%:Ácido Acético 5%

Etapa 2 - Sensibilização

Tempo: 10 minutos

Reagente: Formaldeído 2%

Lavar com água MilliQ por 1 minuto repetir 3 vezes

Etapa 3 – Coloração

Tempo: 15 minutos

Reagente: Nitrato de Prata 0,2%

Lavar com água MilliQ por 1 minuto e repetir 3 vezes

Etapa 4 – Revelação

Tempo: até surgimento das bandas

Reagente: Solução de Carbonato de Sódio 3%

Etapa 5 – Fixação

Tempo: 5 minutos

Reagente: Ácido Acético 10%

Etapa 6 - Conservação

Manter o gel em água MilliQ na geladeira