

- Patrícia de Campos Pieri
- Jorge Hallak
- Sami Arap

- Introdução
- Avaliação do casal infértil
- As tecnologias de reprodução assistida — ARTs
- Reserva ovariana e hiperestimulação controlada dos ovários
- Aberrações cromossômicas, idade avançada e infertilidade
- Microdeleções do cromossomo Y
- Varicocele, microdeleções e genes associados.
- Fibrose cística, agenesia de deferente, infertilidade e ARTs
- Idade materna, dissomia uniparental, ICSI e *imprinting* genômico.
- ICSI e utilização de células imaturas
- FIV e polaridade oocitária
- Transplante de citoplasma e herança mitocondrial
- Gametogênese *in vitro*
- O risco das ARTs
- Considerações finais
- Referências bibliográficas
- Súmulas

INTRODUÇÃO

É certo que a infertilidade é uma *doença complexa*, e muitas vezes é difícil estabelecer sua etiologia. Talvez, o fato de não haver sido considerada como patologia desde o início tenha auxiliado na distorção de seu “tratamento”. No entanto, cada vez mais fatores de infertilidade têm sido associados a problemas geneticamente determinados e, portanto, potencialmente transmissíveis para as gerações futuras. Hoje se sabe que homens inférteis são provenientes de famílias com menor número de filhos, com menos irmãs, e em cerca de 12% dos pacientes a história familiar indica outros casos de infertilidade, seja em irmãos, irmãs, tios ou tias², indicando uma agregação familiar da infertilidade. Esses dados são compatíveis com estudos de populações endocruzadas, em que ocorre um aumento da prevalência da infertilidade, sugerindo a existência de mecanismos mendelianos envolvidos nas falhas reprodutivas³, ou mesmo de agregação de afecções com mecanismos multifatoriais nas famílias de indivíduos inférteis.

Os genes (reguladores, co-reguladores, repressores e/ou ativadores) que contribuem para a infertilidade são de difícil identificação, pois devem exercer pequenos efeitos individuais que se combinam e interagem com fatores ambientais, na manifestação da doença. A crescente identificação desses genes, a compreensão a) do papel e da gravidade das mutações envolvidas na capacidade reprodutiva, b) do padrão de herança dessas mutações, c) do nível de envolvimento dos polimorfismos e d) da interação desses genótipos com o meio ambiente na determinação da infertilidade será de fundamental importância no diagnóstico do casal.

Paralelamente, o seguimento das crianças nascidas pelas ARTs permitirá a definição de sua segurança. No entanto, o conhecimento da etiologia dos problemas físicos, funcionais e/ou comportamentais dessas crianças é fundamental para que se possa distinguir o que foi causado pelas técnicas, o que é da própria criança e o que é função do *background* genético do casal.

Esse é o desafio da pesquisa na medicina reprodutiva: estudos clinicamente controlados envolvendo um grande número de indivíduos, normais e afetados, de modo que novas estratégias diagnósticas, preventivas e verdadeiramente terapêuticas possam ser desenvolvidas. As ARTs deverão, nessa segunda fase de sua existência, centrar suas atividades na colaboração com centros de referência em pesquisa molecular e experimental, de modo que diagnósticos etiológicos possam ser cada vez mais realizados e que danos moleculares possam ser reparados, restaurando a fertilidade natural e minimizando o risco de transmissão de doenças.

AVALIAÇÃO DO CASAL INFÉRTIL

O casal infértil é usualmente um casal hígido, cuja queixa única é a falha na obtenção de gestação após no mínimo

12 meses de tentativas com coitos regulares e sem uso de contraceptivos. A infertilidade está igualmente representada nos homens e nas mulheres, e em um terço dos casais inférteis ambos os cônjuges têm problemas.

A avaliação do casal deve visar à identificação do problema; sua provável causa; o risco potencial de transmissão desse problema, ou de problemas associados, à prole; a melhor técnica de reprodução assistida a ser proposta e a possibilidade de diagnóstico dos embriões e das gestações resultantes das técnicas, para que seja evitado o nascimento de crianças afetadas.

A investigação do casal é constituída de uma anamnese, história clínica e exame físico do homem e da mulher, e exames laboratoriais básicos e complementares.

ANAMNESE

A anamnese do casal infértil deve incluir perguntas sobre outros casos de infertilidade, abortos recorrentes, câncer, retardo mental, defeitos físicos, bem como se algum dos cônjuges é filho de pais consanguíneos ou se o casal é consanguíneo. Na anamnese da família da mulher casos de surdez e menopausa precoce são importantes, assim como casos de hipospádia, criptorquidia ou anomalias renais são de especial importância na família do homem. As perguntas devem incluir a geração dos avós (e tios-avós), dos pais (e tios) e a geração do casal (primos).

A anamnese do casal deve visar à identificação de fatores que descartem uma etiologia geneticamente determinada para a infertilidade, como traumas testiculares, lesões medulares por acidentes ou lesões iatrogênicas, seqüelas de parotidite (caxumba) e de doenças sexualmente transmissíveis no homem, por exemplo, e obstrução tubárea iatrogênica ou pós-infecção e endometriose na mulher. Caso não haja um fator que descarte uma etiologia genética para a infertilidade, o cariótipo deverá ser incluído dentre os exames laboratoriais a serem realizados pelo casal.

HISTÓRIA CLÍNICA E EXAME FÍSICO

A história clínica é de especial importância na avaliação da mulher, uma vez que pode auxiliar na identificação de problemas hormonais e ovulatórios. O exame físico deve incluir peso e altura. No exame físico do homem, avaliação do volume e textura dos testículos, presença de varicocele e integridade dos epidídimos e vasos deferentes orientam o pedido de exames.

EXAMES LABORATORIAIS

A avaliação laboratorial da mulher inclui: dosagens hormonais, ultra-sonografias seriadas e histerossalpingografia,

esta última para avaliação da permeabilidade tubárea. As dosagens hormonais seriadas (no 3º dia do ciclo, no período imediatamente antes da ovulação e no período pós-ovulatório) auxiliam na diferenciação entre uma infertilidade eugonádica e os hipogonadismos hipergonadotróficos ou hipogonadotróficos, cada um com abordagem terapêutica própria. As dosagens hormonais, realizadas juntamente com as ultra-sonografias, avaliam a reserva ovariana, a presença de ciclo ovulatório, o padrão de vascularização folicular e do corpo lúteo, os volumes ovariano e uterino e a espessura que o endométrio atinge a cada ciclo.

Anomalias uterinas (úteros unicornos, septados, bicornos, didelfos, usualmente associadas a perdas gestacionais e não à infertilidade), síndrome dos ovários policísticos, ovários císticos, falência ovariana, diabetes e resistência periférica à insulina são os diagnósticos mais importantes que podem ser realizados com os exames solicitados.

Para o homem, dosagens hormonais, um ou dois espermogramas e o cariótipo compõem o protocolo básico de investigação. Segundo a OMS⁴, os valores normais de um espermograma e as patologias são:

- **Concentração espermática:** maior ou igual a 20×10^6 spz/ml (isto é, 20 milhões de espermatozoides por mililitro ejaculado). Concentrações inferiores constituem a oligozoospermia (moderada menos de cinco milhões, grave menos de um milhão) ou a azoospermia, esta última devendo ser confirmada em pelo menos mais um espermograma realizado com centrifugação ou cytospin para procura de espermatozoides escondidos (criptozoospermia).
- **Motilidade total:** maior ou igual a 50% de espermatozoides progressivos rápidos (A) + progressivos lentos (B) ou maior ou igual a 30% de progressivos rápidos (A). A alteração da motilidade é denominada astenozoospermia; a síndrome mais conhecida associada a defeitos na motilidade é a discinesia ciliar primária, ou síndrome de Kartagener. Seu diagnóstico complementar é realizado por microscopia eletrônica, e o padrão de herança parece ser autossômico recessivo. Técnica de reprodução assistida já foi utilizada com sucesso em portadores da síndrome⁵, embora outros padrões de herança tenham sido propostos a partir de estudos de famílias, o que acarretaria risco de transmissão do problema a gerações futuras utilizando as ARTs⁶.
- **Morfologia:** 14% ou mais de espermatozoides com formas ovais segundo os critérios estritos de Kruger⁷. Defeitos na morfologia dos espermatozoides caracteriza a teratozoospermia, presente nos indivíduos com varicocele, por exemplo.
- **Células redondas:** menos de 1×10^6 spz/ml (menos de um milhão por ml). Mais de um milhão de células redondas pode indicar a presença de uma infecção (leucocitospermia) ou a descamação de células imaturas. Testes laboratoriais específicos, como o de Endtz e o da Peroxidase, fazem a distinção entre esses tipos celulares, sendo fundamentais para a orientação terapêutica.

O espermograma identifica o problema, mas não estabelece um diagnóstico etiológico. A segunda etapa é a solicitação de testes e exames complementares para que seja possível a identificação da causa. Primeiro é fundamental diferenciar entre problemas na produção de espermatozoides de problemas na sua liberação para o meio. O volume do ejaculado pode auxiliar a identificar casos de agenesia uni ou bilateral de vasos deferentes ou epidídimo, usualmente associada à hipoplasia ou à agenesia de vesículas seminais e volume de ejaculado menor que 1,5 ml (normal maior que 2 ml). Para esses casos, a pesquisa de mutações no gene CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator), que causa a fibrose cística, é fundamental para a orientação genética do casal, conforme será discutido mais adiante. Teste do suor e ultra-sonografia para identificação de agenesia ou ectopia renal auxiliam a biologia molecular no estudo de mutações, pois estão fortemente associados à presença ou à ausência de mutações, respectivamente.

A ultra-sonografia pélvica minuciosa auxilia também na identificação de cistos no epidídimo, obstruindo total ou parcialmente a passagem dos espermatozoides. Nesses casos, a pesquisa de cistos renais, peritoneais ou hepáticos deve ser solicitada para exclusão do diagnóstico de doença policística renal, cujas formas mais comuns possuem padrão de herança autossômico dominante, requerendo uma abordagem específica de aconselhamento genético para o casal.

A outra pesquisa de grande valor diagnóstico é a de microdeleções no cromossomo Y. Nos casos de azoospermia, por exemplo, a presença de microdeleção de regiões específicas (AZFa associada ou não a deleções em AZFb) pode significar ausência de chances de encontrar espermatozoides nos testículos ou no epidídimo daquele indivíduo.

A presença de varicocele e/ou história de ectopia testicular não deve excluir a pesquisa de microdeleções no Y, uma vez que são condições que podem coexistir.^{8,9,10} Mais do que isso, podem orientar a indicação de cirurgia de varicocele, a varicocelectomia, conforme será discutido.

O resultado das investigações irá estabelecer a estratégia a ser utilizada na assistência reprodutiva do casal e deverá, sempre que possível, ir de métodos de menor complexidade, como o coito programado e a inseminação intra-uterina, para os de maior complexidade, como a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) com diagnóstico genético de pré-implantação (DGPI).

AS TECNOLOGIAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA — ARTS

INSEMINAÇÃO INTRA-UTERINA — IUI

É um dos métodos mais simples de reprodução assistida, e está baseado na capacidade natural de o espermatozoide fertilizar o óvulo dentro do aparelho reprodutor feminino.

Consiste no processamento do sêmen por técnicas específicas e sua introdução no útero da mulher em período ovulatório, monitorizado por ultra-sonografia. A IUI não requer anestesia ou sedação da mulher, utiliza um cateter fino contendo o sêmen, pode ser ou não guiada por ultra-som e pode ser realizada em ciclo natural ou em ciclo com estimulação ovariana leve, para que haja a produção de um, dois ou no máximo três folículos.

Seus índices de sucesso são variáveis, muito em função da heterogeneidade de sua primeira indicação, ficando entre 10% e 25%. Não há consenso acerca do número de IUI a ser realizado antes que seja indicada uma técnica de reprodução assistida de maior complexidade, podendo ficar entre três e seis tentativas.

FERTILIZAÇÃO *IN VITRO* — FIV

A FIV consiste na obtenção de gametas masculinos e femininos e a promoção de seu contato físico para que ocorra a fertilização em laboratório.

O primeiro bebê de proveta foi realizado em uma mulher com obstrução tubárea por seqüela de uma infecção pélvica. Não havia nenhum fator de risco de transmissão de qualquer patologia em si ou associada à infertilidade, para a prole do casal Brown. Além disso, o procedimento foi realizado em ciclo natural (não estimulado por hormônios), com aspiração do oócito do folículo dominante, produzido pelos ovários normais da mãe. O resultado: Louise Joy Brown, um sucesso hoje com 25 anos, construída em bases seguras a partir de uma prática clínica responsável, realizada por médicos com pelo menos uma década de experiência em fertilização *in vitro* em modelos animais¹¹.

O procedimento, concebido por Edwards e Steptoe, os pais desse primeiro “bebê de proveta”, é hoje denominado genericamente FIV (fertilização *in vitro*), foi consagrado pelo sucesso, rapidamente assimilado, e seu uso foi amplamente generalizado.

A FIV hoje

Com a finalidade de aumentar as chances de sucesso do procedimento, a FIV hoje utiliza a produção *in vitro* de vários embriões para que possam ser escolhidos os melhores para transferência para o útero materno.

A coleta dos oócitos é realizada após hiperestimulação ovariana com hormônios, usualmente o hormônio folículo estimulante (FSH), purificado ou recombinante, utilizado de acordo com um dos inúmeros protocolos existentes. O crescimento dos folículos ovarianos é monitorado por ultra-so-

nografias seriadas, que podem também acompanhar o padrão de neovascularização ovariano perifolicular e depois pericorpo lúteo. Cerca de 36 horas antes da punção folicular é simulado o pico do hormônio luteinizante (LH), com a utilização do hCG (gonadotrofia coriônica humana), que se liga ao mesmo receptor do LH, o LHR. O hCG promove a retomada da meiose do oócito, em dictióteno (estado de vesícula germinativa) desde a vida intra-uterina. No momento da punção folicular a mulher é submetida a sedação e, em posição ginecológica e guiada por ultra-som, os folículos ovarianos são aspirados por agulha introduzida através da parede vaginal. Após a punção, os oócitos são avaliados quanto à ocorrência da extrusão do primeiro corpúsculo polar (Fig. 28.1B), o que define sua maturidade. São então tratados com hialuronidase, que remove as células do cúmulus (Fig. 28.1A), colocados em meio de cultura por algumas horas, que os prepara para receber o sêmen previamente processado do parceiro. Cerca de 18 horas depois ocorre a formação dos dois pró-núcleos (Fig. 28.1C), e, logo a seguir, a singamia, fusão dos pró-núcleos. A transferência dos pré-embriões pode ser realizada no terceiro dia após a punção dos oócitos, quando o pré-embrião tem entre seis e oito células ou, dependendo das condições técnicas do laboratório, até cinco dias após a punção, quando é atingido o estágio de blastocisto (Fig. 28.2). Neste último caso, a técnica de cultivo deve incluir a troca dos meios de cultura usuais, no terceiro dia, para meios de cultura apropriados para a evolução dos pré-embriões até blastocisto.

Indicações da FIV

A FIV clássica, que acaba de ser descrita, é um procedimento indicado quando há um fator feminino de infertilidade, como problemas ovulatórios, obstrução tubárea ou endometriose. É necessário que o parceiro possua parâmetros seminais adequados, isto é, uma concentração de no mínimo 6×10^6 spz/ml, com boa morfologia e motilidade. O espermatozóide que penetra o oócito não é selecionado artificialmente. Um risco que não pode ser evitado com a FIV clássica é a penetração de mais de um espermatozóide no mesmo oócito, originando a formação de três pró-núcleos (Fig. 28.3) e, conseqüentemente, um zigoto triplóide.

As demais variáveis associadas são comuns a todas as técnicas complexas de reprodução assistida, e podem ser classificadas em variáveis técnicas, como a questão de o protocolo de estimulação utilizado conter FSH puro ou associado ao LH, condições do laboratório etc., variáveis como o papel da polaridade oocitária nos índices de sucesso e risco de eventuais anomalias, e as variáveis propriamente biológicas, como a resposta da mulher à estimulação ovariana e a estrutura e a composição final do endométrio para que receba o pré-embrião (revisão em Giudice (1999)¹²).

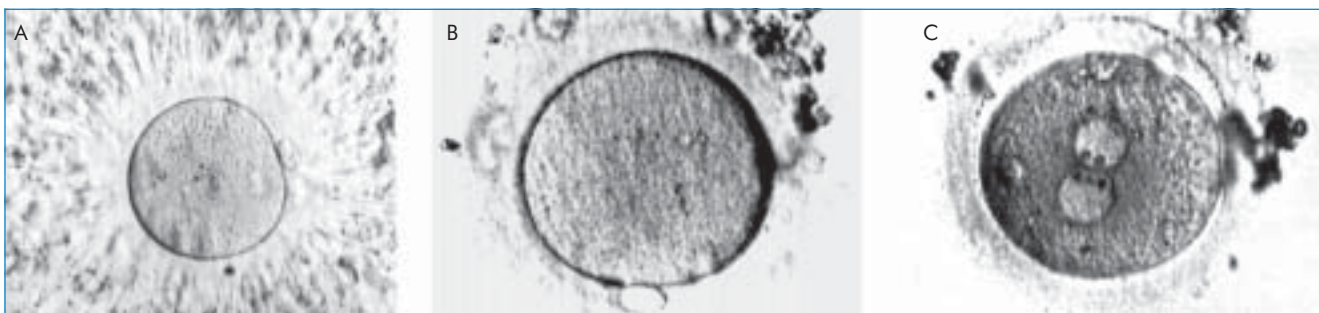


Fig. 28.1 — a) oócito maduro, com células do cúmulo se dispendo de forma radiada; b) oócito em metáfase II, após a extrusão do primeiro corpúsculo polar; c) estágio de 2 pró-núcleos, cerca de 16 a 18 horas após a fertilização e antes da singamia.

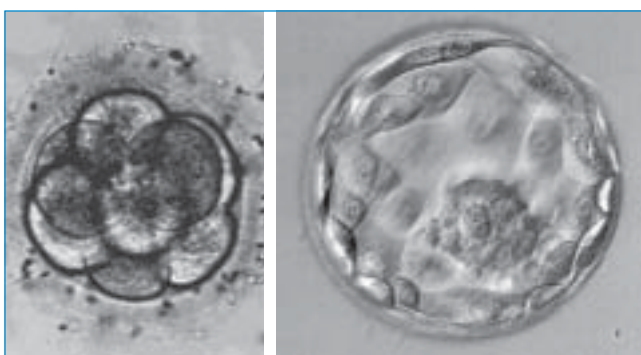


Fig. 28.2 — Pré-embriões obtidos in vitro. À esquerda, um pré-embrião de boa qualidade no estágio de 8 células, resultado de FIV clássica, em que podem ser notados espermatozoides aderidos à zona pelúcida; à direita pré-embrião no estágio de blastocisto (quinto dia).

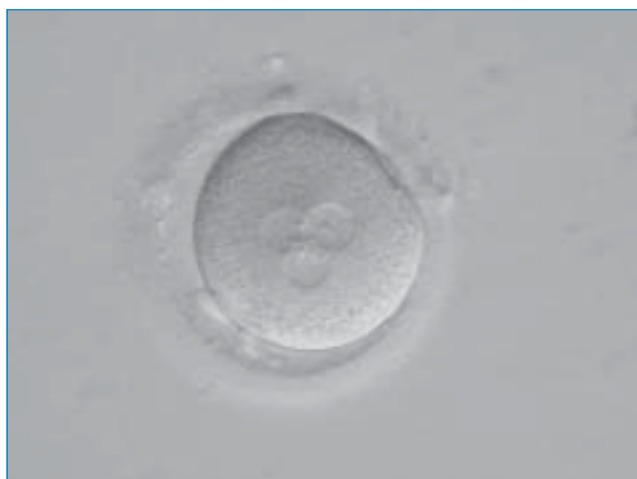


Fig. 28.3 — Pré-embrião de 16-18 horas em que houve a formação de 3 pró-núcleos.

A FIV UTILIZANDO A ICSI

A história da Injeção Intracitoplasmática de espermatozoides¹³ (ICSI — Intra Cytoplasmic Sperm Injection), desenvolvida em 1992 (Fig. 28.4), foi bastante diferente da história de FIV clássica. A invenção e o desenvolvimento da ICSI seguiram precisamente o caminho inverso que uma tecnologia inovadora em medicina deve seguir¹⁴. A abordagem da ICSI foi capitaneada pelo “tratamento” clínico, sem que as etapas de teste tivessem sido cumpridas inicialmente em modelos animais, depois em mamíferos mais evoluídos, passando para a utilização experimental em casos selecionados e mediante consentimento informado. A ICSI foi diretamente utilizada em seres humanos e vem sendo, desde então, oferecida para resolver problemas graves de infertilidade masculina, isto é, homens com pequena produção de espermatozoides, insuficientes para a realização da FIV convencional.

A ICSI consiste no preparo da mulher pelos mesmos métodos utilizados na FIV clássica e no preparo do sêmen também da forma usual. No entanto, é utilizado um sofisticado aparelho de micromanipulação que prende por aspiração suave o oócito, que é então penetrado por uma agulha de mi-

croinjeção contendo o espermatozóide. O gameta masculino, antes de ser injetado, é colocado em uma microgota de PVP (polivinilpirrolidona), uma substância viscosa que tem a finalidade de diminuir sua movimentação para que possa ser capturado. A cauda do espermatozóide é então quebrada, logo abaixo da peça intermediária, e o gameta é aspirado para dentro da pipeta de microinjeção e dela para dentro do oócito, bem no interior do citoplasma.

Paralelamente, para os homens azoospermicos procedimentos puramente paliativos foram desenvolvidos com a finalidade de captar espermatozoides diretamente dos testículos ou dos epidídimos ou maturar *in vitro* células ainda mais imaturas, como as espermátides, para utilização na ICSI. Os riscos envolvidos serão discutidos ao longo dos itens a seguir.

A FIV UTILIZANDO A OVODOAÇÃO

A ovodoação, ou doação de oócitos, é uma técnica de reprodução assistida na qual o gameta feminino é obtido de

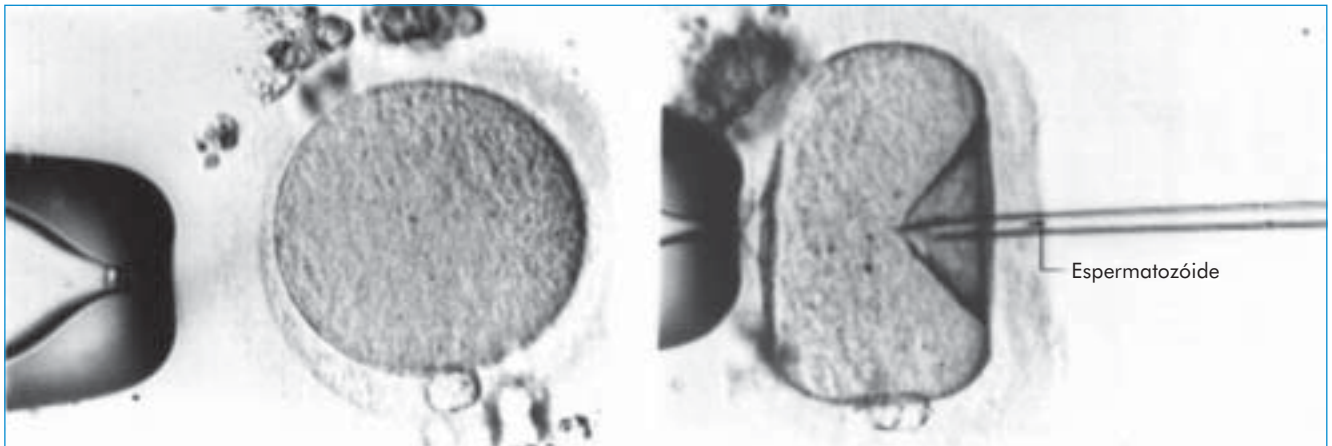


Fig. 28.4 — ICSI-Injeção Intracitoplasmática de Espermatozói-des. Técnica de reprodução e fertilização assistida, indicada quando o homem possui um número pequenos de espermatozói-des, insuficiente para realizar uma inseminação intra-uterina ou a fertilização in vitro convencional. É realizada em um sofisticado equipamento denominado micromanipulador, que consiste em um sistema hidráulico de apreensão do ócito (a) utilizando pipeta rombuda, e outro para aspiração do espermatozói-de e sua injeção no interior do ócito (b). Antes da injeção, o espermatozói-de é colocado em meio contendo polivinilpirrolidona (PVP) e sua cauda é quebrada, de modo a imobilizá-lo, facilitando sua apreensão pela pipeta injetora.

uma mulher diferente daquela que receberá o embrião dele resultante¹⁵. Normalmente a doadora de óocitos também necessita das ARTs em função de um fator masculino de infertilidade ou de um fator tubáreo (ligadura prévia das trompas ou obstrução tubárea por qualquer motivo). Nesses casos a doadora é submetida a hiperestimulação controlada dos ovários, e os gametas obtidos são separados em dois lotes, um para a própria doadora e outro que será doado para a receptora. Os óocitos são então incubados e submetidos a FIV (clássica ou ICSI) com sêmen dos respectivos parceiros, devidamente processados. Os embriões resultantes são então transferidos para a própria doadora e para a receptora, que teve seu endométrio preparado num procedimento denominado sincronização. O cultivo dos pré-embriões até blastocisto facilitou em muito a sincronização doadora-receptora, na medida que estendeu em três a quatro dias a possibilidade de transferência, casando com a janela de implantação que, *in vivo*, se dá nesse período.

A ovodoação é a única forma de reprodução para as mulheres sem reserva ovariana, conforme será visto a seguir. Existem alguns relatos de gestação em mulheres portadoras de disgenesia gonadal pura 45, X em programas de ovodoação. A evolução desses casos é comparável com a de outros grupos de mulheres, com cerca de 40% de gestações por ciclo e 19% de gestações a termo¹⁶.

No Brasil os programas de ovodoação usualmente são utilizados como uma espécie de moeda de troca. Para muitas mulheres, entrar como doadoras de óvulos é a única forma de poderem vir a integrar um programa de reprodução assistida, dados os altos custos envolvidos.

A FIV E O DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRÉ-IMPLANTACIONAL — DGPI

O diagnóstico genético pré-implantacional (DGPI) pode ser considerado como uma técnica especial de reprodução assistida. Embora seja utilizado usualmente em casais sem problemas de fertilidade, mas em risco considerável de transmitir doenças geneticamente determinadas, é necessário que os embriões sejam obtidos em laboratório para que possam ser investigados.

O DGPI é realizado no terceiro dia, quando o pré-embrião se encontra no estágio de 6 a 8 células (Fig. 28.5), todas totipotentes. Utilizando o ácido tyrode ou um tiro de *laser*, é realizado um pequeno orifício na zona pelúcida do pré-embrião, bem à frente do blastômero que se deseja retirar. Com uma pipeta de calibre adequado, o blastômero é gentilmente aspirado e encaminhado para os testes adequados. As técnicas mais comuns empregadas para o diagnóstico são o FISH (hibridização fluorescente *in situ*)¹⁷ e a reação em cadeia da polimerase (PCR). O blastômero retirado será depositado sobre uma lâmina, se for realizado FISH, ou dentro de um microtubo, se o procedimento a ser utilizado for uma PCR. O FISH tem sido empregado no diagnóstico de aneuploidias de três, cinco ou até oito cromossomos no pré-embrião de oito células, enquanto o PCR identifica erros moleculares envolvidos com risco de transmissão à prole de 25 a 50% (Tabela 28.1). Quando não há forma de diagnóstico molecular de uma afecção ligada ao X, o FISH pode ser utilizado para uma rápida e eficiente determinação do sexo do embrião. Após os testes, o embrião não afetado pelo problema investigado poderá ser transferido para o útero materno.

O DGPI já está disponível para inúmeros problemas geneticamente determinados (Tabela 28.2), mas no Brasil poucas clínicas o realizam de forma mais sistemática, atendendo casos triados por um centro de aconselhamento para doenças geneticamente determinadas. Precisam ser incentivadas parcerias dos programas de reprodução assistida com centros de excelência em diagnóstico molecular da síndrome do X-frágil e das distrofias musculares, como os centros do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo.

A vantagem que o DGPI oferece, além da precocidade do diagnóstico, é a de o casal não ter que se deparar com um resultado desfavorável no diagnóstico pré-natal, especialmente no Brasil, onde a opção pela interrupção da gestação, em caso de anomalia fetal, ainda não está legalmente autorizada, embora tenha sido juridicamente permitida em vários casos de fetos acometidos por problemas incompatíveis com a vida.

No Brasil o DGPI é quase que exclusivamente utilizado para os casos de falhas repetidas de implantação, isto é, casais que produzem gametas, que produzem pré-embriões que, no entanto, não evoluem além das primeiras semanas de gestação, antes mesmo de a gestação ser confirmada clinicamente.

Uma das maiores causas de falha no desenvolvimento ou na implantação de embriões obtidos por FIV é a ocorrência de aberrações cromossômicas^{18,19}. Na verdade, a maioria dos embriões humanos, de casais férteis ou inférteis, possui aberrações cromossômicas, o que explica o fato de mesmo casais férteis não terem mais do que 20% de chance de engravidar a cada ciclo.

O problema do DGPI tão precoce para aberrações cromossômicas está relacionado à questão do mosaicismos. Mosaicismos confinados aos tecidos extra-embriônicos foram o tópico de discussão dos anos 1980. Embrião normal, vilo corial ou líquido amniótico, não. Esse fenômeno, que retomaremos de forma breve na discussão da dissomia uniparental, já está renunciado no pré-embrião obtido por FIV. O mosaicismos em pré-embriões de seis a oito células foi bastante documentado na literatura, e suas frequências são realmente altas. O diagnóstico de uma aneuploidia em uma das seis ou oito células de um pré-embrião não significa muita coisa. O erro

que se comete ao pautarmos nossa decisão sobre qual embrião transferir é grande. No entanto, há os que advogam que naqueles casos de falha de implantação o DGPI realmente auxilia. Talvez o orifício aberto na zona pelúcida é que tenha um fator decisivo na eclosão do embrião, o que facilitaria a implantação nesses casos. Em suma, o DGPI para aneuploidias é questionável, e estudos deverão nortear sua utilização.

RESERVA OVARIANA E HIPERESTIMULAÇÃO CONTROLADA DOS OVÁRIOS

O FSH e o LH, atuando por intermédio de seus receptores (FSHR e LHR), são os protagonistas do desenvolvimento folicular. O estrito ajuste da proporção guardada entre o FSH e o LH é realizado por retroalimentação positiva e negativa no eixo hipotálamo-hipofisário-gonadal (HHG), tanto por peptídeos ovarianos quanto pelos hormônios esteróides. A qualidade desse processo irá determinar a qualidade do corpo lúteo dele resultante²⁰.

A imensa variedade fenotípica na resposta dos ovários (e também dos testículos) aos hormônios do eixo HHG pode ser creditada aos vários polimorfismos intrônicos, exônicos e nas regiões que flanqueiam os sítios de *splicing* (onde se processam os cortes na molécula do RNAm) dos genes envolvidos²¹. O papel de polimorfismos isolados e do resultado da presença de diferentes polimorfismos num mesmo indivíduo precisa ser elucidado, na medida em que pode auxiliar em muito os resultados das ARTs.

GONADOTROFINAS E SEUS RECEPTORES

O primeiro estágio do desenvolvimento folicular é independente da ação das gonadotrofinas, o FSH e o LH, mas não da influência dos andrógenos, que estimulam o aumento numérico e promovem o desenvolvimento do folículo primário até o estágio pré-antral²² (diâmetro de 8 mm). Células da granulosa expressam o receptor de andrógenos, e o hiperandrogenismo, característico da síndrome dos ovários policíti-



Fig. 28.5 — Seqüência de eventos envolvidos no diagnóstico genético pré-implantacional (DGPI); da esquerda para a direita, fixação do embrião, abertura da zona pelúcida utilizando laser e aspiração do blastômero.

GENÔMICA E REPRODUÇÃO ASSISTIDA

Tabela 28.1
Doenças Genéticas Transmissíveis à Prole para as Quais está Disponível
o Diagnóstico Genético Pré-Implantacional (DGPI)

• Adrenoleucodistrofia	• Hidrocefalia ligada ao X
• Anemia falciforme	• Ictiose
• Anemia de Fanconi	• Megacólon agangliônico congênito
• Ataxia cerebelar	• Miopatia de Namaline
• Ataxia de Friedrich	• Miopatia miotubular
• Atrofia muscular espinobulbar	• Miopatia miotubular
• Betatalassemia	• Miopatia mitocondrial
• Condrodisplasia <i>punctata</i>	• Miotonia congénita
• Deficiência da hipoxantina-guanidina fosforibosil transferase (HRTT)	• Nefrolitíase
• Deficiência de Fator IX	• Neoplasia endócrina múltipla tipo II
• Deficiência de Fator VIII	• Neurofibromatose I e II
• Distrofia muscular de Becker	• Neuropatia sensorio-motora hereditária
• Distrofia muscular de Duchenne	• Osteogênese imperfeita tipos I e IV
• Doença de Charcot-Marie-Tooth	• Paramiotonia congénita
• Doença de estocagem do glicogênio	• Paraparesia espástica familiar
• Doença de Gaucher	• Paraplegia espástica hereditária
• Doença de Hers	• Retinite pigmentosa
• Doença de Hirschprung	• Síndrome da Ictiose, atriquia e fotofobia
• Doença de Huntington	• Síndrome de Conradi-Hunerman
• Doença de Lou Gehrig	• Síndrome de Gardener
• Doença de Parkinson	• Síndrome de Hunter MPS II
• Doença de Strumpell	• Síndrome de Kallmann
• Doença de Tay-Sachs	• Síndrome de Kelley-Seegmiller
• Doença de von Willebrand	• Síndrome de Kennedy
• Epidermólise bolhosa distrófica	• Síndrome de Lesh-Nyhan
• Esclerose amiotrófica lateral	• Síndrome de Stein-Leventhal
• Fenilcetonúria	• Síndrome do X-frágil
• Fibrose cística	• Trombocitopenia
• Hemofilia	

cos, é um dos responsáveis pelo grande número de folículos com menos de 8 mm presente nos ovários dessas mulheres. No entanto, a função ovulatória nelas está comprometida justamente pelo grande número de pequenos folículos produzindo esteróides, o que promove a disrupção da retroalimentação do eixo HHG²². A partir do estágio de folículo pré-antral, as células somáticas da granulosa e da teca passam a expressar receptores das gonadotrofinas (GNTs), e a presença de receptores marca a mudança na regulação, de intra- para extra-ovariana. As células da granulosa expressam o FSHR em resposta ao estímulo do próprio FSH, que estimula também a expressão das enzimas esteroidogênicas e a do receptor de LH nas células da teca e da granulosa²³. Nas células da teca o LH induz a produção de andrógenos, que serão convertidos a estrógenos pela ação da aromatase, nas células da granulosa (Fig. 28.6). Mais tarde, por ação do próprio LH as células da granulosa reduzem o ritmo de proliferação e aumentam o da síntese de progesterona.

Células da granulosa luteinizada, cultivadas na presença de FSH puro, produzem duas vezes mais progesterona e estrógeno do que quando cultivadas com gonadotrofina de mulher menopausada²⁰, que contém quantidades iguais de FSH e LH. Mulheres com LH elevado, como as portadoras da síndrome dos ovários policísticos^{24,25}, obtêm menor sucesso nos programas de reprodução assistida. Os programas que utilizam FSH ultrapuro ou o FSH recombinante são os que possuem os melhores resultados. Níveis altos de LH também estão associados a uma maior taxa de perdas gestacionais precoces.

Uma vez que o lote de folículos antrais é recrutado, somente aquele folículo do lote capaz de responder à elevação sutil do FSH, isto é, com o menor limiar ao hormônio, continuará a crescer, transformando-se no folículo dominante. Usualmente, um único folículo resultará em um oócito maduro e um corpo lúteo funcional. Foi descrita mutação no receptor do FSH, resultando em um receptor mais sensível ao hormônio em homozigose em mulher com gestação gemelar

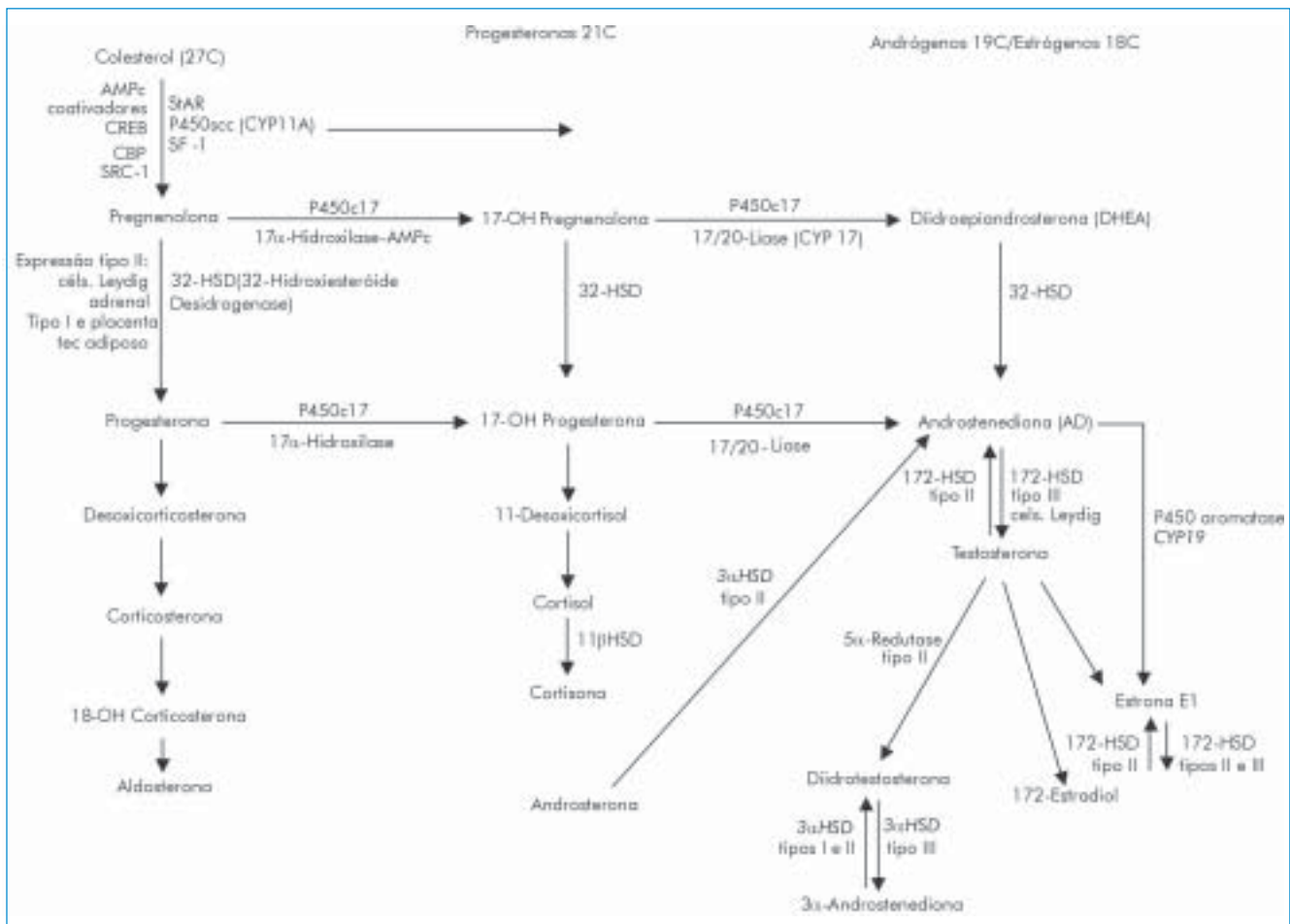


Fig. 28.6 — Biossíntese dos hormônios esteróides. O colesterol, uma molécula contendo 27 átomos de carbono, é convertido em um esteróide de 21 carbonos pela remoção de um fragmento de 6 carbonos, o isocapraldeído. Esse precursor de 21 carbonos, da classe das progesteronas, é subseqüentemente transformados nos andrógenos (esteróides com 19-carbonos) que são convertidos em estrógenos (esteróides de 18-carbonos). As enzimas responsáveis pela conversão de cada etapa estão mostradas.

de repetição²⁶. Numa hipótese, mutações semelhantes, com efeitos semelhantes, poderiam estar envolvidas na síndrome da hiperestimulação ovariana, em que doses usuais de GNTs, usadas durante a hiperestimulação ovariana, resultam numa hiper-resposta proliferativa dos ovários, colocando em risco a vida da paciente. Mutações em LHR também foi descrita em mulher com síndrome do hiperestímulo²⁷.

Mutações nas GNTs e em seus receptores

As GNTs são hormônios heterodiméricos, constituídos por uma subunidade β específica ligada de forma não-covalente a uma subunidade α comum a todas²⁸. As GNTs atuam mediadas por seus receptores transmembrana acoplados à proteína-G e com transdução de sinal regulada pelos níveis de AMPc intracelular²⁸.

As patologias associadas a mutações nas GNTs e em seus receptores estão resumidas na Tabela 28.2, e atuam de forma muito diferente em indivíduos 46,XX e 46,XY.

Usualmente chegam às clínicas de reprodução assistida somente os distúrbios leves da diferenciação sexual, em que a infertilidade é o sinal clínico "único". Mais raramente surgem os casos de reversão sexual completa, representados por pacientes com amenorréia primária e cariótipo 47,XY. Nesses casos, mutações em LHR devem ser descartadas, bem como mutações no receptor de andrógenos.

Nos indivíduos 46,XY, mutação com comprometimento parcial da função de LHb foi descrita em garoto de 17 anos com hipogonadismo caracterizado por atraso puberal, níveis elevados de LH e normais de FSH e testosterona e biópsia testicular com agenesia de células de Leydig²⁹. Tratamento com hCG melhorou o quadro clínico e resultou em elevação da concentração seminal para 11×10^6 spz/ml²⁹. Mutações que comprometem parcialmente a função dos receptores de LH e dos andrógenos também foram descritas em homens inférteis e em homens com micropênis ou hipospádia isolada³⁰.

Defeitos no metabolismo do LH em mulheres 46,XX resultam de problemas em foliculogênese, anovulação, ausência de fase lútea, atraso puberal, amenorréia e infertilidade. Mulheres com mutação tanto em LHb quanto em LHR apresentam níveis elevados de LH e/ou FSH e baixos de estradiol e progesterona. Ao ultra-som o útero é hipoplásico e os ovários se apresentam com grandes cistos foliculares (de até 30mm). Biópsia ovariana identifica teca bem desenvolvida, ausência de folículos pré-ovulatórios e de corpo lúteo³¹. A presença de receptores não-funcionais de LH impede a resposta do folículo ao pico natural ou simulado de LH realizado com hCG 36 horas antes da punção ovariana. Como resultado, folículos sem oócitos ou somente com oócitos imaturos.

Mutações em FSH β , que conferem uma redução na bioatividade do hormônio ou em sua estabilidade, foram descri-

tas em mulheres com amenorréia primária ou secundária. Algumas mutações, mesmo em heterozigose, são capazes de alterar a regularidade dos ciclos menstruais e a fertilidade³². O tratamento com FSH exógeno restaura a fertilidade dessas mulheres. Homens com mutação em FSH β , no entanto, são normais.

Na Finlândia³³, mas não em outras regiões do mundo^{34,35}, mutações em FSHR estão associadas à amenorréia primária ou secundária e à menopausa precoce. Em homens, mutação em homozigose em FSHR confere graus variados de falência espermatogênica, mas sem azoospermia³⁶.

RESERVA OVARIANA E FALÊNCIA OVARIANA PREMATURA — FOP

Outro pré-requisito para a resposta dos ovários à estimulação com as GNTs é a quantidade de folículos disponíveis para recrutamento num ciclo menstrual, conhecida como reserva ovariana. A reserva ovariana é função da idade e determinada por um conjunto de genes que atuam desde a vida embrionária, responsáveis pela auto-renovação das células germinativas.

A falência ovariana representa o estágio final de uma variedade de problemas que resultam em perda dos folículos ovarianos e amenorréia (ausência de menstruação) antes dos 40 anos. Embora a FOP não seja uma doença incomum, sua etiologia permanece confusa, sugerindo o envolvimento de várias causas raras que, somadas, conferem uma prevalência do problema entre 1 e 3% das mulheres.

Os ovários são contemplados ao nascimento com um número fixo de folículos primordiais que diminuem de forma constante ao longo da vida, resultado tanto da atresia quanto do recrutamento durante a ovulação. Além desses dois mecanismos, alterações no recrutamento folicular e em sua maturação estão dentro das manifestações mais sutis da FOP³⁷. Dentre as manifestações mais sutis estão a síndrome dos ovários resistentes (SOR) e a menopausa antecipada.

Na SOR as mulheres se apresentam com aparato ovariano e ciclos menstruais normais, mas com níveis elevados de GNTs, como se fosse uma transição prolongada para a menopausa; esses seriam casos candidatos a mutações com comprometimento sutil da função de FSHR ou com algum tipo de polimorfismo que pudesse estar associado a uma aceleração da depleção folicular, predispondo à FOP³⁸.

Recentemente uma nova categoria de disfunção ovariana foi introduzida, a menopausa antecipada, entre 40 e 45 anos de idade. Análise de genealogia de 36 pacientes indicou padrão de herança semelhante entre a menopausa antecipada e a FOP, sugerindo se tratar da mesma patologia genética com expressão variável³⁹.

Tabela 28.2
Genes Envolvidos com o Eixo Hipotalâmico-Hipofisário-Gonadal Resultando em:

Gene	Locus	Produto	Fenótipo	
			Sexo	Sinais clínicos
DAX1 (AHC)	Xp21	Receptor hormonal nuclear órfão	M	Falência adrenal, HHG
KAL	Xp22	Proteína de matriz extracelular	M	HHG, anosmia, agenesia renal, sincinesia
GnRHR	4q21	Receptor acoplado à proteína G	M	Atraso puberal, HHG, ↓libido, ↓volume testicular, pênis pequeno, pouca barba, oligozoospermia grave
			F	Atraso puberal, telarca variável, amenorréia, hipoestrogenismo
HESX1	3p21	Homeodomínio TF	M/F	Displasia septo-óptica, pan-hipopituitarismo
PROP1	5q35	Homeodomínio TF	M/F	HHG variável, deficiência de GH e TSH, deficiência de cortisol (espectro variável mesmo com as mesmas mutações)
FSHb	11p13	Hormônio glicoproteico	M	Puberdade variável, hipogonadismo, azoospermia
			F	Amenorréia primária, ausência de telarca
FSHR	2p21-p16	Receptor acoplado à proteína G	M	Graus variados de hipogonadismo, oligozoospermia moderada
			F	Amenorréia primária ou secundária, puberdade variável
LHb	19q13	Hormônio glicoproteico	M	Atraso puberal, azoospermia, infertilidade
			F	Infertilidade? Polimorfismos
LHR	2p21	Receptor acoplado à proteína G	M	Espectro: completa feminilização/hipospadia/micropênis/azoospermia
			F	Puberdade normal, amenorréia primária ou secundária, oligoamenorréia, falha na retomada da meiose, ovários císticos
ERa	6q25	Receptor hormonal nuclear	M	Puberdade normal, crescimento linear prolongado, viabilidade subnormal dos espermatozoides
AR	Xq11-q12	Receptor hormonal nuclear	M	Espectro: feminilização completa/hipospadia/infertilidade
AR↑ _(CAG)			M	Espectro em função do número de repetições: infertilidade/síndrome de Kennedy
AR↓ _(CAG)			M	Câncer de próstata
			F	Hirsutismo

HHG: hipogonadismo hipogonadotrófico; TF: fator de transcrição. Mutações ativadoras de LHR e FSHR não foram incluídas.

Estudos de famílias sugerem que a forma idiopática da FOP deva ser herdada com padrão autossômico dominante e limitado ao sexo, ou ligado ao X com penetrância incompleta^{40,41}. A anamnese dos casos de FOP, ou mesmo a prática ginecológica, são fundamentais para a identificação dos casos de risco. Famílias com duas ou mais mulheres afetadas, tanto pelo lado paterno quanto pelo lado materno do caso-índice, indicam um risco para o gene, ou conjunto de genes, de cerca de 80%, com penetrância nas mulheres em cerca de 60% das famílias, além do fenômeno de antecipação, definido como a manifestação clínica progressivamente mais precoce nas gerações sucessivas^{40,41}.

Dois polimorfismos presentes em FSHR, um no domínio extracelular (Ala307Thr) e outro no domínio intracelular (Asn680Ser) foram descritos³⁸ e observados tanto em indivíduos férteis quanto inférteis, ocorrendo na forma de duas variantes alélicas caracterizadas pela combinação Thr307/Asn680 e Ala307/Ser680, respectivamente. As duas variantes conferem uma afinidade diferente do hormônio ao receptor e, embora não resultem em diferenças nos níveis séricos de FSH ou inibina B, somente a variante Ala307/Ser680 foi encontrada nas 49 mulheres com FOP e nas cinco com SOR estudadas por Conway *et al.*³⁸ ou nos homens inférteis descritos por Simoni *et al.*⁴²

Existe uma clara relação causal entre depleção folicular e menopausa, e existe uma aceleração gradual na perda folicular no mínimo 10 anos antes da cessação dos ciclos menstruais. Modelos matemáticos foram construídos fornecendo evidências dessa relação e indicando que a menopausa é deflagrada quando o ovário atinge um determinado número de folículos, fixado em cerca de 1.100²³. Hoje, as linhas de investigação em FOP e em suas variações de expressão fenotípica devem centrar esforços na caracterização de marcadores capazes de prever, 10 anos antes, que a reserva ovariana tenha atingido o número crítico de folículos. Para essas mulheres, a orientação exclusiva ainda é a antecipação da maternidade. No futuro, o congelamento de tecido ovariano poderá vir a ser uma solução.

FOP e aberrações cromossômicas

A FOP pode também ser causada por aberrações cromossômicas, como na disgenesia gonadal pura 45,X (ou síndrome de Turner) e em suas variações citogenéticas. A incidência de todos os tipos de aberrações do cromossomo X em recém-nascidos do sexo feminino é de 1:2.000; 50% delas apresentam cariótipo 45, X puro, 30 a 40% são mosaicos envolvendo uma linhagem 46, XX normal, e 10 a 20% apresentam isocromossomo Xq (um cromossomo X com dois braços longos e nenhum braço curto — Xp). A haploinsuficiência de ZFX, gene situado na região que se estende de Xp22.3 a Xp21.2, faz dele um gene candidato ao fenótipo de Turner⁴³. Nocaute de ZFX em fêmeas de camundongo resulta em falência ovariana prematura (FOP)⁴⁴.

FOP e a expansão do número de repetições CGG do gene FMR1

Deleção total de Xq resulta em amenorréia primária, sem os sinais clínicos típicos da Síndrome de Turner. Deleções parciais de Xq resultam em graus variados de comprometimento ovariano. A menor deleção associada à FOP foi identificada em Xq26-Xq28,⁴⁵ tendo sido sugerida existência do locus POF1, com pelo menos um gene candidato importante, FMR1, responsável pela síndrome do X-frágil. A síndrome do X-frágil é a forma mais comum de retardo mental ligado ao X em homens. A síndrome é causada pela disrupção do exon-1 do gene FMR1, em função da expansão do número de repetições de trinucleotídeos CGG (FRAXA) que, quando superior a 200, promove a metilação do promotor e conseqüente silenciamento do gene. Expressão de FMR1 foi identificada nas gônadas fetais, e alelos contendo uma pré-mutação (entre 50 e 200 repetições CGG) possuem um efeito deletério sobre as células germinativas dos ovários. Pré-mutações FRAXA foram identificadas em genealogias com FOP fami-

lial⁴⁶. Hoje se conhece um pouco mais dos mecanismos moleculares pelo quais uma pré-mutação atinge sua forma completa (expansão das repetições de trinucleotídeos), e um deles se dá durante a meiose. Desta forma, mulheres com FOP identificadas como portadoras de pré-mutação FRAXA, devem receber aconselhamento genético específico antes de serem submetidas as ARTs. As ARTs, uma vez que podem oferecer chances efetivas de reprodução a essas mulheres, estarão possibilitando a eventual transmissão da síndrome do X-frágil.

GENES ASSOCIADOS À AUTO-RENOVAÇÃO DAS CÉLULAS GEMINATIVAS

O primeiro estágio do desenvolvimento gonadal é estabelecido pela migração das células germinativas primordiais para as cristas gonadais e pela cascata de mitoses que, em última instância, irá definir a capacidade da gônada⁴⁷. Recentemente, foi identificado o gene *piwi* em *Drosophila*⁴⁸ responsável pela auto-renovação e manutenção das células germinativas (CG). Mutações recessivas em *piwi* afetam tanto machos quanto fêmeas. As gônadas adultas possuem CG incapazes de auto-renovação, ou por uma redução de sua capacidade mitótica ou por uma diferenciação prematura, implicando uma produção limitada de gametas (igual ao número de CG) e infertilidade^{47,48}. Já foram identificados os homólogos murino (*miwi*)⁴⁹ e humano (*hiwi*) do gene *piwi*, mas estudos de mutação em homens e mulheres inférteis ainda não foram realizados.

A interação entre o receptor *c-kit* e seu ligante (*kit-LG*, ou fator de crescimento dos mastócitos ou, ainda, fator steel) é fundamental para a sobrevivência das células germinativas e para a organização das células da granulosa em estrutura multicamadas⁵⁰. Mutações de ponto no receptor *c-kit* de camundongos afetam exclusivamente a fertilidade por deficiência numérica de células germinativas. A expressão de *c-kit* nas espermatogônias de animais adultos mostrou um decréscimo significativo, sugerindo o envolvimento de *c-kit* na redução da fertilidade em função do envelhecimento⁵¹.

Outro gene envolvido não propriamente com o número de folículos disponíveis mas com sua sobrevivência é *dazl* (*dazl-like*). *Dazl* está envolvido com a fertilidade do indivíduo adulto⁵². *Dazl* se expressa tanto em testículos quanto nos ovários, e fêmeas com nocaute de *dazl* em homozigose (*dazl*^{-/-}) apresentam uma proliferação inicial adequada das células germinativas, seguida por atresia e redução drástica no número final de oócitos⁵², com ovários sem estrutura folicular, mas com células esteroideogênicas espalhadas de forma desorganizada por todo o ovário adulto⁵³. Essas células possuem atividade enzimática típica das células da teca ovariana (com ação da β HSD e da 17- α hidroxilase) e da granulosa (com atividade da enzima aromatase). A produção total de estróge-

nos nesses animais é suficiente para promover a proliferação endometrial, mas insuficiente para regular a retroalimentação tanto do FSH quanto do LH, que se apresentam elevados⁵². O fenótipo apresentado pelas fêmeas de camundongo lembra o das mulheres com falência ovariana, mas pesquisas de mutação no gene *dazla* humano em mulheres com falência ovariana hipergonadotrófica ainda não foram realizadas.

ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS, IDADE AVANÇADA E INFERTILIDADE

A constituição cromossômica de um indivíduo é a primeira etapa para a garantia da fertilidade. Dependendo da gravidade do quadro clínico apresentado pelo paciente infértil, pode-se encontrar até 20% de aberrações cromossômicas.

Usualmente as aberrações cromossômicas dos indivíduos inférteis são caracterizadas por translocações equilibradas (robertsonianas ou recíprocas) e por monossomias ou trissomias dos cromossomos sexuais⁵⁴. Atenção crescente tem sido prestada aos polimorfismos envolvendo as variações nas regiões heterocromáticas e as inversões cromossômicas, especialmente as pericêntricas, uma vez que estão significativamente mais representadas no cariótipo de casais inférteis.⁵⁵

A fertilidade da mulher declina a partir dos 37 anos, justamente quando o risco para aberrações cromossômicas na prole começa a subir. O declínio da fertilidade se deve a uma redução da reserva ovariana. A associação entre idade materna e aumento do risco para aberrações cromossômicas, resultado de não-disjunção, apesar de consagrada na literatura médica, ainda é uma grande questão na genética humana.

Várias teorias foram propostas para explicar a correlação entre idade materna e não-disjunção, e todas propõem uma deterioração de fatores celulares necessários à formação e ao funcionamento do fuso, com comprometimento da progressão da meiose e da segregação dos homólogos, resultando em oócitos portadores de aneuploidias. Esse fato acaba por influenciar também os índices de sucesso em um programa de FIV, na medida que estudos com FISH de embriões parados (sem clivagem por 24 horas) produzidos por FIV correlacionaram a idade materna tanto às aneuploidias quanto às poliploidias e mosaicismos complexos⁵⁶.

No homem a correlação entre idade e aberrações cromossômicas ainda é um dado controvertido. Estudo de 21.597 gestações obtidas com sêmen de doador indicou um aumento estatisticamente significativo na ocorrência de aberrações cromossômicas (especialmente trissomia do cromossomo 21) em função das idades materna e paterna, especialmente quando o doador tinha 45 anos ou mais⁵⁷. Segundo os autores, o resultado ainda carece de explicações biológicas, mas encorajou o estabelecimento de 45 anos como idade-limite superior dos

doadores de sêmen na França⁵⁷. Num outro estudo, de dois grupos de homens da população geral tomados ao acaso, um com menos de 30 anos e outro com mais de 60 anos, não foram encontradas diferenças na frequência de aneuploidias nos espermatozoides⁵⁸.

Outro aspecto importante é a correlação entre infertilidade masculina caracterizada por baixa qualidade seminal e não-disjunção cromossômica^{59,60,61}. Estudos utilizando FISH em espermatozoides permitiu, dada a facilidade em analisar um grande número de células, estabelecer que nos espermatozoides a não-disjunção não é incomum. Além disso, a não-disjunção é mais freqüente entre os cromossomos sexuais que nos autossomos, e dentre os autossomos, o cromossomo 21 é o que apresenta maior frequência de não-disjunção⁶².

Nos estudos moleculares que rastreiam a origem parental do cromossomo adicional nos nascidos vivos, em 91% dos casos de trissomia do 21 o cromossomo extra é de origem materna, enquanto nas aberrações dos cromossomos sexuais a imensa maioria é explicada por não-disjunção paterna⁶³. A monossomia do X (45,X) é, em cerca de 80% dos casos, devida à nulissomia de cromossomos sexuais nos espermatozoides, e nos nascidos 47,XXY o X adicional é de origem paterna em 50% dos casos⁶³. Nos espermatozoides de homens com parâmetros seminais ruins, os erros de segregação são gerados preferencialmente na primeira divisão meiótica, semelhantes aos que ocorrem nos oócitos em função da idade materna citados antes^{59,61}.

ABERRAÇÕES CROMOSSÔMICAS EM CRIANÇAS NASCIDAS PELAS ARTS

A utilização das técnicas de reprodução assistida, especialmente da ICSI, está envolvida com um aumento do número de aberrações cromossômicas na prole dos casais inférteis, muito provavelmente em função da baixa qualidade seminal dos casos selecionados para ICSI. Revisão dos casos de ICSI nascidos indica um número estatisticamente superior de rearranjos autossômicos de novo, bem como de aberrações dos cromossomos sexuais de novo em relação aos dados da população geral, independente do fator idade materna^{64,65}. Também é maior a incidência de aberrações cromossômicas, principalmente de cromossomos sexuais⁶⁵, em crianças nascidas de ICSI quando comparadas às nascidas de FIV tradicional ou às da população geral. Deve ser indicado diagnóstico pré-natal para gestações de mulheres com mais de 37 anos e/ou de homens com anomalias seminais.

GENES QUE CONTROLAM A DISJUNÇÃO CROMOSSÔMICA

A meiose é um processo fundamental na reprodução sexual, pois permite a troca entre os genomas materno e paterno

mediada por pareamento e recombinação dos homólogos. A conexão dos homólogos se dá por meio de uma estrutura que se forma ainda na prófase da primeira divisão, denominada Complexo Sinaptonêmico (CS). Poucos componentes estruturais do CS foram identificados até o presente, e exemplos são as proteínas Scp1, Scp2 e Scp3. Camundongos mutantes para Scp3 são inférteis devido à ausência de sinapse na prófase e de bloqueio da espermatogênese em zigóteno⁶⁶. As fêmeas Scp3^{-/-} possuem redução da fertilidade caracterizada por um menor número de indivíduos produzidos em cada ninhada; embriões de mães Scp3^{-/-} possuem maior incidência de aneuploidias⁶⁷.

Recentemente foi identificada uma outra proteína constituinte do CS, a Fkbp6, essencial para a fidelidade no pareamento dos homólogos e para a fertilidade sexo-específica⁶⁸. Machos mutantes Fkbp6^{-/-} possuem níveis hormonais normais, mas são estéreis, com testículos de tamanho reduzido, ausência de espermátides ou qualquer espermatozoídeo maduro nos túbulos seminíferos. As fêmeas mutantes são férteis, com ninhadas comparáveis às de animais normais. Segundo os autores, a espermatogênese frequentemente se mostra mais gravemente comprometida que a oogênese nos mutantes que exibem anormalidades meióticas, sugerindo diferenças sexo-específicas no controle da gametogênese⁶⁸.

Entre as proteínas implicadas na checagem do fuso meiótico e de migração cromossômica está a coesina, responsável pela coesão das cromátides irmãs⁶⁹ e pelo balanço das forças exercidas pelos microtúbulos sobre os cinetócoros⁷⁰. No início da anáfase a coesão das cromátides é desfeita por um mecanismo proteolítico que, se exercido prematuramente ou se a coesão for deficiente ou incompleta, resultará em separação prematura das cromátides, antes do alinhamento dos bivalentes ao fuso da primeira divisão meiótica. Outro mecanismo envolvido na não-disjunção é a degradação, com a idade, das proteínas associadas ao cinetócoro, envolvidas na checagem do aparato regulatório da ligação dos cromossomos ao fuso⁷¹. De fato, estudo da expressão de algumas dessas proteínas em oócitos humanos revelou uma correlação inversa entre quantidade de RNAm e a idade⁷², indicando uma redução na expressão gênica com a idade.

HOMENS 47,XXY

A síndrome de Klinefelter (47,XXY) afeta até 1 em 500 homens nos diferentes grupos étnicos, embora seja subdiagnosticada em função de seu quadro clínico variável. Nos homens inférteis está presente em 85% dos indivíduos azoospermicos e em cerca de 40% dos oligozoospermicos⁵⁴. Ao exame clínico, o traço principal é o *habitus eunucoides*, com ou sem aumento da estatura ou ginecomastia, e a elevação dos níveis séricos de gonadotrofinas, especialmente do hor-

mônio folículo-estimulante (FSH), refletindo uma falência testicular.

Abordagem e risco das ARTs para os homens 47,XXY

Existem diferentes opções de abordagem da infertilidade para homens com síndrome de Klinefelter. Em função das alterações normalmente graves dos parâmetros seminais, com concentração espermática geralmente inferior a 5×10^6 sptz/ml de ejaculado, as técnicas de reprodução assistida que são propostas para os Klinefelter são as de FIV com ICSI. Para os azoospermicos, mesmo aqueles com cariótipo 47,XXY puro, pode ser proposta exploração microcirúrgica do epidídimo (MESA) ou dos testículos (TESE), com a finalidade de obtenção de espermatozoides para ICSI, pois não é infrequente a presença deles. No entanto, deve ser considerada a questão da imaturidade desses espermatozoides obtidos por essas técnicas, especialmente no que diz respeito ao restabelecimento do *imprinting* de genes paternos, fundamental para o desenvolvimento embrionário, conforme será discutido mais adiante.

Quanto à presença de alterações cromossômicas nos espermatozoides dos homens com síndrome de Klinefelter, ela é semelhante à encontrada em homens com azoospermia⁷³. Mesmo homens com cariótipo 47,XXY puro em sangue periférico podem apresentar linhagens 46,XY, tanto nas células somáticas quanto pré-meióticas obtidas por biópsia testicular⁷⁴. Nos testículos em que linhagens normais são encontradas, usualmente também são encontrados espermatozoides nos túbulos, mas naqueles somente com linhagem 47,XXY não. Um traço marcante é o fato de as células em paquíteno serem sempre 46,XY, sugerindo que apenas as células 46,XY são capazes de entrar em meiose. No entanto, mesmo essas células normais resultam, nos homens com síndrome de Klinefelter, em um número estatisticamente superior (6,75% *versus* 1,5%) de espermatozoides com dissomias⁷⁴. Por este motivo, diagnóstico citogenético pré-natal por amostra de viló corial ou amniocentese deve ser sugerido para todas as gestações resultantes de ICSI em função de azoospermia não-obstrutiva, e para todos os homens com síndrome de Klinefelter^{54,75,76}.

MICRODELEÇÕES DO CROMOSSOMO Y

Em 1976 foi proposta a existência de genes importantes para a espermatogênese, localizados imediatamente acima da região heterocromática do braço longo do cromossomo Y (Yq), uma região denominada desde então região AZF (AZoospermic Factor). AZF estaria, segundo os autores, ausente nos homens azoospermicos⁷⁷.

Estudos subsequentes mostraram, no entanto, que a correlação genótipo/fenótipo não é tão linear, e centenas de trabalhos (Pieri *et al.*¹⁰) marcaram a busca dos genes que estariam presentes em AZF e que pudessem explicar a variabilidade dos parâmetros seminais encontrados nos homens inférteis. O trabalho que foi marco no estudo do cromossomo Y foi publicado em 1992 na *Science*⁷⁸ um mapa de deleção do cromossomo Y, com 43 intervalos e a sugestão de 182 pares de oligonucleotídeos iniciadores (*primers*) capazes de, utilizados em reação de PCR, identificar a presença ou a ausência das 182 regiões ao longo de todo o cromossomo Y (Fig. 28.7). O cromossomo Y, tido como uma *waste land*, onde apenas lixo genético havia sido acumulado ao longo da evolução⁷⁹, assume uma importância central na fertilidade masculina, e a pesquisa de microdeleções no braço longo do cromossomo Y (Ydelq) é incluída no protocolo básico de investigação do homem infértil no mundo, juntamente com o cariótipo convencional.

Quando se investiga uma população de homens inférteis, a frequência de alterações encontradas no cromossomo Y é inversamente proporcional à concentração de espermatozoides presentes no ejaculado. Cerca de 15% dos indivíduos azoospermicos e 5% dos oligozoospermicos possuem microdeleções em alguma das três regiões AZF (AZFa, AZFb e AZFc). Essa frequência mostra ser função apenas da gravidade do quadro clínico do paciente, e não do número de *primers* utilizados, que varia de 6 a 180, para rastrear as microdeleções ao longo de AZF.

A estrutura genômica do cromossomo Y explica, pelo menos em parte, o padrão regular de perda de segmentos eucromáticos em Yq, especialmente a estrutura genômica de AZFa⁸⁰ e AZFc⁸¹. AZFa apresenta várias seqüências HERVs (*human endogenous retroviral*) homólogas, o que facilita o pareamento e a recombinação intracromossômica e um padrão regular de perda eucromática entre essas seqüências. As seqüências HERVs são uma importante classe de repetições dispersas, que somam cerca de 1% de todo o genoma humano. Seu papel patogênico é promover o pareamento entre seqüências semelhantes, propiciando recombinações ilegítimas que podem resultar em inversões, translocações ou deleções, bem como influir na expressão dos genes adjacentes⁸².

O padrão regular de microdeleções presentes em AZFc sugere também ser o resultado de recombinação homóloga, mas entre amplicons⁸¹, ao invés de seqüências HERVs como em AZFa.

Com base nas informações moleculares sobre a estrutura genômica do cromossomo Y, a contribuição da primeira pesquisa brasileira¹⁰ foi a seleção de um conjunto de seis marcadores estrategicamente localizados entre seqüências de repetições específicas para compor um teste simples, rápido e barato, capaz de identificar 95% das microdeleções descritas na literatura. No Brasil, a pesquisa de microdeleções foi

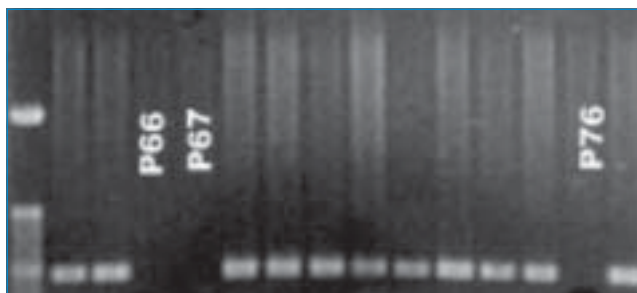


Fig. 28.7 — Resultado da amplificação do primer 143 com produto de 311pb, mapeado em AZFb, indicando microdeleção nos pacientes P66, P67 e P76, na primeira coluna do gel marcador de 100pb. Gel de agarose corado com brometo de etídeo.

padronizada por nosso grupo no início de 1998, com a finalidade de atender aos pacientes com fator masculino grave antes de serem submetidos a ICSI.

A PESQUISA DE MICRODELEÇÕES E AS ARTS

As microdeleções e deleções do cromossomo Y são, juntamente com as aberrações cromossômicas, as causas isoladas mais frequentes de oligozoospermia e azoospermia. Juntos, cariótipo e pesquisa de microdeleções conseguem fazer o diagnóstico de cerca de 25% dos casos de azoospermia e até 15% dos casos de oligozoospermia. No I Consenso Brasileiro de Infertilidade Masculina, as duas pesquisas integram o protocolo básico de investigação do homem infértil⁸³. Todo homem infértil deve realizar o cariótipo, a despeito da concentração de espermatozoides presentes no sêmen, e todo homem com menos de 5×10^6 sptz/ml deve realizar a pesquisa de microdeleções.

TRANSMISSÃO DAS MICRODELEÇÕES ATRAVÉS DAS ARTS

Homens portadores de microdeleções no cromossomo Y submetidos a ICSI transmitem o problema para 100% dos filhos homens, e casos como esse começam a se multiplicar na literatura^{84,85,86,87,88}. No entanto, o adequado aconselhamento genético de portadores de microdeleções pode resultar em opções alternativas como a utilização de sêmen de doador ou até mesmo a suspensão da abordagem com reprodução assistida e adoção^{10,89}. Outra opção é a realização de DGPI com transferência apenas de pré-embriões do sexo feminino.

VARICOCELE, MICRODELEÇÕES E GENES ASSOCIADOS

Uma questão envolvida na infertilidade masculina é a atribuição de valor a achados clínicos. A varicocele é, dentre

os achados clínicos, o mais controvertido, uma vez que pode estar presente em sua forma grave até mesmo em indivíduos com fertilidade normal. Na verdade, a varicocele está presente em aproximadamente 15% da população masculina, incluindo adolescentes e adultos⁹⁰, e não apresenta uma preponderância racial⁹¹.

O diagnóstico de varicocele é usualmente realizado no exame físico (com o paciente em pé) pela palpação do cordão espermático antes e durante a manobra de Valsalva. Essas lesões vasculares foram divididas em três graus, baseados nos achados clínicos: varicoceles grau III são visíveis, as grau II são palpáveis e as grau I são palpáveis somente durante a manobra de Valsalva; varicoceles detectadas apenas com a utilização de ultra-som são denominadas subclínicas.

VARICOCELE E INFERTILIDADE

Desde os primórdios da era cristã existem relatos que indicam a associação entre varicocele e redução do volume testicular ipsilateral dos homens afetados⁹². A redução do volume testicular normalmente é indicativa de comprometimento da espermatogênese. De fato, indivíduos com varicocele têm diminuição na concentração e motilidade dos espermatozoides, bem como aumento relativo de espermatozoides com formas anômalas.

A varicocele é o principal achado clínico nos homens avaliados em clínicas de infertilidade, com prevalência entre 30 e 40%, duas a três vezes maior que a da população geral. Nos casos de infertilidade primária sua prevalência é de até 40%, e de até 85% nos casos de infertilidade secundária⁹³. A diferença nas prevalências de varicocele entre grupos de homens com infertilidades primária e secundária sugere que a infertilidade decorrente da varicocele seja de fato um dano adquirido e aparentemente progressivo^{92,94}, e que devam existir fatores genéticos de predisposição à infertilidade associada à varicocele.

VARICOCELE E MICRODELEÇÃO DO Y

Inúmeros casos de microdeleção do cromossomo Y também foram descritos em associação a quadros progressivos de deterioração dos parâmetros seminais^{10,95,96,97}. Dessa forma, na presença de varicocele, associada ou não a parâmetros seminais pobres, deve ser solicitada pesquisa de microdeleções do cromossomo Y, uma vez que podem, varicocele e microdeleção, ter um efeito aditivo, acelerando a deterioração do parênquima testicular. A presença de microdeleções em indivíduos portadores de varicocele deve ser fator de decisão por opção cirúrgica de correção da varicocele.

VARICOCELE E PROTEÍNAS DE PROTEÇÃO AO ESTRESSE TÉRMICO

O exato mecanismo pelo qual a varicocele se torna patológica, passando a interferir no adequado funcionamento testicular, ainda não foi elucidado. O parâmetro seminal que mais se apresenta alterado nos indivíduos com varicocele é a morfologia dos espermatozoides, com aumento do número de espermatozoides imaturos no ejaculado, caracterizados especialmente pela retenção citoplasmática⁹⁸.

Estudos com imuno-histoquímica demonstraram que o sêmen de pacientes com varicocele possui uma atividade elevada da creatina kinase (CK), correlacionável aos índices de retenção citoplasmática^{98,99}. A expressão da CK é regulada pelo desenvolvimento, e sua isoforma testículo-específica, a CK-M, descrita em 1990, tem expressão concomitante à extrusão citoplasmática¹⁰⁰. Enquanto nos sêmens normais a isoforma CK-M é prevalente, sêmens com aumento de isoformas imaturas (com excesso de citoplasma) possuem predominantemente a isoforma CK-B.

Recentemente a isoforma CK-M seminal foi identificada como sendo uma proteína de proteção ao estresse térmico (HSP — *heat shock protein*), isoforma HSPA2, ortóloga à Hsp70-2 dos camundongos¹⁰¹. Nocaute do gene Hsp70-2 no camundongo resulta em bloqueio da maturação dos espermatozoides na meiose I, com posterior apoptose e infertilidade¹⁰² por ausência de células pós-meióticas e espermatozoides¹⁰³. A Hsp70-2 murina foi identificada como componente do elemento lateral do complexo sinaptonêmico na meiose masculina, não tendo sido identificada no complexo sinaptonêmico de oócitos¹⁰⁴.

O fato de a CK-M seminal haver sido recentemente identificada como sendo a HSPA2 abre um novo caminho na investigação dos efeitos da varicocele na expressão gênica regulada pelo desenvolvimento. A isoforma CK-M seminal possui expressão significativamente reduzida tanto nos testículos com hipoespermatogênese quanto naqueles acompanhados de varicocele¹⁰⁵. Esse fato sugere a possibilidade do envolvimento de mutações em HSPA2 ou em outros genes de sua cascata regulatória na predisposição à infertilidade de alguns homens com varicocele.

VARICOCELE E PROTEÍNAS DE PROTEÇÃO CONTRA O ESTRESSE OXIDATIVO

Recentemente um polimorfismo na enzima glutationa S-transferase (GST) foi identificado em associação à deleção 4977bp-del no DNA mitocondrial (DNAMt) em homens com varicocele acompanhada de infertilidade¹⁰⁶. A família gênica à qual pertence a GST produz isoenzimas importantes no metabolismo de proteção contra o estresse oxidativo¹⁰⁷. A varicocele está associada a uma elevação dos níveis de espécies reativas de oxigênio (ROS) no sêmen, juntamente com

uma capacidade antioxidante reduzida (baixos níveis de tióis e ácido ascórbico)¹⁰⁶ favorecendo danos à membrana do espermatozóide, redução da capacidade de fertilização e elevação na frequência de perdas gestacionais precoces¹⁰⁸. A associação entre o polimorfismo na GST e 4977bp-del no DNA-mt em homens com varicocele e infertilidade sugere uma maior suscetibilidade desse genótipo a uma disfunção seminal.

FIBROSE CÍSTICA, AGENESIA DE DEFERENTE, INFERTILIDADE E ARTS

Inúmeras são as causas dos processos obstrutivos no elaborado sistema de dutos e canais que conduzem os espermatozoides até o meio externo, e a mais freqüente é a aplasia dos dutos deferentes, uma entidade que se apresenta com um fenótipo complexo, com variações clínicas muitas vezes sutis, mas cujo diagnóstico preciso é fundamental para orientação do casal acerca do risco de transmissão à prole.

A forma mais conhecida de processo obstrutivo é a aplasia congênita bilateral dos vasos deferentes, ou CBAVD, presente em 1 a 2% dos homens inférteis e em cerca de 20% dos casos de azoospermia. É um tipo de esterilidade masculina relacionado à fibrose cística (FC), tendo sido sugerido que alguns homens com CBAVD sejam portadores de uma forma branda de FC¹⁰⁹. De fato, 98% dos homens portadores de FC são inférteis por CBAVD, e mutações no gene são encontradas em até 70% dos casos de infertilidade por CBAVD¹¹⁰⁻¹¹². No entanto, os tipos de mutação encontrados nos homens inférteis com CBAVD são diferentes das mutações encontradas nos afetados por FC¹¹².

A FC é uma doença genética de herança autossômica recessiva. Sua incidência varia entre os diferentes grupos étnicos, sendo mais freqüente em Caucásios. O gene responsável pela FC foi mapeado no cromossomo 7, precisamente na região q31.2-q31.3¹¹³ e possui 27 éxons que se estendem ao longo de 250 kb (quilo-bases). Seu produto é uma glicoproteína transmembrana de 1.480 aminoácidos denominada CFTR (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator) que funciona como um canal de cloro na região apical de células secretoras do sistema respiratório, no pâncreas e nas glândulas sudoríparas¹¹⁴. Mais de 1.000 mutações já foram descritas, alterando não só os éxons do gene como seus introns e sítios de *splicing* do RNA. A frequência da doença e a frequência de cada mutação variam nos diferentes grupos étnicos, e acredita-se que um de cada 25 indivíduos seja heterozigoto. A existência de um grande número de mutações diferentes, bem como a complexa interação do canal de cloro com outras estruturas celulares, inclusive com o citoesqueleto, explica a variabilidade fenotípica e dificulta o aconselhamento dessas famílias.

Foram descritas correlações entre CBAVD e a variante 5T, presente na região IVS8Tn no íntron 8 do gene CFTR. A

variante 5T está relacionada com a exclusão do exon 9 no momento do *splicing* do RNA e, conseqüentemente, com a geração de uma proteína com amputação dos aminoácidos correspondentes ao éxon 9. Nos pacientes com CBAVD a frequência dessa variante é 4-6 vezes maior do que a encontrada na população com FC¹¹⁵.

Nos pacientes com CBAVD existe uma relação entre genótipo e valores do íon cloreto no suor¹¹⁶. Pacientes heterozigotos compostos têm dosagem do íon alterada, enquanto dosagens normais ou limitofes são encontradas tanto em pacientes heterozigotos, com um dos alelos normal, quanto nos pacientes heterozigotos para uma mutação associada à variante 5T¹¹⁶. O teste de suor auxilia a orientação de pacientes com CBAVD, bem como a pesquisa de mutações no gene.

AGENESIA UNILATERAL DO DEFERENTE

Uma situação bem mais complexa se apresenta quando a agenesia de deferentes é unilateral ou está associada a anomalias renais (agenesia, ectopia ou hipoplasia). Nesses casos, acredita-se que as chances de estarem associadas mutações em CFTR são baixas, pois se trata de uma outra patologia, com etiologia diferente¹¹⁰. No entanto, estudos com pesquisa de mutações no gene completo de indivíduos com agenesia unilateral de deferente (ou epidídimo), associada ou não a anomalias renais, ainda não foram realizados. Outros tipos de mutação ou uma associação de múltiplos polimorfismos com efeitos aditivos podem estar envolvidos na etiologia dessa variante do problema (dados ainda não publicados por nosso grupo).

O DESAFIO DA PESQUISA DE MUTAÇÕES EM CFTR

O gene CFTR se coloca dentro da discussão do papel dos SNPs (*single nucleotide polymorphism*, substituições de um único nucleotídeo ao longo do gene) no genoma, e a questão é saber quais SNPs, ou variações na seqüência selvagem, são realmente críticos para o funcionamento do gene (entendido de forma ampla como o processamento de seu RNAm e a estrutura e função protéica).

SNPs são alterações nas bases A/T/C/G do DNA que podem ou não resultar em uma alteração correspondente de aminoácido na proteína. Estudos da etapa específica da expressão gênica associada ao processamento do pré-RNAm de CFTR identificaram várias alterações de nucleotídeos no éxon 12, capazes de induzir graus variados de exclusão do éxon 12, levando à redução nos níveis normais do transcrito e da proteína normal. Essas substituições silenciosas estariam envolvidas em um fenômeno de interferência em novos elementos regulatórios denominados CERES (*composite exonic regulatory element of splicing* — elementos exônicos com-

postos para regulação do processamento)¹¹⁷. O efeito de uma única substituição de nucleotídeo nesses CERES não pode ser previsto, e o reconhecimento e a caracterização de alterações de *splicing*, causados pela variação exônica nos CERES, “deve representar um mecanismo freqüente de causação de doenças, bem como deve estar relacionado à variabilidade fenotípica da FC”¹¹⁷. Dessa forma, até a mais benigna alteração da seqüência de bases no DNA não pode ser ignorada, uma vez que pode estar associada à alteração no processamento do RNAm.

PESQUISA DE MUTAÇÕES EM CFTR E AS ARTS

Se o objetivo for a identificação de mutações e polimorfismos envolvidos nas alterações dos homens inférteis associadas ao sistema genitourinário e à CFTR, devemos nos propor ao estudo completo da seqüência do DNA de CFTR. O que tem sido proposto, no entanto, na investigação dos casais em que o homem é afetado por alterações nos deferentes/epidídimos/rins é a pesquisa apenas das mutações mais freqüentes no gene. O Brasil é caracterizado por possuir uma população multirracial, o que, de saída, dificulta a construção de um painel de mutações mais comuns em nossa população. A mutação DeltaF508, a mais comum do gene CFTR encontrada na Europa, não é a mais comum no Brasil. Na Europa sua freqüência varia de 51% na Grécia e Itália a 88% na Dinamarca¹¹⁸. Na população caucasóide brasileira a mesma mutação possui em média uma freqüência de 47%, com grande variação interestadual de 27 a 53%¹¹⁹. Existe também a proposição de estudar as mutações mais freqüentes na mulher e, caso não seja encontrada mutação, o casal fica liberado para ser submetido a reprodução assistida.

Do ponto de vista puramente econômico esta talvez seja uma opção, pois o estudo completo do gene é demorado e caro, e caso seja encontrada mutação no homem será necessária a pesquisa também na mulher, uma vez que a FC é uma patologia autossômica recessiva. No entanto, estudar a mulher não traz benefício algum ao paciente que é o portador da alteração que se deseja estudar. O homem fica sem diagnóstico e, o mais grave, com o estudo das mutações mais freqüentes no gene da esposa é dado ao casal uma falsa tranquilidade e a idéia de que o risco de transmissão da FC está afastado.

ESTRATÉGIA DE ABORDAGEM DIAGNÓSTICA PRÉVIA ÀS ARTS

O seqüenciamento do gene todo é, de fato, pouco exequível. Uma opção intermediária é a realização de técnicas de rastreamento, como o SSCP (*single strand conformational polymorphism* — polimorfismo de conformação do DNA de simples fita), em que são amplificados por PCR todos os éxons de CFTR e demais regiões intrônicas em que já foram descritas mutações. Esses fragmentos são então submetidos a

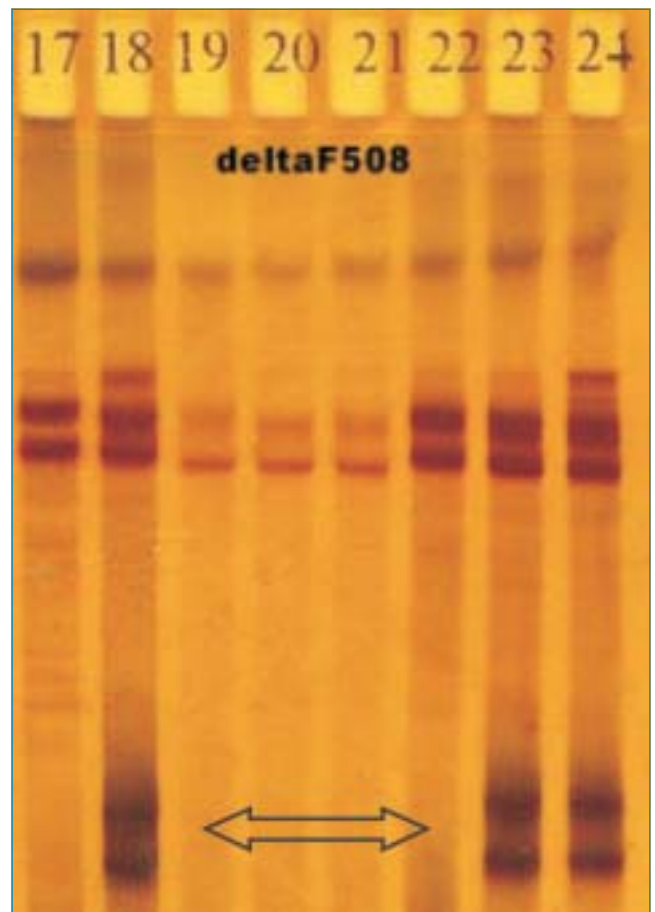


Fig. 28.8 — Análise por SSCP do produto de amplificação por PCR do éxon 10 do gene CFTR de homens portadores de azoospermia obstrutiva. Nas linhas 18, 23 e 24 a seta indica padrão alterado de migração nos heterozigotos para a mutação deltaF508.

eletroforese em gel de poliacrilamida, após serem denaturados pelo calor (Fig. 28.8). A vantagem desse método somente se dá se o laboratório que o realizar tiver padronizado os padrões de migração normais em SSCP de todos os éxons e fragmentos de PCR do gene, de preferência em duas temperaturas diferentes, para que sejam minimizadas as falhas de detecção de mutações em SSCP, que estão em torno de 15%. O seqüenciamento propriamente seria realizado somente nos fragmentos com padrão alterado de migração. Para os casais em que ambos são heterozigotos, a FIV com DGPI deverá ser indicada e o diagnóstico pré-natal no primeiro trimestre deverá fazer a confirmação do resultado obtido no DGPI.

IDADE MATERNA, DISSOMIA UNIPARENTAL, ICSI E IMPRINTING GENÔMICO

A idade materna avançada é um fator de risco para alterações cromossômicas na prole, e o diagnóstico citogenético

(cariótipo) fetal por amostra de vilos coriais e/ou amniocentese deve ser indicado nas gestações de mulheres com mais de 35 anos. Um dos subprodutos científicos importantes da amostra de vilos coriais foi demonstrado em 1992, quando um resultado desse exame identificou trissomia do cromossomo 15, que não foi confirmada em amniocentese realizada na mesma gestação algumas semanas depois. Ao nascimento, a criança foi diagnosticada como portadora de síndrome de Prader-Willi^{120,121}. A explicação: um oócito com dois cromossomos 15, resultado de não-disjunção, foi fertilizado por espermatozóide normal, dando origem à condição letal de trissomia do cromossomo 15 no zigoto; essa condição letal foi evitada pelas células do embrião em desenvolvimento, por seleção para retenção no embrião, de apenas dois dos três cromossomos 15, num mecanismo denominado correção da trissomia. Ao acaso, os dois cromossomos 15 “retidos” no embrião eram de origem materna, conforme revelaram os estudos moleculares realizados na criança. A síndrome de Prader-Willi foi dada como resultado de uma dissomia uniparental materna do cromossomo 15¹²⁰.

DISSOMIA UNIPARENTAL E IMPRINTING

Na dissomia uniparental, a despeito de os genes presentes no cromossomo estarem em dupla dose são representados por apenas um alelo. A dissomia uniparental é uma expressão monoalélica patológica, pois nos mamíferos, que são diplóides para todos os genes autossômicos, a maioria dos genes expressa ambos os alelos parentais (expressão bialélica), mas existe um grupo de genes que expressa somente um dos alelos. A expressão de apenas um alelo não é aleatória, pois depende da origem parental do alelo, isto é, depende do fato de o alelo haver sido herdado da mãe ou do pai. Assim, os genomas parentais não são equivalentes no que diz respeito à informação fornecida para o embrião. Os genomas parentais devem, de alguma forma, marcar uma determinada informação genética, isto é, promover modificações epigenéticas de forma que sua origem parental possa ser identificada. Essa marca, que confere uma espécie de ‘memória’ parental, é denominada *imprinting*, modificação epigenética ou simplesmente epigenética.

O *imprinting* envolve uma variedade de mecanismos que visam ao silenciamento preferencial de um gene. Existem evidências de que tenha evoluído como um mecanismo de defesa do hospedeiro contra a invasão de vírus e outros genomas parasitários capazes de se inserir no DNA hospedeiro e controlar a expressão desse DNA¹²². A capacidade de silenciar (metilar) esse DNA ‘estrangeiro’, de modo a não permitir sua expressão ou sua interferência na expressão dos genes adjacentes à sua inserção, foi fundamental para a sobrevivência das espécies. Hoje se sabe que a epigenética é um pré-requisito absoluto para o desenvolvimento fetal normal nos mamíferos, o que torna essencial a compreensão do processo

e em que momento do desenvolvimento dos gametas ele se dá, uma vez que nas ARTs tem sido proposta para as azoospermias a utilização de espermatozóides testiculares e até mesmo células imaturas amadurecidas *in vitro*.

A metilação como mecanismo de silenciamento

Dos mecanismos de silenciamento gênico, a metilação é o principal. A modificação de um alelo está intimamente associada à metilação de citidinas localizadas em seqüências de repetição CG, comumente referidas como ilhas CpG e localizadas fora da região codificadora dos genes. Essa metilação é apagada nas células germinativas primordiais durante a embriogênese, sendo restabelecida e transmitida aos gametas maduros, que a passam aos embriões. No entanto, ao mesmo tempo que os gametas são altamente diferenciados, eles devem conservar a informação genética de modo que ela seja capaz de direcionar o desenvolvimento de todas as linhagens celulares no novo indivíduo. Em outras palavras, a modificação epigenética das células germinativas e dos gametas tem que ser reversível, na medida em que deve poder resgatar a totipotência genética, e progressiva, na medida em que durante o desenvolvimento possa se dar de forma diferente nos diferentes tecidos, permitindo a expressão de genes específicos e silenciando outros.

Genes que promovem a metilação

As modificações ocorridas na cromatina por metilação, fosforilação ou acetilação são realizadas por enzimas altamente especializadas. No que diz respeito ao *imprinting*, ele é realizado principalmente por metilação, e as principais enzimas envolvidas são as metiltransferases de citosina, as Dnmt1, Dnmt3a e a Dnmt3b.¹²³ Camundongos em que o gene Dnmt1 foi nocauteado têm uma perda global da metilação e expressão bialélica de vários genes em tecidos somáticos. Os membros da família Dnmt3 são essenciais para a metilação de novo dos genes nas células-tronco e nas células do embrião durante a fase inicial pós-implantação.¹²⁴ Nocaute de Dnmt3L promove falência total de metilação em fêmeas, que são férteis mas somente capazes de produzir gestações que evoluem com óbito intra-uterino de embriões pequenos para a idade gestacional e portadores de erros de fechamento do tubo neural. A letalidade foi atribuída ao pouco desenvolvimento da placenta. Os machos se apresentaram com infertilidade em função de uma redução significativa do número de espermatogônias, falha na adequada diferenciação das espermatogônias em espermátócitos e os testículos do animal adulto com acentuada redução no volume. O envolvimento de Dnmt3L na meiose ainda carece de investigação¹²⁵.

Dnmt3L possui um homólogo humano, DNMT3-like, com 60% de homologia com o gene do camundongo. O quadro clínico apresentado pelos animais com mutações inativa-

doras nessas metiltransferases e em sua reguladora, a proteína Dnmt3L, é bastante semelhante ao quadro clínico apresentado por casais inférteis submetidos as ARTs. Por algum motivo que ainda se desconhece, as taxas de implantação são bastante superiores às de ‘bebê em casa’, uma vez que muitas gestações evoluem para aborto espontâneo no período imediatamente pós-implantação. Mais do que isso, quanto mais imaturo é o gameta masculino utilizado na ICSI, maiores as frequências de perdas gestacionais. Estudos que investiguem tanto mutações no homólogo humano do gene quanto o grau de metilação dos anexos embrionários e do embrião nas perdas gestacionais desses casais (e dos casais com aborto de repetição) podem vir a esclarecer o envolvimento da epigenética nesses casos. O aumento da frequência de erros de fechamento do tubo neural em crianças nascidas de mulheres submetida a FIV clássica também pode estar envolvendo erros de *imprinting* no oócito¹²⁶.

Doenças causadas por falhas epigenéticas

A dissomia uniparental auxiliou muito a compreensão da modificação epigenética, uma vez que se os dois cromossomos, e conseqüentemente os dois alelos, são da mesma origem parental, por exemplo, paterna, significa que o descendente não possui o outro alelo, o materno. É como uma simulação de *imprinting*, com silenciamento de um dos alelos. Os exemplos clássicos de doenças associadas a regiões cromossômicas submetidas a *imprinting* são os da síndrome de Prader-Willi, de Angelman, de Beckwith-Wiedemann e de Russel Silver.

Tanto a síndrome de Prader-Willi quanto a de Angelman (Glenn *et al.*¹²⁷) são mais comumente causadas por deleção de um mesmo segmento do braço longo do cromossomo 15, a região 15q11-13, mas de origem parental diferente, resultando em fenótipos diferentes. A síndrome de Prader-Willi é caracterizada por hipotonia, hiperfagia, obesidade, hipogonadismo, retardo mental leve, mãos e pés pequenos e distúrbios de comportamento. Em cerca de 50-60% dos casos de síndrome de Prader-Willi os afetados apresentam uma deleção paterna de 15q11-13; em 30% dos casos os afetados possuem os dois ‘alelos’ de origem materna (dissomia uniparental materna). Os pacientes com síndrome de Angelman apresentam ataxia, retardo mental grave, distúrbios graves de fala, convulsões, pouco tecido subcutâneo e uma característica alegria. Na síndrome de Angelman a deleção de 15q11-13 é de origem materna, e os ‘alelos’ que se expressam são os paternos. Em cerca de 5-20% dos casos de síndrome de Angelman e de Prader-Willi, no entanto, estão presentes tanto o alelo paterno quanto o materno. Nesses casos, o que se observou foi uma disrupção do padrão de metilação, sugerindo uma disrupção do processo de *imprinting* em todo o segmento 15q11-13, que se estende por cerca de 200 kb. Quando as modificações epigenéticas ocorrem no alelo paterno, as do-

enças decorrentes da perda do *imprinting* são caracterizadas por aumento do crescimento, como na síndrome de Prader-Willi e na de Beckwith-Wiedemann (mapeada na região 11p15.5), enquanto na situação oposta as afecções se caracterizam por retardo de crescimento, como na síndrome de Angelman e na síndrome de Russel Silver, que se apresenta com retardo de crescimento já na vida intra-uterina, baixa estatura e nanismo pós-natal.

Outra síndrome bem estudada que também manifesta efeitos epigenéticos é a síndrome de Beckwith-Wiedemann, com supercrescimento generalizado caracterizado por gigantismo, macroglossia, visceromegalia, outras anomalias do desenvolvimento¹²⁸ e predisposição a tumores de origem embrionária, como tumor de Wilms, rabdomiossarcoma e hepatoblastoma¹²⁹.

ICSI E DOENÇAS CAUSADAS POR FALHAS EPIGENÉTICAS

Recentemente foram publicadas associações entre reprodução assistida, especificamente ICSI, e síndrome de Angelman¹³⁰ e de Beckwith-Wiedemann¹³¹. Num dos estudos, a associação entre a síndrome de Beckwith-Wiedemann e a reprodução assistida foi indicada por um aumento estatisticamente significativo (de 0,8% para 4,6%) na frequência de afetados pela síndrome na prole dos casais submetidos a ICSI¹³¹. No outro estudo, pesquisa do padrão de metilação no gene SNRPN, envolvido na etiologia da síndrome de Angelman, identificou defeitos epigenéticos nos dois casos da síndrome nascidos de ICSI; no entanto, entre os pacientes portadores da síndrome de Angelman nascidos da população geral apenas 5% apresentam defeitos epigenéticos, evidenciando uma super-representação de falhas de *imprinting* entre as crianças nascidas de ICSI¹³⁰.

Conforme mostrado por El-Maarri *et al.*¹³², a metilação materna do cromossomo 15 não é estabelecida antes da ovulação e sim na ovulação, ou depois dela. A ICSI pula muitas das etapas normais envolvidas na fertilização e na ativação do oócito, além de colocar em contato as enzimas acrossômicas e o citoplasma oocitário. Os efeitos e danos às estruturas e mecanismos intracelulares ainda são bastante desconhecidos, mas em determinadas condições *in vitro* pré-embriões de ovelhas manifestam supercrescimento¹³³. Isso indica que, pré-embriões são vulneráveis a fatores externos, tanto que apesar de na ICSI o espermatozóide ser colocado dentro do óvulo entre 20 e 30% das vezes não ocorre a formação dos pró-núcleos e singamia, e menos de 50% dos casos resultam em gestação.

A dissomia uniparental, ou perda da modificação epigenética normal de um gene, está associada não só a doenças, mas também a distúrbios do comportamento, pelo menos em camundongos¹³⁴, e ao câncer. Alterações no padrão de metilação têm se mostrado as alterações moleculares mais consis-

tentemente associadas aos neoplasmas múltiplos¹³⁵, como os presentes na síndrome de Beckwith-Wiedemann. Talvez a perda de *imprinting* em genes que promovam o controle do crescimento e em genes supressores de tumor seja a associação entre epigenética e câncer, e talvez seja por essa inversão que esteja também pelo menos uma das explicações para a associação entre câncer e infertilidade.

Modificações epigenéticas no epidídimo

O epidídimo é o órgão responsável pela maturação do espermatozóide, incluindo a aquisição de motilidade e capacidade de fertilização, ambas ausentes nos espermatozoides testiculares. Hoje se sabe que as modificações adquiridas pelo espermatozóide ao longo de seu trajeto pelo epidídimo não ocorrem somente na superfície ou nos compartimentos não-nucleares do gameta masculino. Existem evidências de genes que sofrem demetilação no início da espermatogênese, ainda na fase de pró-espermatogônia, e são remetiladas ao longo de seu trajeto pelo epidídimo¹³⁶. A demetilação de um gene envolve a modificação de sua estrutura cromatínica de modo a permitir o acesso de fatores de transcrição à região promotora do gene. A remetilação de alguns genes, como o Pcg-2, ApoA1 e Oct-3/4, não está associada nem depende da replicação do DNA, uma vez que ocorre em uma etapa pós-meiótica, durante a passagem do gameta pelo epidídimo.

A forma pela qual uma metilase tem acesso a uma sequência específica de DNA altamente compactado como o dos espermatozoides, de modo a silenciar um gene, ainda não é um mecanismo totalmente conhecido. De qualquer forma, a existência de um só evento que represente metilação especificamente adquirida no epidídimo é um aspecto importante para a reprodução assistida, uma vez que punções testiculares visando à recuperação de espermatozoides para utilização em ICSI têm sido realizadas, gestações têm sido obtidas e crianças têm nascido. O impacto disso no desenvolvimento a longo prazo das crianças nascidas dessas técnicas, que deveria ter sido estudado em modelos animais antes de sua utilização em humanos, ainda é uma incógnita e fonte de preocupação. Argumentos como: a) a metilação dos gametas é apagada no embrião de 8-16 células¹³⁷ e, portanto, tudo que foi feito durante a gametogênese é retomado, do zero, nessa fase do desenvolvimento e b) as crianças nascidas de ICSI com utilização de espermatozoides testiculares não têm, aparentemente, uma afecção grave ao nascimento, são argumentos que não eliminam a possibilidade de problemas derivados de falhas epigenéticas virem a se desenvolver com maior frequência na prole de homens submetidos a aspiração de espermatozoides testiculares, como distúrbios de comportamento ou até mesmo câncer. Evidências indiretas existem para que se possa concluir que a remetilação do embrião de 8-16 células ocorra em regiões pré-marcadas durante a maturação dos gametas, principalmente dos espermatozoides, que possuem

um genoma muito mais metilado que os oócitos. Essa pré-marcação é apagada durante a meiose mas retomada, não a partir do zero, no embrião de 8-16 células.

Dessa forma, devem ser indicados procedimentos terapêuticos que visem à restauração da presença de espermatozoides no ejaculado, como a reversão da vasectomia ou até a mais controversa varicocelectomia nos homens com azoospermia.

ICSI E UTILIZAÇÃO DE CÉLULAS IMATURAS

As ARTs também já se utilizaram de células ainda mais imaturas, como as espermátides, para realização de fertilização *in vitro*. A ELSI¹³⁸ (*ELongated Spermatic Injection*) e a ROSI¹³⁹ (*Round Spermatic Injection*), realizadas em função de infertilidade masculina grave com parada de maturação, já possuem resultado positivo, com uma criança supostamente nascida não comprovada, no entanto, pela comunidade científica.

Em 1994 foi referido o primeiro nascimento em *Mus musculus* resultado de ROSI¹⁴⁰. Na conclusão, um tanto prematura, “núcleos de espermátides redondas, como os de espermatozoides maduros, possuem potencial reprodutivo e, mais do que isso, todos ou quase todos os eventos pós-meióticos (espermio gênese, maturação no epidídimo, capacitação e reação acrossômica) talvez tenham evoluído somente para assegurar a ‘entrega’ de um núcleo masculino haplóide e capaz, dentro dos oócitos.” Nove anos depois ainda não se sabe acerca dos reais efeitos da utilização de células imaturas no desenvolvimento e na saúde da prole nascida das ARTs. Mais do que isso, na questão reprodutiva, estudos em mamíferos como camundongos devem ‘nortear’ as pesquisas e o desenvolvimento técnico, mas conclusões acerca da regulação ‘micrométrica’ da função gênica talvez não devam e nem possam ser extrapoladas do camundongo para o ser humano.

FIV E POLARIDADE OOCITÁRIA

A polaridade oocitária é um gradiente de concentração dos componentes citoplasmáticos e nucleares, de tal forma que atuam regulando a expressão de genes e a tradução de RNAm. A polaridade oocitária é bem documentada nos oócitos de anfíbios, que põem seus ovos em águas tranquilas para que não sejam revolvidos, uma vez que sua inversão resulta em perda de sua capacidade de fertilização. Talvez a polaridade esteja envolvida nos programas de FIV, com a diferença de 50% entre o número de oócitos obtidos na aspiração dos folículos e o número de embriões adequados para transferência intra-uterina.

Revisões recentes^{141,142} sobre a polaridade oocitária sugerem que nos mamíferos a questão da ausência de polaridade ainda está longe de ser resolvida. Existem indicações de

distribuição espacial de determinados produtos gênicos no citoplasma do oócito e no embrião precoce, como o fator de transcrição OCT-4, expresso somente na massa celular interna no estágio de blastocisto de camundongos¹⁴³. Mais recentemente, foi demonstrada a expressão diferencial de duas proteínas regulatórias, a leptina e a STAT, em oócitos humanos e nas células do pré-embrião. Foi sugerido que essa polaridade deve influenciar a determinação do destino a ser dado às células do embrião humano¹⁴⁴, uma vez que polaridade semelhante da leptina foi verificada em oócito de *Xenopus*.

Mecanismos de controle molecular estão começando a ser desvendados com a transferência de núcleo para clonagem, e a importância do citoplasma na manutenção e na regulação do estágio da meiose no núcleo começa a ser compreendida. O citoplasma é capaz de receber um núcleo diplóide, reprogramá-lo e, a partir desse ponto, se comportar como um zigoto¹⁴⁵. Maiores evidências do efeito do citoplasma sobre o núcleo vieram com a demonstração de sua capacidade de controlar a transcrição de genes específicos tanto quantitativa quanto qualitativamente,¹⁴⁶ Com base nesses conhecimentos, foi desenvolvida uma polêmica técnica em reprodução assistida, a do transplante de citoplasma¹⁴⁷, atualmente proibida nos Estados Unidos¹⁴⁸.

TRANSPLANTE DE CITOPLASMA E HERANÇA MITOCONDRIAL

O transplante de citoplasma é uma técnica concebida para contornar um dos maiores problemas da fertilidade, que é o problema do envelhecimento. Oócitos de má qualidade acabam por gerar pré-embriões com aneuploidias complexas e degeneram no útero, logo após a implantação, ou a caminho dele, ainda nas trompas. Um dos mecanismos relacionados ao aumento de aneuploidias está associado ao maquinário celular de produção de energia, comprometido pelo envelhecimento. Com o transplante do citoplasma de oócitos de boa qualidade para oócitos de pacientes com falhas recorrentes de fertilização ou implantação, componentes saudáveis restauram o crescimento normal e a viabilidade.

A transferência de pequenas quantidades de citoplasma do doador (5-15%) inclui RNAm, proteínas e principalmente mitocôndrias. A mistura de duas fontes maternas diferentes de citoplasma acarreta a heteroplasmia de DNA mitocondrial (DNAm) na prole, levando à formação de indivíduos com três pais genéticos: dois de DNA nuclear e uma terceira fonte representada pelo DNAm da doadora.

Até a presente data, mais de 20 bebês nasceram com a utilização da técnica desenvolvida pelo grupo de Cohen *et al.*¹⁴⁷ e que foi proibida em 2001 pela agência americana de regulamentação FDA (Food and Drug Administration). Segundo a FDA, o procedimento é uma forma de terapia gênica, e seu uso deve ser proibido enquanto a técnica é revista.

O genoma mitocondrial dos mamíferos é uma molécula de DNA dupla fita, transmitida exclusivamente pela linhagem materna. O DNAm não é protegido por histonas, o que o torna particularmente sensível ao ataque das espécies reativas de oxigênio produzidas na cadeia respiratória da parede mitocondrial, onde o DNAm está ancorado. Isso confere uma alta taxa de mutação ao DNAm, que rapidamente se acumula na população. No entanto, por um mecanismo ainda não elucidado, nas células germinativas ocorre um processo de seleção que leva à perda de determinadas mutações, o que compensa a alta taxa de mutações novas¹⁴⁹.

Mutações no DNAm e heteroplasmia (presença de duas ou mais moléculas de DNAm na mesma célula) estão correlacionadas a várias doenças¹⁵⁰. Uma alta porcentagem de DNAm mutante em células somáticas está correlacionada à severidade de algumas doenças neuromusculares, e a mudança no nível de heteroplasmia está associada a um maior espectro de fenótipos clínicos.

A compreensão desse processo tem implicações no manejo clínico e no aconselhamento genético dos pacientes com doenças mitocondriais. Modelos animais foram construídos para estudar os mecanismos de transmissão da heteroplasmia do DNAm e seu potencial na determinação de doenças. Com a transferência de citoplasma, a heteroplasmia ocorre certamente nos nascidos¹⁵¹. Como o mecanismo associado à seleção das linhagens mitocondriais durante a formação do embrião ainda não está elucidado, não pode ser garantido que haja uma eliminação da linhagem do DNAm da doadora e retenção do DNAm materno, ou vice-versa. Se o DNAm materno já se mostrava comprometido na produção energética do oócito, estaríamos favorecendo o nascimento de indivíduos com patologias de DNAm.

GAMETOGÊNESE IN VITRO

Os progressos nas ARTs incluem também um promissor campo de pesquisas em criopreservação (congelamento) de tecido reprodutivo (ovários e testículos), especialmente para aqueles casos de indivíduos com câncer precoce, cuja abordagem terapêutica irá causar danos irreversíveis às células germinativas.

Existe na literatura um número considerável de relatos sobre transplante de espermatogônias em modelos animais com gestação e descendentes¹⁵². No entanto, procedimentos eficientes para a realização *in vitro* de todas as etapas da espermatogênese (proliferação mitótica das gônias, meiose e espermiogênese) ainda não estão disponíveis.

Recentemente, experimentos, *in vitro* com células testiculares de touros sugeriram que, após seu cultivo por um período de 10 semanas, as células entraram em meiose, evidenciada pela expressão de genes espermatide-específicos, como o das protaminas e das proteínas de transição¹⁵³.

As espermátides que supostamente se formaram *in vitro* foram utilizadas para ROSI, e 50% dos blastocistos que se formaram eram diplóides¹⁵³.

Enquanto experimentos em machos parecem promissores, as pesquisas com tecido ovariano e maturação completa *in vitro* de oócitos ainda são uma falsa promessa. Muitos outros experimentos devem ainda ser realizados antes de sua utilização em seres humanos, e a contenção da demanda por procedimentos experimentais deve ser duramente praticada pelos profissionais envolvidos com as ARTs.

O RISCO DAS ARTS

Os riscos envolvidos com a utilização das ARTs foram discutidos ao longo dos itens que foram apresentados, sempre pautados por evidências ou por correspondência com modelos animais. O que precisa ser discutido sobre os riscos das ARTs não é o fato de as técnicas em si causarem problemas à prole, e sim o fato de elas propiciarem a transmissão de genomas que não foram capazes de ser transmitidos pelas formas naturais. Quando se tem na frente um casal infértil em que ambos apresentam problemas renais, como nefrites, pielonefrites e proteinúria, para um geneticista a situação é completamente incômoda, pois embora não se possa afirmar que esse casal tenha um risco X ou Y, a história clínica de ambos sugere anomalias urológicas que podem, de alguma forma, ser transmitidas. Então procede-se à ICSI e nasce uma criança com hipoplasia renal, ou hipospádia? Qual a causa dessa hipoplasia, dessa hipospádia? É uma criança nascida de ICSI, possui uma malformação e onde se encaixa?

Nesse sentido o casal infértil está desassistido. Não é explicado ao casal o motivo da infertilidade e suas repercussões. E pode-se aqui falar também da vasectomia de homens de mais de 45 anos em segundas uniões. A literatura hoje está repleta de artigos associando idade paterna a síndromes outras que não a acondroplasia, sabidamente associada a mutações novas em função da idade paterna. Retinoblastoma, esquizofrenia, craniossinostose são algumas delas. Ainda não faz parte da prática clínica da reprodução assistida esclarecer o casal acerca desse tipo de risco. A discussão gira, no máximo, em torno da celeuma ICSI ou reversão da vasectomia, chances de sucesso da reversão em função do tempo de vasectomia, qual a melhor técnica cirúrgica para a reversão, mas o risco em função da idade paterna não é abordado.

Um dos argumentos tranquilizadores sobre as ARTs é o fato de centenas de bebês já haverem nascido com a saúde dentro dos limites de normalidade física e psicológica estabelecidos durante décadas de levantamentos neonatais, e sem uma elevação na frequência de malformações maiores ou menores⁶⁴. A análise que o grupo Belga faz, no entanto, é conduzida de forma numericamente incorreta, pois se propõe a analisar os problemas das crianças até dois anos, mas fazem

uma análise da situação atual (o que muda o número de afetados projetado no tempo), não considera as anomalias detectadas no diagnóstico pré-natal em gestações não-interrompidas nem projeta números para as gestações que não foram submetidas a diagnóstico pré-natal. Fornece uma frequência de 2,9% quando, corrigida, sobe para 4,8%, sem entrar no mérito do tipo de malformação ou no critério de classificação de uma malformação maior ou menor.

Existem estudos e metanálises que mostram uma maior incidência de malformações maiores e menores em crianças nascidas por FIV tradicional e ICSI^{64,126,154}, bem como uma maior incidência de baixo peso ao nascimento¹⁵⁵ e menor índice de desenvolvimento mental^{156,157} em crianças nascidas de ICSI. Essas análises, realizadas por profissionais envolvidos na questão da medicina reprodutiva, foram devidamente corrigidas para fatores de risco como idade materna e prematuridade, uma vez que a prematuridade, que é função também de gestação múltipla, está associada a um número maior de malformações, como a criptorquidia e a persistência do duto arterial¹²⁶, por exemplo. Mas a hipospádia, que não parece estar associada a essas variáveis, apresenta nas crianças nascidas de ICSI frequência duas vezes maior que nas nascidas de FIV clássica e quase quatro vezes maior que a da população devida pareada¹²⁶.

Também é maior a incidência de aberrações cromossômicas, principalmente de cromossomos sexuais⁶⁵, em crianças nascidas de ICSI, quando comparadas às nascidas de FIV ou às da população geral. A maior casuística com seguimento das crianças nascidas de ICSI⁶⁴ apresenta como resultado uma elevação de 5,5 vezes na ocorrência de aneuploidias de novo, se considerarmos que a idade média das mulheres foi de 32 anos. Esse aumento se dá em partes iguais para aneuploidias de autossomos e dos cromossomos sexuais. Na Bélgica, porém, as gestações resultantes de ICSI, por serem derivadas de casos de fator masculino, são submetidas a diagnóstico pré-natal, o que sugere um adequado aconselhamento do casal.

Há também os erros de fechamento do tubo neural (EFTN), que são mais frequentes na prole de FIV que na de ICSI ou da população geral. Segundo alguns, EFTN e FIV estão ambos associados a um fator feminino de infertilidade¹²⁶, mas podem, conforme já discutido anteriormente, estar associados a falhas de *imprinting* no oócito.

Com a ICSI, as bases genéticas da infertilidade masculina foram introduzidas como uma variável importante, cujo impacto ainda hoje é desconhecido, bem como não é completamente conhecido o impacto do próprio procedimento de injeção do espermatozóide no interior do citoplasma do oócito ou da utilização de espermatozóides testiculares ou epididimários. Muitas das causas genéticas para a infertilidade masculina isolada hoje são conhecidas, e o uso das ARTs tem proporcionado sua transmissão à prole, como é o caso das

microdeleções do cromossomo Y. As microdeleções e deleções do cromossomo Y são, juntamente com as aberrações cromossômicas, as causas isoladas mais freqüentes de oligozoospermia e azoospermia. Para esses casos deve ser oferecido DGPI ou diagnóstico pré-natal para estudo citogenético ou determinação do sexo.

E existe de fato uma elevação na freqüência de malformações maiores e menores nas crianças nascidas pelas ARTs. Somente o aprofundamento do conhecimento sobre a etiologia da infertilidade poderá discernir entre o que é um risco da técnica e o que se deve ao *background* genético do casal.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

DO PONTO DE VISTA IDEOLÓGICO, ÉTICO E JURÍDICO

A soma de investimentos em pesquisa na área de reprodução humana no Brasil é muito pequena, e as regulamentações proibitivas que estão aguardando votação para entrar em vigor são paralisantes, tendo sido elaboradas de forma puramente reativa aos desmandos praticados na área. Um exemplo é a medida segundo a qual não será permitida a hiperestimulação ovariana com produção de mais de dois folículos. Isso inviabiliza a prática da reprodução assistida, além de não ser garantia de evitar-se gestação múltipla ou qualquer problema advindo da utilização das ARTs.

No Brasil, como no mundo, está-se repetindo a dissociação entre pesquisa básica e prestação de serviços. Mais ainda, no Brasil não se está investindo em pesquisa das causas da infertilidade, com aplicação dos conhecimentos que já foram gerados na pesquisa em modelos animais, realizadas em centros de referência mundiais. Nosso grupo de pesquisa no Hospital das Clínicas de São Paulo, em colaboração com o grupo do Prs Carlos A. Moreira Filho, do Instituto de Ciências Biomédicas da USP, introduziu a pesquisa de microdeleções do cromossomo Y e o estudo completo do gene CFTR, hoje utilizados pelas clínicas de reprodução assistida.

A associação entre a clínica e a pesquisa precisa ser resgatada e capitaneada por núcleos acadêmicos de produção de conhecimento.

Medidas como a obrigatoriedade de investimentos em pesquisa deveriam ser implementadas para as empresas que comercializam produtos para a área de medicina reprodutiva com atuação no país.

A questão da prevenção envolve bem mais que uma visão política. Do ponto de vista privado, uma medida política de emergência seria a inclusão da infertilidade na cobertura dos planos de saúde. Esse setor acabaria auxiliando um progressivo caráter preventivo na abordagem da questão da infertilidade, e poderia ser auxiliado por políticas públicas de esclarecimento dos fatores de risco envolvidos na reprodu-

ção. Não podemos esquecer que a infertilidade acomete 15% da população adulta e deve ser vista e enfrentada como um problema de saúde pública.

TECNOLOGIA SOCIAL E POPULACIONAL

Do ponto de vista de tecnologia social, é importante que o país desenvolva tecnologias de baixo custo, de modo a tornar acessível o desenvolvimento na área de reprodução humana também à população de baixa renda. O conhecimento gerado deve, ao mesmo tempo, proporcionar à população mecanismos de ter um filho biológico pelas ARTs e ser aplicado no desenvolvimento de soluções inteligentes de planejamento populacional. Por exemplo, o conhecimento adquirido sobre a interação espermatozóide-oócito será fundamental tanto para os casais inférteis quanto para o desenvolvimento de métodos contraceptivos.

AS ARTS NUMA PERSPECTIVA BIOLÓGICA

Todas as técnicas novas suscitam ciúmes por parte dos que não as realizam e medo por parte dos que não as entendem. Não podemos ter preconceitos, mas temos a obrigação de nortear nossos passos utilizando uma bússola confiável, pautada pelos preceitos éticos de construção do conhecimento.

O conhecimento científico que foi construído até o presente momento auxiliará a compreender os reais riscos envolvidos nas ARTs. As ARTs, que tiveram seu início de atividade centrado no desenvolvimento de técnicas laboratoriais de manejo de gametas e embriões, auxiliaram, ainda que de forma empírica e à custa de um risco imprevisível, a construção do conhecimento acerca dos processos de fertilização, falhas de fertilização, falhas de implantação, abortos precoces, partenogênese, partição embrionária, metilação/demetilação/remetilação gênica, mosaicismo. Houve, sem dúvida, um acúmulo de informações provenientes do laboratório de FIV que permitiu algumas linhas de pesquisa, que devem agora ser aprofundadas em modelos experimentais.

Na verdade, ainda não se pode concluir sobre as consequências a longo prazo da ICSI. Antes da ICSI, a natureza submetia a interação oócito-espermatozóide a um estrito critério de seleção, barreiras que somente agora estamos começando a compreender. Mas com a ICSI o gameta que terá êxito será escolhido pelo embriologista, e não será o que necessariamente dar-se-ia melhor na interação. As restrições biológicas ficaram relaxadas. Mas há os que acreditam que os benefícios da ICSI no manejo da infertilidade masculina grave superam, em muito, os riscos advindos da manipulação de espermatozoides ou até mesmo de células imaturas como as espermátides. Atualmente a ICSI tem sido indicada também para os casais com o fator feminino de infertilidade por disfunção do oócito em participar da interação zona-esper-

matozóide. Como a ICSI supera os defeitos tanto dos gametas masculinos como dos femininos, eliminando a necessidade de testes diagnósticos que identifiquem o fator de infertilidade de um casal, inúmeros centros já consideram a possibilidade de utilizar exclusivamente a ICSI para todos os procedimentos de fertilização *in vitro*, o que no Brasil já vem sendo realizado.

A elucidação dos mecanismos que determinam origem, migração e proliferação das células germinativas, dos mecanismos meióticos e dos fatores controladores da maturação e sobrevivência dos gametas será de fundamental importância para o desenvolvimento técnico da maturação *in vitro* de tecidos ovariano e testicular. O desenvolvimento desses conhecimentos é de especial interesse nos casos de quimio- e radioterapia em pacientes com câncer em idade reprodutiva ou na infância.

Seja de qual for a perspectiva a partir da qual tratamos o assunto da reprodução, ela nos remete à questão evolutiva. A infertilidade é um fenótipo letal, em que o indivíduo é incapaz de deixar descendentes. A esse fenótipo corresponde um genótipo, uma combinação de genes que morre com o indivíduo que o possui. Não seria a infertilidade como um alerta ao *pool* gênico no sentido de que aquele indivíduo não pode passar adiante seu genótipo, ao menos pelas formas naturais? Qual será o impacto de contornarmos essa questão com as ARTs?

Se decidirmos “burlar” as leis da Natureza, não seria importante que ao menos soubéssemos para onde estamos conduzindo nossa espécie? Não seria importante conhecer as causas genéticas da infertilidade para que pudéssemos prever o impacto que terá um eventual aumento na frequência de heterozigotos, de mutações e de determinados polimorfismos? Ao descobrir essas causas, não seria uma decorrência natural que fossem desenvolvidos mecanismos realmente terapêuticos que pudessem resgatar a capacidade

reprodutiva, em vez de contornar o problema indo direto à solução através das ARTs?

A reprodução assistida insere uma questão única na medicina. Ela não só nega o determinismo genético como, sem qualquer manipulação genética propriamente dita, propicia a transmissão, às gerações futuras, de um genótipo que havia sido fadado ao desaparecimento. É diferente do diabetes, por exemplo, que pode ser tratado e pode ser transmitido às gerações futuras por meios naturais, pois não é uma doença que causa infertilidade. A infertilidade não pode ser transmitida naturalmente às gerações futuras, pois a infertilidade é seu próprio pressuposto. O que torna a terapêutica de uma doença somática diferente da “terapêutica” da infertilidade? Não estaríamos com as ARTs atuando como se estivéssemos manipulando linhagens germinativas? E como atuar nos casos de doenças autossômicas dominantes que causam infertilidade ou que estão associadas a ela, e para as quais ainda não está disponível o diagnóstico genético de pré-implantação?

Não temos hoje as respostas ou até mesmo as perguntas adequadas para nos guiar no enquadramento e na normatização dessas e de outras questões, bem como na criação de modelos éticos de análise para essa área do conhecimento.

Qual seria o ponto de equilíbrio aceitável entre a visão da comunidade científica, a dos centros de reprodução acadêmicos e a visão das clínicas comerciais de reprodução assistida, de modo a evitar a utilização indevida e supérflua das ARTs e das tecnologias diagnósticas?

O casamento com a clínica do casal infértil irá auxiliar a construção das respostas para essas questões. Não hoje nem amanhã. É o início de uma nova era na medicina. Já tivemos a era da anatomia com Vesalius, a era bacteriológica de Pasteur, a bioquímica de Krebs e a imunológica. Agora, com a soma de todas as outras temos a era do genoma. Na medicina reprodutiva, se fizermos bem nosso presente, não temos por que temer nosso futuro.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Thonneau P, Marchand S, Tallec A, Ferial ML, Ducot B, Lansac J et al. Incidence and main causes of infertility in a resident population (1,850,000) of three French regions (1988-1989). *Hum Reprod*, 6(6):811-816, 1991.
2. Meschede D, Lemcke B, Behre HM, Degeyter C, Nieschlag E, Horst J. Clustering of male infertility in the families of couples treated with intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 7:1604-1608, 2000.
3. Ober C, Hyslop TE, Hauck WW. Inbreeding effects on fertility in humans: evidence for reproductive compensation. *Am J Hum Genet*, 64:225-31, 1999.
4. Farley TMM. The WHO Standardized Investigation of the Infertile Couple. In: *Infertility Male and Female, The Proceedings of the 12th World Congress on Fertility and Sterility*, Singapore, October 1986. The Parthenon Publishing Group, UK, 1987.
5. von Zumbusch A, Fiedler K, Mayerhofer A, Jesberger B, Ring J, Vogt H-J. Birth of healthy children after intracytoplasmic sperm injection in two couples with male Kartagener's syndrome. *Fertil Steril*, 70: 643-646, 1998.
6. Narayan D, Krishnan SN, Upender M, Ravikumar TS, Mahoney MJ, Dolan TF et al. Unusual inheritance of primary ciliary dyskinesia (Kartagener's syndrome). *J. Med. Genet.* 31: 493-496, 1994.
7. Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, Van Der Merwe JP, Vanzyl JA et al. Sperm morphologic features as a prognostic factor in vitro fertilization. *Fertil Steril* 46:1118-1123, 1986.
8. Pryor JL, Kent-First M, Muallem A Van Bergen AH, Noltan WE, Meisner L et al. Microdeletion on the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Méd*, 336:534-539, 1997.
9. Simoni M, Gromoll J, Dworniczak B, Rolf C, Abshagen K, Kamischke A et al. Screening for deletions of the Y chromosome involving the DAZ (Deleted in Azoospermia) gene in azoospermia and severe oligozoospermia. *Fertil Steril* 67:542-547, 1997.
10. Pieri P de C, Pereira DH, Glina S, Hallak J, McElreavey K, Moreira-Filho CA. A cost-effective screening test for detecting AZF microdeletions on the human Y chromosome. *Genet Test* 6(3):185-194, 2002.

11. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the preimplantation of a human embryo. *Lancet* 2(8085):366, 1978
12. Giudice LC. Implantation and endometrial function. In: *Molecular Biology in Reproductive Medicina*. Fauser BCJM (Ed.), Parthenon Pub Group, pp. 333-352, 1999.
13. Palermo G, Joris H, DeVroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after ICSI of single spermatozoan into oocyte. *Lancet*, 340:17-18, 1992.
14. Schatten G, Hewitson L, Simerly C, Sutovsky P, Huszar G. Cell and molecular biological challenges of ICSI: A.R.T. before science? *J Law Med Ethics*, 26:29-37, 1998.
15. Pereira DHM, Pieri P de C. Reprodução assistida com oócito de doadora — Ovodoação. In: *Perimenopausa, climatério e senectude*. Lemgruber I, Povoia LC e Carneiro R Eds., Ed. Revinter, Rio de Janeiro — RJ, 1999, 224p, 1999.
16. Khastgir G, Abdalla H, Thomas A, Korea L, Latache L, Studd J. Oocyte Donation in Turner's Syndrome; An analysis of the factors affecting the outcome. *Hum Reprod*, 12:279-285, 1997b.
17. Munné S, Weier HUG, Stein J, Grifo J, Cohen J. A fast and efficient method for simultaneous X and Y in situ hybridization of human blastomeres. *J Assist Reprod Genet*, 10:82-90, 1993.
18. Munné S, Grifo J, Cohen J, Weier HUG. Chromosome abnormalities in arrested human preimplantation embryos: a multiple probe fluorescence in situ hybridization (FISH) study. *Amer J Hum Genet*, 55:150-159, 1994a.
19. Palermo GD, Munné S, Colombero LT, Cohen J, Rosenwaks Z. Genetics of abnormal human fertilization. *Hum Reprod*, 10 (suppl 1):120-127, 1995.
20. Lobb DK, Soliman SR, Daya S, Younglai EV. Steroidogenesis in luteinized granulosa cell cultures varies with follicular priming regimen. *Hum Reprod*, 13(8):2064-2067, 1998.
21. Huhtaniemi IT. Polymorphism of gonadotropin action; molecular mechanisms and clinical implications. *Acta Neurobiol Exp (Warsz)*, 56(3):743-51, 1996.
22. Weil S, Vendola K, Zhou J, Bondy CA. Androgen and follicle-stimulating hormone interactions in Primate ovarian follicle development. *J Clin Endocrinol Metab*, 84:2951-2956, 1999.
23. Fauser BCJM, vanHeusden AM. Manipulation of human ovarian function: physiological concepts and clinical consequences. *Endocr Rev*, 18(1):71-106, 1997.
24. Legro RS, Strauss JF. Molecular progress in infertility: polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril*, 78(3):569-576, 2002.
25. Xita N, Georgiou I, Tsatsoulis A. The genetic basis of polycystic ovary syndrome. *Eur J Endocrinol*, 147:717-725, 2002.
26. Al-Hendy A, Moshynska O, Saxena A, Feyles V. Association between mutations of the follicle-stimulating-hormone receptor and repeated twinning. *Lancet*, 356:914, 2000.
27. Akerman FM, Lei Z, Rao CV, Nakajima ST. A case of spontaneous ovarian hyperstimulation syndrome with a potential mutation in the hCG/LH receptor gene. *Fertil Steril*, 74(2):403-404, 2000
28. Themmen AP, Huhtaniemi IT. Mutations of gonadotropins and gonadotropin receptors: elucidating the physiology and pathophysiology of pituitary-gonadal function. *Endocr Rev* 21:551-583, 2000.
29. Weiss J, Axelrod L, Whitcomb RW et al. Hypogonadism caused by a single amino-acid substitution in the beta subunit of luteinizing hormone. *N Engl J Med* 326:179-183, 1992.
30. Simpson JL. Disorders of the gonads, genital tract and genitalia. In Rimoin DL, Connor JM e Pyeritz RE (eds), *Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*. 3rd ed. Churchill Livingstone, pp. 1477-1500, 1997.
31. Arnhold JJP, Latronico AC, Batista MC, Mendonça BB. Menstrual disorders and infertility caused by inactivating mutations of the luteinizing hormone receptor gene. *Fertil Steril*, 71(4):597-601, 1999.
32. Matthews CH, Borgato S, Beck-Peccoz P, Adams M, Tone Y, Gambin G et al. Primary amenorrhoea and infertility due to a mutation in the β -subunit gene of follicle-stimulating hormone. *Nature Genet*, 5:83-86, 1993.
33. Aittomäki K, Dieguez Lucena JL, Pakarinen P, Sistonen P, Tapanainen J et al. Mutation in the follicle-stimulating hormone receptor gene causes hereditary hypergonadotropic ovarian failure. *Cell*, 82:959-968, 1995.
34. Layman LC, Cohen DP. Study of the follicle-stimulating hormone-beta gene in men with oligospermia. *Am Soc Reprod Med O-163*, p580, 1997.
35. Simoni M, Gromoll J, Hoppner W, Kamischke A, Krafft T, Stahle D, Nieschlag E. Mutational analysis of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor in normal and infertile men: identification and characterization of two discrete FSH receptor isoforms. *J Clin Endocr Metab*, 84: 751-755, 1999.
36. Tapanainen JS, Aittomäki K, Min J, Vaskivuo T, Huhtaniemi IT. Men homozygous for an inactivating mutation of the follicle-stimulating hormone (FSH) receptor gene present variable suppression of spermatogenesis and fertility. *Nat Genet*, 15:205-206, 1997.
37. Christin-Maitre S, Vasseur C, Portnoi MF, Bouchard P. Genes and premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol*, 145(1-2):75-80, 1998.
38. Conway GS, Conway E, Walker C, Hoppner W, Gromoll J, Simoni M. Mutation screening and isoform prevalence of the follicle stimulating hormone receptor gene in women with premature ovarian failure, resistant ovary syndrome and polycystic ovary syndrome. *Clin Endocrinol (Oxf)*, 51(1):97-99, 1999.
39. Tibiletti MG, Testa G, Vegetti W, Alagna F, Tadorelli M, Dalpra L et al. The idiopathic forms of premature menopause and early menopause show the same genetic pattern. *Hum Reprod*, 14(11):2731-2734, 1999.
40. Vegetti W, Tibiletti MG, Testa G, de Lauretis Y, Alagna F, Castoldi E et al. Inheritance in idiopathic premature ovarian failure: analysis of 71 cases. *Hum Reprod*, 13(7):1796-1800, 1998.
41. Vegetti W, Marozzi A, Manfredini E, Testa G, Alagna F, Nicolosi A et al. Premature ovarian failure. *Mol Cell Endocrinol*, 161(1-2):53-57, 2000.
42. Simoni M, Gromoll J, Nieschlag E. Molecular pathophysiology and clinical manifestations of gonadotropin receptor defects. *Steroids*, 63(5-6):288-293, 1998.
43. Powell CM, Taggart RT, Drumheller TC et al. Molecular and cytogenetics studies of an autosome translocation in a patient with premature ovarian failure and review of the literature. *Am J Med Genet*, 52:19-26, 1994.
44. Luoh SW, Bain PA, Polakeiwicz RD et al. Zfx mutation results in small animal size and reduced germ cell number in male and female mice. *Am J Hum Genet*, 36:1341:1348, 1994.
45. Krauss CM, Turksoy RN, Atkins L et al. Familial premature ovarian failure due to an interstitial deletion of the long arm of the X chromosome. *N Engl J Méd*, 317:125-131, 1987.
46. Conway GS, Hettiarachchi S, Murray A, Jacobs PA. Fragile X permutation in familial premature ovarian failure. *Lancet*, 346:309-310, 1995.
47. Cox DN, Chao A, Baker J, Chang L, Qiao D, Lin H. A novel class of evolutionarily conserved genes defined by piwi are essential for stem cell self-renewal. *Genes Dev*, 12:3715-3727, 1998.
48. Lin H, Spradling AC. A novel group of pumilio mutations affects the asymmetric division of germline stem cells in the *Drosophila* ovary. *Development*, 124: 2463-2476, 1997.
49. Deng W, Lin H. miwi, a murine homolog of piwi, encodes a cytoplasmic protein essential for spermatogenesis. *Dev Cell*, 2:819-839, 2002.
50. Parrot JA, Skinner MK. Kit-ligand/stem cell factor induces primordial follicle development and initiates folliculogenesis. *Endocrinology*, 140:4262-4271, 1999.
51. Vigodner M, Lewin LM, Shochat L, Golan R. Spermatogenesis in the golden hamster: the role of c-kit. *Mol Reprod Dev*, 60(4):562-568, 2001.
52. Ruggiu M, Speed R, Taggart M, Mckay SJ, Kilanowski F, Saunders P et al. The mouse Dazla gene encodes a cytoplasmic protein essential for gametogenesis. *Nature* 389:73-77, 1997.
53. McNeilly JR, Saunders PTK, Taggart M, Cranfield M, Cooke HJ, McNeilly AS. Loss of Oocytes in Dazl Knockout Mice Results in Maintained Ovarian Steroidogenic Function but Altered Gonadotropin Secretion in Adult Animals *Endocrinology*, 141(11):4284-4294, 2000.
54. Van Assche E, Bonduelle M, Tournaye H, Joris H, Verheyen G, Devroey P et al. Cytogenetics of infertile men. *Hum Reprod Suppl*, 4:1-24, 1996.
55. Nakamura Y, Kitamura M, Nishimura K, Koga M, Kondoh N, Takeyama M et al. Chromosomal variants among 1790 infertile men. *Int J Urol* 8(2):49-52, 2001.

56. Munne S, Sandalinas M, Escudero T, Marquez C, Cohen J. Chromosome mosaicism in cleavage-stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reprod Biomed Online*, 4(3):223-232, 2002.
57. Lansac J, Thepot F, Mayaux MJ, Czyglick F, Wack T, Selva J, Jalbert P. Pregnancy follow-up after artificial insemination or IVF with donated frozen semen: a collaborative study of the French CECOS Federation on 21597 pregnancies. *ESHRE'97 Congress Programme and Abstracts*.
58. Luetjens CM, Rolf C, Gassner P, Werny JE, Nieschlag E. Sperm aneuploidy rates in younger and older men. *Hum Reprod*, 17(7):1826-1832, 2002.
59. Calogero AE, DePalma A, Grazioso C, Barone N, Romeo R, Rappazzo G et al. Aneuploidy rate in spermatozoa of selected men with abnormal semen parameters. *Hum Reprod*, 16(6):1172-1179, 2001.
60. Kovanci E, Kovacs T, Moretti E, Vigue L, Bray-Ward P, Ward DC, Huszar G. FISH assessment of aneuploidy frequencies in mature and immature human spermatozoa classified by the absence or presence of cytoplasmic retention. *Hum Reprod*, 16(6):1209-1217, 2001.
61. Finkelstein S, Mukamel E, Yavetz H, Paz G, Avivi L. Increased rate of nondisjunction in sex cells derived from low-quality semen *Hum Genet*, 102:129-137, 1998.
62. Spriggs EL, Rademaker AW, Martin RH. Aneuploidy in Human Sperm: the use of multicolor FISH to test various theories of nondisjunction. *Am J Hum Genet*, 58:356-362, 1996.
63. MacDonald M, Hassold T, Harvey J, Wang LH, Morton NE, Jacobs P. The origin of 47,XXY and 4,XXX aneuploidy: Heterogeneous mechanisms and role of aberrant recombination. *Hum Mol Genet*, 3:1365-1371, 1994.
64. Bonduelle M, Camus M, De Vos A, Staessen C, Tournaye H, Van Assche E et al. A. Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent children. *Hum Reprod Suppl*, 1:243-64, 1999.
65. Simpson JL, Lamb DJ. Genetic effects of intracytoplasmic sperm injection. *Semin Reprod Med*, 19(3):239-249, 2001.
66. Yuan L, Liu JG, Zhao J, Brundell E, Daneholt B, Hoog C. The murine SCP3 gene is required for synaptonemal complex assembly, chromosome synapsis, and male fertility. *Mol Cell*, 5(1):73-83, 2000.
67. Yuan L, Liu JG, Hoja MR, Wilbertz J, Nordqvist K, Hoog C. Female germ cell aneuploidy and embryo death in mice lacking the meiosis-specific protein SCP3. *Science*, 296(5570):1115-1118, 2002.
68. Crackower MA, Kolas NK, Noguchi J, Sarao R, Kikuchi K, Kaneko H et al. Essential role of Fkbp6 in male fertility and homologous chromosome pairing in meiosis. *Science*, 300:1291-1295, 2003.
69. Michaelis C, Ciosk R, Nasmyth K. Cohesins: chromosomal proteins that prevent premature separation of sister chromatids. *Cell*, 91:35-45, 1997.
70. Nasmyth K, Peters JM, Uhlmann F. Splitting the chromosome: cutting the ties that bind sister chromatids. *Science*, 288:1379-1385, 2000.
71. Paliulis LV, Nicklas RB. The reduction of chromosome number in meiosis is determined by properties built into the chromosomes. *J Cell Biol* 150:1223-1232, 2000.
72. Steuerwald N, Cohen J, Herrera RJ, Sandalinas M, Brenner CA. Association between spindle assembly check point expression and maternal age human oocytes. *Mol Hum Reprod*, 7:49-55, 2001.
73. Levron J, Aviram-Goldring A, Madgar I, Raviv G, Barkai G, Dor J. Studies on sperm chromosomes in patients with severe male factor infertility undergoing assisted reproductive technology treatment. *Mol Cell Endocrinol*, 183 Suppl 1:S23-28, 2001.
74. Bergere M, Wainer R, Nataf V, Bailly M, Gombault M, Ville Y, Selva J. Biopsied testis cells of four 47,XXY patients: fluorescence in situ hybridization and ICSI results. *Hum Reprod*, 17(1):32-37, 2002.
75. Ron-El R, Strassburger D, Gelman-Kohan S, Friedler S, Raziel A, Appelman Z. A 47,XXY fetus conceived after ICSI of spermatozoa from a patient with Klinefelter's syndrome: case report. *Hum Reprod*, 15(8):1804-1806, 2000.
76. Morel F, Bernicot I, Herry A, Le Bris MJ, Amice V, De Braekeleer M. An increased incidence of autosomal aneuploidies in spermatozoa from a patient with Klinefelter's syndrome. *Fertil Steril*, 79 Suppl 3:126-128, 2003
77. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet*, 34: 119-124, 1976.
78. Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown LG, Beer-Romero P, Bogan JS, Page DC. The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science*, 258:59-59,1992.
79. Lahn BT, Page DC. Functional coherence of the human Y chromosome. *Science* 278:675-80, 1997.
80. Kamp C, Hirschmann P, Voss H, Huellen K, Vogt PH. Two long homologous retroviral sequences blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. *Hum Mol Genet* 9:2563-2572, 2000.
81. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterson RH et al. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet* 29:279-286, 2001.
82. Lupski JR. Genomic disorders: structural features of the genome can lead to DNA rearrangements and human disease traits. *Trends Genet* 14:417-422, 1998.
83. I Consenso Brasileiro sobre Infertilidade Masculina. Glina S e Damião R Eds., BG Cultural Ed., São Paulo, 92 p, 1999.
84. Page DC, Silber S, Brown LG. Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons by intracytoplasmic sperm injection, but are likely to transmit the deletion and infertility. *Hum Reprod*, 14:1722-1726, 1999.
85. Silber SJ, Alagappan R, Brown LG, Page DC. Y chromosome deletions in azoospermic and severely oligozoospermic men undergoing intracytoplasmic sperm injection after testicular sper extraction. *Hum Reprod*, 13:3332-3327, 1998.
86. Kamischke A, Gromoll J, Simoni M, Behre HM, Nieschlag E. Transmission of a Y chromosomal deletion involving the deleted in azoospermia (DAZ) and chromodomain (CDY1) genes from father to son through intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod*, 14:2320-2322, 1999.
87. Kleiman SE, Yogev L, Gamzu R, Hauser R, Botchan A, Lessing JB, Paz G, Yavetz H. Genetic evaluation of infertile men. *Hum Reprod*, 14:33-38, 1999.
88. Kent-First MG, Kol S, Muallem A, Ofir R, Manor D, Blazer S et al. The incidence and possible relevance of Y-linked microdeletions in babies born after intracytoplasmic sperm injection and their infertile fathers. *Mol Hum Reprod*, 2:943-959, 1996.
89. Nap AW, Van Golde RJ, Tuerlings JH, De Sutter P, Pieters MH, Giltay JC, Kastrop PM, Braat DD, Kremer JA. Reproductive decisions of men with microdeletions of the Y chromosome: the role of genetic counselling. *Hum Reprod*, 14:2166-2169, 1999.
90. Belloli G, D'Agostino S, Pesce, C, Fantuz E. Varicocele in childhood and adolescence and other testicular anomalies: An epidemiological study. *Pediatr Med Chir*, 15:159-162,1993.
91. Risser, WL, Lipshultz, LI. Frequency of varicocele in black adolescents. *J Adolesc Health Care* 5:28-29,1984.
92. Lipshultz, LI, Corriere, JN. Progressive testicular atrophy in the varicocele patient. *J Urol*, 117:175-176,1977.
93. Gorelick JI, Goldstein M. Loss of fertility in men with varicocele. *Fertil Steril*, 59:613-616,1993.
94. Witt MA, Lipshultz LI. Varicocele: a progressive or static lesion? *Urology*, 42(5):541-543, 1993.
95. Girardi SK, Mielnik A, Schlegel PN. Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Hum Reprod* 12:1635-1641, 1997.
96. Chang SY, Tsai MY (1999): Detection of azoospermic factor genes in chinese men with azoospermia or severe oligozoospermia. *J Assist Reprod Genet*, 16:259-262.
97. Österlund C, Segersteen E, Arver S, Pousette A. Low number of Y-chromosome deletions in infertile azoospermic men at a Swedish andrology centre. *Int J Androl*, 23:225-229, 2000.
98. Huszar G, Vigue L. Incomplete development of human spermatozoa is associated with increased creatine phosphokinase concentrations and abnormal head morphology. *Mol Reprod Dev* 34:292-298,1993.
99. Hallak J, Sharma RK, Pasqualotto FF, Ranganathan P, Thomas AJ Jr, Agarwal A. Creatine kinase as an indicator of sperm quality and maturity in men with oligospermia. *Urology*, 58(3):446-451, 2001.

100. Huszar G, Vigue L. Spermatogenesis-related change in the synthesis of the creatine kinase B-type and M-type isoforms in human spermatozoa. *Mol Reprod Dev*, 25(3):258-262, 1990.
101. Huszar G, Stone K, Dix D, Vigue L. Putative creatine kinase M-isoform in human sperm is identified as the 70-kilodalton heat shock protein HspA2. *Biol Reprod*, 63:925-932, 2000.
102. Dix DJ, Allen JW, Collins BW, Goulding EH, Eddy EM. Targeted gene disruption of hsp70-2 results in failed meiosis, germ cell apoptosis, and male infertility. *Proc Natl Acad Sci*, 93:3264-3268, 1996a.
103. Allen JW, Dix DJ, Collins BW, Merrick BA, He C, Eddy EM. Hsp70-2 is part of the synaptonemal complex in mouse and hamster spermatocytes. *Chromosoma*, 104:414-421, 1996.
104. Zhu D, Dix DJ, Eddy EM. HSP70-2 is required for CDC2 kinase activity in meiosis I of mouse spermatocytes. *Development*, 124:3007-3014, 1997.
105. Chen SS, Chang LS, Chen HW, Wei YH. Polymorphism of glutathione S-transferase M1 and male infertility in Taiwanese patients with varicocele. *Hum Reprod*, 17:718-725, 2002.
106. Mann CL, Davies MB, Boggild MD, Aldersea J, Fryer AA, Jones PW et al. Glutathione S-transferase polymorphism in MS: their relationship to disability. *Neurology*, 54:552-557, 2000.
107. Gopalakrishnan B, Shaha C. Inhibition of sperm glutathione S-transferase leads to functional impairment due to membrane damage. *FEBS Lett*, 422:296-300, 1998.
108. Holsclaw DS, Perlmutter AD, Jockin H, Shwachman H. Genital abnormalities in male patients with cystic fibrosis. *J Urol*, 106(4):568-574, 1971.
109. Augarten A, Yahav Y, Kerem BS, Halle D, Laufer J, Szeinberg A et al. Congenital bilateral absence of vas deferens in the absence of cystic fibrosis. *Lancet*, 344(8935):1473-1474, 1994.
110. Oates RD, Amos JA. The genetic basis of congenital bilateral absence of the vas deferens and cystic fibrosis. *J Andro*, 15(1):1-8, 1994.
111. De Braekeleer M, Ferec C. Mutations in the cystic fibrosis gene in men with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Mol Hum Reprod* 2(9):669-677, 1996.
112. Boat TF, Welsh MJ, Baud et al. Cystic Fibrosis. In: *The metabolic Basis of Inherited Disease*, 6th edn., Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds), Mc Graw-Hill, New York, pp. 2649-2680, 1989.
113. Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z et al. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science*, 245(4922):1066-1073, 1989.
114. *Physiol Rev* 79 Suppl 1:S1-S255, 1999.
115. Chillón M, Casals T, Mercier B, Bassas L, Lissens W, Silber S et al. Mutations in the cystic fibrosis gene in patients with congenital absence of the vas deferens. *N Engl J Méd*, 332(22):1475-1480, 1995.
116. Dumur V, Gervais R, Rigot JM, Delomel-Vinner E, Decaestecker B, Lafitte JJ, Roussel P. Congenital bilateral absence of the vas deferens (CBAVD) and cystic fibrosis transmembrane regulator (CFTR): correlation between genotype and phenotype. *Hum Genet*, 97(1):7-10, 1996.
117. Pagani F, Stuani C, Tzetis M, Kanavakis E, Efthymiadou A, Doudounakis S et al. New type of disease causing mutations: the example of the composite exonic regulatory elements of splicing in CFTR exon 12. *Hum Mol Genet*, 12(10):1111-1120, 2003.
118. European Working Group on CF Genetics (EWGCFG). Gradient of distribution in Europe of the major CF mutation and of its associated haplotype. *Hum Genet*, 85:436-445, 1990.
119. Raskin S, Phillips JA, Krishnamani MRS, Vnencak-Jones C, Parker RA, Rozov T et al. DNA analysis of cystic fibrosis in Brazil by direct PCR amplification from Guthrie cards. *Am J Med Genet*, 46:665-669, 1993.
120. Cassidy SB, Lai LW, Erickson RP, Magnuson L, Thomas E, Gendron R, Hermann J. Trisomy 15 with loss of the paternal 15 as a cause of Prader-Willi syndrome due to maternal disomy. *Am J Hum Genet*, 51(4):701-708, 1992.
121. Purvis-Smith SG, Saville T, Manass S, Yip MY, Lam-Po-Tanq PR, Duffy B, Johnston H, Leigh D, McDonald B. Uniparental disomy 15 resulting from "correction" of an initial trisomy 15. *Am J Hum Genet*, 50(6):1348-1350, 1992.
122. Yoder JA, Walsh CP, Bestor TH. Cytosine methylation and the ecology of intra-genomic parasites. *Trends Genet*, 13:335-340, 1997.
123. Bird AP, Wolffe AP. Methylation-induced repression – belts, braces, and chromatin. *Cell* 99:451-454.
124. Okano M, Bell DW, Haber DA, Li E. DNA methyltransferases Dnmt3a and Dnmt3b are essential for de novo methylation and mammalian development. *Cell*, 99:247-257.
125. Hata K, Okano M, Lei H, Li E. Dnmt3L cooperates with the Dnmt3 family of de novo DNA methyltransferases to establish maternal imprints in mice. *Development*, 129:1983-1993, 2002.
126. Wennerholm UB, Bergh C, Hamberger L, Lundin K, Nilsson L, Wikland M, Kallen B. Incidence of congenital malformations in children born after ICSI. *Hum Reprod*, 15(4):944-948, 2000.
127. Glenn CC, Driscoll DJ, Yang TP, Nicholls RD. Genomic imprinting: potential function and mechanisms revealed by the Prader-Willi and Angelman syndromes. *Mol Hum Reprod*, 3(4):321-332, 1997.
128. Elliott M, Maher ER. Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet*, 31:560-564, 1994.
129. Junien C. Beckwith-Wiedemann syndrome, tumorigenesis and imprinting. *Curr Op Genet Develop*, 2:431-438, 1992.
130. Cox GF, Bürger J, Lip V, Mau UA, Sperling K, Wu B-L et al. Intracytoplasmic sperm injection may increase the risk of imprinting defects. *Am J Hum Genet*, 71:162-164, 2002.
131. DeBaun MR, Niemitz EL, Feinberg AP. Association of in vitro fertilization with Beckwith-Wiedemann syndrome and epigenetic alterations of LIT1 and H19. *Am J Hum Genet*, 72(1):156-60, 2003.
132. El-Maarri O, Buiting K, Peery EG, Kroisel PM, Balaban B, Wagner K et al. Maternal methylation imprints on human chromosome 15 are established around of after fertilization. *Nat Genet*, 27:341-344, 2001.
133. Young LE, Fernandes K, McEvoy TG, Butterwith SC, Gutierrez GG, Carolan C et al. Epigenetic change in IGF2R is associated with fetal overgrowth after sheep culture. *Nat Genet* 27:153-154, 2001.
134. Lefebvre L, Viville S, Barton SC, Ishino F, Keverne EB, Surani MA. Abnormal maternal behaviour and growth retardation associated with loss of the imprinted gene Mest. *Nat Genet*, 20(2):163-169, 1998.
135. Verma M, Dunn BK, Ross S, Jain P, Wang W, Hayes R, Umar A. Early detection and risk assessment: proceedings and recommendations from the Workshop on Epigenetics in Cancer Prevention. *Ann N Y Acad Sci*, 983:298-319, 2003.
136. Ariel MA, Cedar H, McCarrey J. Developmental changes in methylation of spermatogenesis-specific genes include reprogramming in the epididymis. *Nat Genet*, 7:59-63, 1994.
137. Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J et al. Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev*, 6(5):705-14, 1992.
138. Fishel S, Green S, Bishop M, Thornton S, Hunter A, Fleming S, al-Hassan S. Pregnancy after intracytoplasmic injection of spermatid. *Lancet*, 345(8965):1641-1642, 1995.
139. Tesarik J, Mendoza C, Testart J. Viable embryos from injection of round spermatids into oocytes. *N Engl J Méd*, 333(8):525, 1995.
140. Ogura A, Matsuda J, Yanagimachi R. Birth of normal young after electrofusion of mouse oocytes with round spermatids. *Proc Natl Acad Sci USA*, 91(16):7460-7462, 1994.
141. Edwards RG, Beard HK. Oocyte polarity and cell determination in early mammalian embryos. *Mol Hum Reprod* 3:863-905, 1997.
142. Gardner RL. Can developmentally significant spatial patterning of the egg be discounted in mammals? *Hum Reprod Update*, 2:3-27, 1996.
143. Palmieri S, Peter W, Heiki H, Scholer H. Oct-4 transcription factor is expressed in the mouse embryo during establishment of the first two extraembryonic cell lineages involved in implantation. *Dev Biol*, 166:259-267, 1994.

144. Antezak M, Van Blerkom J. Oocyte influences on early development: the regulatory proteins leptin and STAT3 are polarized in mouse and humans oocytes and differentially distributed within the cells of the preimplantation embryo. *Mol Hum Reprod*, 3:1067-1086, 1997.
145. Wilmut I, Schnieke AE, McWhir J, Kind AJ, Campbell KHS. Viable offspring derived from fetal and adult mammalian cells. *Nature (London)*, 385:810-813, 1997.
146. Chastant S, Christians E, Campion E, Renard J-P. Quantitative control of gene expression by nucleo-cytoplasmic interaction in early mouse embryos: consequence for reprogramming by nuclear transfer. *Mol Reprod Dev*, 44:423-432, 1996.
147. Cohen J, Scott R, Schimmel T, Levron J, Willadsen S. Birth of infant after transfer of anucleate donor oocyte cytoplasm into recipient eggs. *Lancet*, 350(9072):186-187, 1997.
148. Chinnery PF, Thornburn DR, Samuels DC, White SL, Dahl HM, Turnbull DM et al. The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both? *Trends Genet*, 16(11):500-505, 2000
149. Thornburn DR, Dahl H-HM. Mitochondrial disorders: genetics, counseling, prenatal diagnosis and reproductive options. *Am J Med Genet*, 106:102-114, 2001.
150. Barritt JA, Brenner CA, Malter HE, Cohen J. Mitochondria in human offspring derived from ooplasmic transplantation. *Hum Reprod*, 16(3):513-6, 2001.
151. Schlatt S. Prospects and problems for germ cell transplantation in the male. *Inter J Androl*, 22:13-18, 1999.
152. Parks JE, Lee DR, Huang S, Kaproth MT. Prospects for spermatogenesis in vitro. *Theriogenology*, 59(1):73-86, 2003.
153. Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Méd*, 346(10):725-730, 2002.
154. Schieve LA, Meikle SF, Ferre C, Peterson HB, Jeng G, Wilcox LS. Low and very low birth weight in infants conceived with use of assisted reproductive technology. *N Engl J Méd*, 346(10):731-737, 2002.
155. Bowen JR, Gibson FL, Leslie GI, Saunders DM. Medical and developmental outcome at 1 year for children conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Lancet*, 351(9115):1529-1534, 1998.
156. Kurinczuk JJ, Bower C. Birth defects in infants conceived by intracytoplasmic sperm injection: an alternative interpretation. *BMJ*, 315(7118):1260-5; discussion 1265-6, 1997.

PATRÍCIA DE CAMPOS PIERI

Centro de Reprodução Humana — Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina — USP
 Av. Dr. Enéas de Carvalho Aguiar, 44 — PAMB/4º andar — CEP: 5403-000 — São Paulo-SP
 Tel: 55 (11) 3061.9644 / 3061.9004 — *E-mail:* pc pieri@uol.com.br

Títulos Universitários/Formação Acadêmica

- Graduação: Formada em Biologia pelo Instituto de Biologia da Universidade de São Paulo, 1981.
- Mestrado: em Biologia/Genética pelo Instituto de Biociências da USP, 1991.
- Doutorado: em Biologia/Genética pelo Instituto de Biociências da USP, 2001.

Função Atual

- Geneticista do Centro de Reprodução Humana da Divisão de Clínica Urológica do Hospital das Clínicas HC, Faculdade de Medicina da USP, desde 1999.

Cargos e Funções Exercidos

- Coordenadora Geral do Serviço de Genética Humana da Associação Maternidade de São Paulo, de 1987 a 1992.
- Diretora da Genética — Instituto de Medicina Fetal e Genética Humana, de 1992 a 1995.
- Geneticista da Profert — Programa de Reprodução Assistida, de 1997 a 2001.

- Geneticista voluntária no Ambulatório de Andrologia da Divisão de Clínica Urológica do Hospital das Clínicas da FMUSP, desde 1999

Resumo da Produção Acadêmica e Científica

Publicações

Periódicos internacionais, 5
Periódicos nacionais, 8
Capítulos de livros nacionais, 3

Congressos

Trabalhos apresentados em congressos internacionais, 5
Trabalhos apresentados em congressos nacionais, 24
Prêmios em congressos, 1

Formação e Seleção de Pessoal

Orientação de estagiários, 21
Orientação de alunos de graduação medicina/USP de 1988 a 1991
Orientação de iniciação científica, 4

JORGE HALLAK

Universidade de São Paulo — Faculdade de Medicina
Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina - USP
Av. Dr. Anéas de Carvalho Aguiar, 255 — 5º andar ICHC — CEP: 05403900 — Sao Paulo-SP

Títulos Universitários

- Doutor em Medicina em 1999 pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, FMUSP
- Médico Assistente, Doutor da Divisão de Clínica Urológica do Departamento de Cirurgia do HC-FMUSP

Funções Atuais

- Coordenador do Centro de Reprodução Humana da Divisão de Clínica Urológica do HC-FMUSP
- Orientador do Programa de Pós-Graduação da Disciplina de Urologia da Divisão de Clínica Urológica da FMUSP
- Pesquisador Associado Internacional do “Center for Advanced Research in Human Reproduction and Infertility, Department of Urology, Gynecology-Obstetrics, Biostatistics and Epidemiology, The Cleveland Clinic Foundation, Cleveland, OH — USA”.
- Diretor do Comitê de Andrologia da Sociedade Brasileira de Reprodução Humana
- Responsável pela Seção de Reprodução Humana, Infertilidade e Função Sexual da Sociedade Brasileira de Cancerologia
- Responsável pelo Comitê de Infertilidade da Sociedade Brasileira de Oncologia Pediátrica

Principais Publicações do Grupo

- Pieri PC, Pereira DH, Glina S, Hallak J, Mcelreavey K, Moreira-Filho CA. A cost-effective screening test for detecting AZF microdeletions on the human Y chromosome. *Genet Test*, 6(3):185-194, 2002.

- Glina S, Almeida JAR, Farah LM, Pieri P, Fragoso JB, Martins FG. Alterações genéticas em pacientes com infertilidade masculina submetidas a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). *Actual Androl*, 8(2):63-69, 2000.
- Pereira DHM; Pieri PC (). Reprodução assistida com oócito de doadora — Ovodoação. In: Perimenopausa, climatério e senectude. Lemgruber I, Povoá LC e Carneiro R (Eds.), Ed. Revinter, Rio de Janeiro — RJ, 1999, 224p., 1999.
- Pieri P de C (no prelo). Causas genéticas do hipogonadismo Hipogonadotrófico. In: Reposição Hormonal Masculina — Andropausa. Salgueiro LL e Otaviano E (Eds.), Ed Atheneu.
- Indicadores de produção do autor principal (Patrícia de Campos Pieri)

Resumo da Produção Acadêmica e Científica**Publicação**

Produção bibliográfica, 16
Artigos publicados em periódicos, 2
Trabalhos em eventos, 12
Resumos, 12
Livros e capítulos, 2
Capítulos de livros publicados, 2

Orientações

Trabalhos de conclusão de curso de graduação, 1

Outros

Participações em banca de trabalhos de conclusão, 2

SAMI ARAP

Divisão de Clínica Urológica – HCFMUSP

Caixa Postal: 11.273-9 — CEP: 05422-970 — São Paulo-SP

Tel.: (11) 3081-1091/3063-4050 — Fax: (11) 3064-7013 — *E-mail:* sami.arap@hcnet.usp.br

Títulos Universitários/Formação Acadêmica

- 1954-59 — Graduado pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo - FMUSP São Paulo, SP
- 1960-62 — Residência no Departamento de Cirurgia do Hospital das Clínicas-FMUSP
- 1962-63 — Estágio de treinamento, Hôpital Necker e estágio de pesquisa na L'Unité de Recherches d'Urology, Paris, França
- 1963 — Estágio de treinamento, Pediatric Urologie, Dr. J. Cendron, Hôpital Saint-Joseph, Paris, França
- 1967 — Estágio de treinamento em Department of Urology, Prof. Kenneth Owens, Saint Mary's Hospital e com Prof. Innes Williams, Hospital of Sick Children, St. Philip's Hospital, London, UK; Department of Urology, Prof. R. Couvelaire, Hôpital Necker, Paris, França; Department of Urology, Prof. W. Gregoir, Hôpital Brugmann, Brussels, Bélgica.
- 1971 — Tese de Doutorado: Tratamento Cirúrgico de Refluxo Vésico-ureteral através da técnica de Gregoir, pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
- 1976 — Tese de Livre-docência: Tratamento Cirúrgico de espículas incontinentes através das técnicas de Leadbetter e Tanagho pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (FMUSP)
- 1986 — Professor Titular da Disciplina de Urologia, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

Cargos Profissionais e Acadêmicos

- Na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
Professor Titular da Disciplina de Urologia (desde 1986)
Coordenador da Comissão de Graduação e Pós-Graduação da Disciplina de Urologia (desde 1991).
Responsável pela Área de Residência Médica em Urologia (desde 1986).
Professor Livre-docente da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (1976)
- No Hospital das Clínicas de São Paulo:
Chefe do Departamento de Cirurgia (desde 2003)
Vice-diretor Clínico (2000-2002)
Membro do Conselho Deliberativo (1999-2002)
Presidente da Comissão de Transplantes de Órgãos e Tecidos (1987 e 1999-2002)
Membro Fundador e responsável pelo Centro da Próstata - CENPRO (desde 1995)
Membro Fundador do Centro de Estudos Prof. Gilberto Menezes de Góes (desde 1985)
Diretor Técnico de Divisão da Saúde - Urologia (1986-1998).
Membro do Conselho Deliberativo (1991).
Membro efetivo do Conselho do Departamento de Cirurgia (1981 e 2002).

- Sociedade Beneficente de Senhoras — Hospital Sírio-Libanês
Membro do Corpo Clínico (desde 1966).
Membro do Conselho Técnico Administrativo (desde 1975).
- Assessor (1982) e Substituto (1983) do Diretor Clínico.
Presidente da Comissão de Credenciamento e Ética Médica e da Comissão para organizar o Corpo Clínico (1983).
Médico Responsável pelo Centro Cirúrgico (1977-1985).
Membro Fundador (1978) e Presidente (1984-1986) do Centro de Estudos e Pesquisas.
- Faculdade de Medicina de Jundiaí
Professor Titular da Disciplina de Urologia (1978-1986)

Atividades Acadêmicas Extracurriculares

- Membro Fundador do Instituto de Urologia de São Paulo, onde desenvolveu atividades ligadas à clínica particular (1965/95).
- Responsável pela organização de cursos, reuniões científicas, simpósios e congressos de nível internacional desde 1967 em Urologia Geral, Uropediatria, Transplante Renal, Oncologia e HPB, Endourologia e Uroneurologia pela Faculdade de Medicina de Jundiaí, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Associação Paulista de Medicina, Sociedade Brasileira de Urologia, Centro de Estudos e Pesquisas do Hospital Sírio-Libanês e ainda de várias organizações internacionais como Confederação Americana de Urología, Sociedad Latinoamericana de Urología Pediátrica, Society of Pediatric Urological Surgeons.
- Criação, organização e desenvolvimento de centros de ensino, pesquisa e assistência na Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, na Faculdade de Medicina de Jundiaí e Sociedade de Beneficência Hospital Matarazzo.
- Orientação na formação de docentes e especialistas pela Faculdade de Medicina de Jundiaí, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Associação Paulista de Medicina, Sociedade Brasileira de Urologia, Centro de Estudos e Pesquisas do Hospital Sírio-Libanês.
- Participação em Congressos, Jornadas, Simpósios e Cursos no Brasil e Exterior como convidado em dezenas de palestras e conferências ao longo da carreira, oficialmente promovidos ou realizados por várias instituições ou organizações tais como: Confederação Americana de Urologia, Sociedad Latinoamericana de Urologia Pediátrica, Sociedad Iberoamericana de Urologia Pediátrica, e em todas as sociedades nacionais sul-americanas e maioria das centro-americanas; American Academy of Pediatrics; European Association of Urology, Société Internationale d'Urologie, Society of Pediatric Urological Surgeons, American Association of Genitourinary Surgeons, Society for Pediatric Urology etc.

Como Professor Visitante

- 1998: Convidado Especial do 51st Annual Meeting of the Urological Society of Australasia
- 1997: Department of Urology, Istanbul University, Istanbul, Turquia
- 1997: Servicio de Urología, Hospital General de México, Cidade do Mexico
- 1996: Johns Hopkins Hospital, Dept. of Urology, EUA
- 1995: Service d'Urologie, Hôpital Édouard Herriot, Lyon, França
- 1995: Klinik für Urologie der Universität Wien, Áustria
- 1992: Service d'Urologie, Hôpital Erasme, Université Libre de Bruxelles, Bélgica
- 1986: Fundación Puigvert, Hospital de la Santa Cruz y San Pablo, Barcelona, Espanha
- 1985: Klinik und Poliklinik, Klinikum Der Johannes - Gutenberg, Universität of Mainz, Alemanha
- 1985: Urological Institute, Johns Hopkins Hospital, Baltimore-EUA
- 1982: Department of Urology, University of Minnesota, EUA
- 1981: Department of Urology, Mayo Medical School, Mayo Graduate School of Medicine, EUA
- 1981: Pediatric Dept., Children's Hospital of Philadelphia, University of Pennsylvania, EUA
- 1981: Children's Hospital - Medical Center, Boston, Massachusetts-EUA
- 1980: "Urology Grand Rounds", Department of Urology, School of Medicine, University of California, EUA
- 1980: Department of Urology, Children's Hospital, National Medical Center, Washington, EUA
- Apresentação de mais de 1.000 trabalhos científicos de sua autoria e/ou co-autoria em várias áreas da Urologia ao longo da carreira.
- Cargos de Direção exercidos nas organizações médicas nacionais e internacionais:
- Société Internationale d'Urologie (SIU) – Delegado Nacional 2002/03
- Society for Pediatric Urological Surgeons (SPUS) – Presidente e organizador do encontro anual 2001/02
- Société Internationale d'Urologie (SIU) - Membro do Corpo Diretivo e Presidente do Comitê de Subespecialidades e Novas Tecnologias (1998-2000)
- Membro do Corpo de Analistas da International Consultation for Urological Diseases (ICUD) (1997-2000)
- Na Confederación Americana de Urología (CAU) – Membro Consultor a partir de 1999; Presidente (1996-98); Presidente Eleito (1994-96); Tesoureiro (1986-94), Presidente do Congresso (1986).
- Na Sociedade Brasileira de Urologia (SBU): Presidente do Comitê Científico do XXV Congresso Brasileiro (1993-95); Editor-Chefe do Jornal Brasileiro de Urologia (1994-97)
- Society for Pediatric Urological Surgeons (SPUS) – Presidente e organizador do encontro anual 1981/1982

Membro Honorário das Seguintes Organizações

- American Urological Association
- Sociedad Chilena de Urología
- Sociedad Argentina de Urología
- Asociación Venezolana de Cirugía Pediátrica
- Sociedad de Urología de Rosario-Argentina

- Sociedad de Urología y Nefrología del Centro
- Confederación Argentina de Urología
- European Society for Pediatric Urology
- Asociación Española de Urología
- Associação Portuguesa de Urologia

Membro Ativo das Seguintes Organizações Nacionais e Internacionais

- Academia Brasileira de Medicina
- Associação Brasileira de Medicina
- Colégio Brasileiro de Cirurgiões
- Associação Médica de São Paulo
- Associação Brasileira de Nefrologia (até 2002)
- French-Brazilian Society of Medicine
- Society of Pediatric Urological Surgeons (SPUS)
- Sociedad Latinoamericana de Urología Pediátrica (SIUP)
- Society for Pediatric Urology (SPU)
- American College of Surgeons (ACS)
- American Academy of Pediatrics (AAP)
- American Urological Association (AUA)
- American Association of Genitourinary Surgeons (AAGUS)
- Society of Genitourinary Reconstructive Surgeons (GURS)
- Association Française d'Urologie
- Societé Belge d'Urologie
- Asociación Panameña de Cirugía Pediátrica

Honrarias

- Diploma de Mérito da American Urological Association, 2001
- Medalla de Mérito da Sociedad Latinoamericana de Urología Pediátrica, 1999
- Medalla Francisco Díaz, da Sociedad Española de Urología, 1995
- Medalha Alfred Jurzykowski, da Academia Nacional de Medicina, 1995
- Mérito Científico, pela Associação Brasileira de Medicina, 1994
- Diploma de Mérito da Associação Médica de São Paulo, 1978

Prêmios

- Mais de 25 prêmios recebidos em congressos na apresentação de trabalhos científicos em diferentes áreas da Urologia.

Editorias e Membro de Conselhos Editoriais

- Editor-Chefe da Current Urology Reports – Brasil (2002)
- Membro do Corpo Editorial da Current Urology Reports, EUA (desde 2000)
- Urology (desde 1994)
- Prostate Cancer and Prostatic Diseases (1999/2002)
- The Prostate (1996-2000)
- Jornal Brasileiro de Urologia (Editor-chefe 1994-1997, conselho editorial desde 1998)
- Jornal Brasileiro de Transplantes – Transplante Renal (1999/2002)
- Acta Urológica Portuguesa (desde 2000)
- Revista Argentina de Urologia (até 20001)
- Publicação de diversos artigos em revistas especializadas, nacionais e internacionais, e vários artigos em livros, no Brasil e exterior.
- Publicação em Anais de mais de 1.000 trabalhos científicos, tendo sido apresentados em eventos no Brasil e Exterior.