

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Medicina de Lisboa**



**Caracterização do ADN Mitocondrial no Estudo Caso-Controllo da  
Infertilidade Masculina**

**Sara Catarina Reis Gomes da Conceição**

**Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses**

**2008**

A impressão desta Dissertação foi aprovada pela Comissão Coordenadora do Conselho Científico da Faculdade de Medicina da Universidade de Lisboa em reunião de 27 de Janeiro de 2009.

**Universidade de Lisboa**  
**Faculdade de Medicina de Lisboa**



**Caracterização do ADN Mitocondrial no Estudo Caso-Controlado da  
Infertilidade Masculina**

**Sara Catarina Reis Gomes da Conceição**

**Mestrado em Medicina Legal e Ciências Forenses**

**Dissertação orientada pelo Professor Doutor António Brehm**

**Co-orientadora Professora Doutora Helena Geada**



Todas as afirmações efectuadas no presente documento são da exclusiva responsabilidade do seu autor, não cabendo qualquer responsabilidade à Faculdade de Medicina de Lisboa pelos conteúdos nele apresentados.



## **Agradecimentos**

Em primeiro lugar gostaria de agradecer ao meu orientador, o Professor Doutor António Brehm, pela oportunidade de efectuar este trabalho de investigação com o grupo do Laboratório de Genética Humana da Universidade da Madeira. Agradeço a todos os membros do laboratório pelo suporte e amizade disponibilizada no decorrer desta dissertação. Um especial agradecimento à Dr<sup>a</sup> Ana Teresa Fernandes e Dr<sup>a</sup> Rita Gonçalves pelo apoio incondicional que me dedicaram e à Doutora Alexandra Rosa por me ter iniciado e orientado na área em que se realizou o estudo.

Em segundo lugar, gostaria de expressar a minha gratidão à Professora Doutora Helena Geada, co-orientadora, pelo auxílio incansável que devotou na execução da presente dissertação.

## Resumo

A escassez de evidências, que suportem uma origem genética para a infertilidade humana, tem fomentado o interesse nos mais variados estudos e abordagens na tentativa de esclarecer a etiologia desta patologia.

Sendo desconhecido qualquer estudo sobre a infertilidade masculina envolvendo o ácido desoxirribonucleico mitocondrial (ADNmt) e o cromossoma Y (Cr Y), surge, neste âmbito, a realização da presente investigação, a qual teve como objectivos: i) investigar a existência de uma associação entre os haplogrupos mitocondriais e a patologia, ii) relacionar os dados da análise do ADNmt com a informação provinda do estudo do cromossoma Y nas mesmas amostras e iii) indagar uma possível influência, benéfica ou prejudicial, da combinação dos haplogrupos do ADNmt com os do cromossoma Y, na fixação do fenótipo da infertilidade masculina.

Deste estudo fizeram parte duas populações do sexo masculino provenientes do Norte de Portugal: uma constituída por 90 indivíduos férteis, considerada a amostra controlo e uma segunda de 122 indivíduos inférteis retratando a amostra caso. As amostras foram analisadas no Laboratório de Genética Humana da Universidade da Madeira (LGH), onde se definiram os seus haplótipos e respectivos haplogrupos através da sequenciação da primeira região hipervariável do ADNmt (HVS-I) e ulterior identificação de mutações na região codificante da molécula.

Os resultados revelaram a ausência de uma associação entre os haplogrupos mitocondriais e a patologia em estudo. No entanto, ficou perceptível uma hipotética influência positiva da combinação do haplogrupo CRS mitocondrial com o haplogrupo R do cromossoma Y na fertilidade masculina. Dos resultados surgiu, também, uma correlação positiva entre a ocorrência de deleções e a frequência do haplogrupo R do cromossoma Y associado a qualquer um dos haplogrupos mitocondriais.

Na população de indivíduos férteis evidenciou-se uma predominância do padrão sem

delecção concomitantemente com uma maior frequência de indivíduos pertencentes ao haplogrupo R. De igual forma, distinguiu-se um padrão coincidente na população de indivíduos inférteis, reforçado pela diminuição peculiar na ocorrência de delecções em dois subgrupos particulares do ADNmit, J/T e U/K, combinada com um aumento na frequência de indivíduos R.

Da análise dos resultados obtidos conclui-se que, embora o fundo genético mitocondrial não seja o principal agente na fixação da patologia poderá, no entanto, influenciá-la quando em conjunto com outros factores, quer genéticos, quer ambientais.

**Palavras-chave:** infertilidade masculina, ADN mitocondrial, cromossoma Y, haplogrupos.

### **Summary**

The scarceness of evidences supporting the role of genetics in male infertility has fomented the interest in wide-ranging studies and approaches in the attempt to clarify the aetiology of this pathology.

So far as we know, no other study addresses male infertility by correlating mitochondrial deoxyribonucleic acid (mtDNA) and the Y chromosome (Y-Cr), hence, the accomplishment of the present investigation which had four objectives: i) to explore the existence of an association between the mitochondrial haplogroups and the pathology, II) to relate the analysis data of the mtDNA with the information from the study of the Y chromosome of same samples and iii) to

investigate a possible influence, beneficial or harmful, of the combination of the mtDNA haplogroups with the Y chromosome haplogroups, in the setting of male infertility phenotype.

This study included two populations proceeding from North of Portugal: one constituted of 90 fertile individuals, considered the sample control and one second of 122 infertile individuals portraying the sample case. The samples were analyzed in the Human Genetics Laboratory of the Madeira University (LGH). Its haplotypes and respective haplogrupos were defined through sequentiation of the first mtDNA hypervariable region (HVS-I) and the later identification of mutations present in the coding region of the molecule.

The results established the absence of an association between the mitochondrial haplogroups and the referent pathology. However, a hypothetical positive influence of the mitochondrial CRS-haplogroup / R-haplogroup of Y chromosome combination in the male fertility was perceivable. Likewise, it was detected a positive correlation between deletions and haplogrupo R of Y chromosome throughout mitochondrial haplogroups.

The population of fertile individuals showed fewer deletions concomitantly with a higher frequency of haplogrupo R individuals. Likewise, a coincident pattern was proven in the infertile population, reinforced by a peculiar reduction in deletions occurrence in two particular subgroups of mtDNA, J/T and U/K, combined with an increase in the frequency of R individuals.

The established results illustrate us that, even though mitochondrial genetic background is not the main agent in the setting of the pathology it might be, however, influential when combined with multiple genetic and environmental factors.

**Keywords:** male infertility, mitochondrial DNA, Y chromosome, haplogroups.

## ABREVIATURAS

- AD** - Alzheimer's Disease (doença de Alzheimer)
- ADN** – Ácido Desoxirribonucleico
- ADNmt** – Ácido Desoxirribonucleico mitocondrial
- ADNn** – Ácido Desoxirribonucleico nuclear
- ARNmt** – Ácido Ribonucleico mitocondrial
- ARNr** – Ácido Ribonucleico ribossomal
- ARNt** – Ácido Ribonucleico de transferência
- ATP** – Adenoside-5'-Triphosphate (trifosfato de adenosine)
- AZF** – Azoospermia Factor Region (factor de azoospermia)
- CR** – Control Region (região controlo do ADN mitocondrial)
- Cr Y** – Cromossoma Y
- CSB I, II, III** – Cockayne Syndrome Group B Gene
- Cytc** – Citocromo c
- DAZ** – Deleted in Azoospermia (deletado em azoospermia)
- DFFRY** – Drosophila Fat-Facets Related Y Gene
- DIDMOAD** - Diabetes insipidus, Diabetes mellitus, Optic atrophy and Deafness
- D-loop** – Displacement loop do ADN mitocondrial
- ETC** – Electron Transport Chain (cadeia de transporte de electrões)
- FBSN** – Familial Bilateral Striatal Necrosis
- H** – Heavy strand (cadeia pesada do genoma mitocondrial)
- HVS-I, II, III** – Hypervariable Sequence I, II, III (região hipervariável 1, 2 e 3 do ADN mitocondrial)
- HVR** – Hypervariable Regions (regiões hipervariáveis do ADN mitocondrial)
- kb** – *kilo* pares de bases
- KSS** – Kearns-Sayre Syndrome
- L** – Light strand (cadeia leve do genoma mitocondrial)
- LHON** - Leber's Hereditary Optic Neuropathy
- Mb** – Mega pares de bases
- MELAS** - Mitochondrial Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-like episodes
- MERRF** – Myoclonic Epilepsy with Ragged-Red Fibers
- MILS** – Maternally Inherited Leigh Syndrome
- MSY** - Male-Specific portion of the Y chromosome (região com especificidade masculina)
- NADH** – Reduced Nicotinamide Adenine Dinucleotide (forma reduzida do dinucleótido de nicotinamida-adenina)
- NARP** - Neuropathy, Ataxia and Retinitis Pigmentosa
- NR1** - NonRecombining portion of the Y Chromosome (região não recombinante do

cromossoma Y)

**NUMTs** – Nuclear Insertions of Mitochondrial Sequences

**OH** – Origin of replication of the heavy strand of mtDNA (ponto de origem da cadeia pesada)

**OXPHOS** – Oxidative Phosphorylation (fosforilação oxidativa)

**PAR1/PAR2** - Pseudoautosomal Regions 1, 2 (regiões pseudo-autossômica 1 e 2 do cromossoma Y)

**pb** – par de bases

**PCR** – Polimerase Chain Reaction (reação em cadeia da polimerase)

**PD** - Parkinson's Disease (doença de Parkinson)

**PEO** – Progressive External Ophthalmoplegia

**RBM** – RNA Binding-Motif

**rCRS** – Revised Cambridge Reference Sequence (sequência de referência de Cambridge revista)

**RFLP** – Restriction Fragment Length Polymorphism (polimorfismos de tamanho dos fragmentos de restrição)

**ROS** - Reactive Oxygen Species (espécies de oxigênio reativas)

**SINEs** - Short Interspersed Elements (sequências repetitivas curtas)

**SNPs** – Single Nucleotide Polymorphisms (polimorfismos de substituição de um único nucleótido)

**TAS** – Telomere-Associated Sequences (sequências associadas aos telómeros)

**TCA** - Tricarboxylic Acid Cycle (ciclo tricarbóxico)

**UEPs** - Unique Event Polymorphisms (polimorfismos de evento único)

**Yp** – Y-chromosome short arm (braço curto do cromossoma Y)

**Yq** – Y-chromosome long arm (braço longo do cromossoma Y)

# ÍNDICE GERAL

## ÍNDICE DE FIGURAS

## ÍNDICE DE TABELAS

## I. INTRODUÇÃO

### 1.1. A MITOCÔNDRIA

### 1.2. GENOMA MITOCONDRIAL

#### 1.2.1. Estrutura e Organização

#### 1.2.2. Características Particulares

##### *1.2.2.1. Herança matrilinea*

##### *1.2.2.2. Ausência de recombinação*

##### *1.2.2.3. Elevada taxa mutacional*

##### *1.2.2.4. Baixo tamanho efectivo populacional*

##### *1.2.2.5. Segregação replicativa*

##### *1.2.2.6. Homoplasmia versus heteroplasmia*

##### *1.2.2.7. Mutações somáticas relacionadas com a idade*

### 1.3. O ADN MITOCONDRIAL COMO MARCADOR GENÉTICO

#### 1.3.1. Haplogrupos do ADN Mitocondrial

##### 1.3.1.1. Haplogrupos europeus

#### 1.3.2. Discriminação dos Haplótipos da Região HVS-I

#### 1.3.3. ADN Mitocondrial e Estudos Filogenéticos

### 1.4. ADN MITOCONDRIAL E A PATOLOGIA

#### 1.4.1. Mutações do ADN Mitocondrial

### 1.5. ADN MITOCONDRIAL E A INFERTILIDADE MASCULINA

1.5.1. Mutações Mitocondriais

1.5.2. Haplogrupos Mitocondriais

1.6. O CROMOSSOMA Y

1.6.1. Características Particulares

1.7. O CROMOSSOMA Y COMO MARCADOR GENÉTICO

1.7.1. Estudos Filogenéticos e o Cromossoma Y

1.8. O CROMOSSOMA Y E A INFERTILIDADE MASCULINA

1.8.1. Haplogrupos do Cromossoma Y

OBJECTIVOS DA PRESENTE INVESTIGAÇÃO

## **II. MATERIAIS E MÉTODOS**

2.1 Amostra Populacional

2.2. Metodologia Experimental

2.2.1. Extracção de ADN

2.2.2. Estudo do ADN mitocondrial

2.2.2.1. Estudo da região controlo (HVS-I)

- Amplificação

- Determinação grau de pureza

- Purificação dos produtos de amplificação

- Sequenciação automática

2.2.2.2. Estudo da região codificante

- Metodologia

2.2.2.3. Classificação filogenética

2.2.3. Estudo do cromossoma Y

## 2.3. Análise Estatística

### **III. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

#### 3.1. Estudo do ADN Mitocondrial

##### 3.1.1. Região HVS-I

##### 3.1.2. Região codificante

##### 3.1.3. Distribuição dos haplogrupos

#### 3.2. Associação da Infertilidade Masculina com os Haplogrupos Mitocondriais

##### 3.2.1. Haplogrupo U e a infertilidade masculina

#### 3.3. Associação da Infertilidade Masculina com os Haplogrupos do Cromossoma Y

#### 3.4. Associação da Infertilidade Masculina com Haplogrupos Mitocondriais e do Cromossoma Y: Cruzamento de Dados.

#### 3.5. Associação do Padrão DAZ com a Infertilidade

### **IV. CONCLUSÕES**

### **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1. Estrutura interna da mitocôndria revelada pelo método de fluorescência.

Figura 1.2. Esquema ilustrativo da cadeia respiratória..

Figura 1.3. O genoma mitocondrial humano.

Figura 1.4. Divisão da região controlo do ADN mitocondrial.

Figura 1.5. Árvore simplificada dos principais haplogrupos com especificidade continental.

Figura 1.6. Árvore filogenética simplificada dos haplogrupos típicos europeus.

Figura 1.7. Árvore filogenética simplificada exibindo os principais haplogrupos.

Figura 1.8. Trajecto migratório dos haplogrupos do ADN mitocondrial.

Figura 1.9. Mapa do genoma mitocondrial humano e respectivas patologias.

Figura 1.10. Representação esquemática do cromossoma Y.

Figura 1.11. Distribuição mundial dos haplogrupos do cromossoma Y.

Figura 1.12. Árvore filogenética simplificada dos haplogrupos do cromossoma Y.

Figura 1.13. Reconstrução esquemática da origem e dispersão mundial do super-haplogrupo F-M89 do cromossoma Y

Figura 1.14. Localização dos DAZ – SNVs e STSs

Figura 2.1 Sequência da região HVS-I da sequência de referência CRS

Figura 2.2. Comparação de electroferogramas.

Figura 2.3. Polimorfismos da região codificante utilizados na caracterização dos haplogrupos dos indivíduos em estudo.

Figura 2.4. Filogenia dos cromossomas Y das amostras analisadas

Figura 3.1. Distribuição das frequências haplotípicas do ADN mitocondrial na população de indivíduos férteis.

Figura 3.2. Distribuição das frequências haplotípicas do ADN mitocondrial na população de indivíduos inférteis

Figura 3.3. Distribuição das frequências haplotípicas do ADN mitocondrial na população do Norte de Portugal

Figura 3.4. Distribuição dos haplogrupos mitocondriais na população caso inférteis e controlo férteis.

Figura 3. 5. Distribuição dos sub-haplogrupos U nas populações de férteis e inférteis.

Figura 3.6. Distribuição dos haplogrupos do cromossoma Y na população de indivíduos férteis.

Figura 3.7. Distribuição dos haplogrupos do cromossoma Y na população de indivíduos inférteis.

Figura 3.8. Comparação dos haplogrupos do cromossoma Y entre a população de indivíduos férteis e inférteis.

Figura 3.9. Distribuição dos haplogrupos Y pelo haplogrupo H mitocondrial.

Figura 3.10. Distribuição dos haplogrupos Y pelo haplogrupo H\* (H + CRS) mitocondrial.

Figura 3.11. Distribuição dos haplogrupos Y pelo super-haplogrupo J/T mitocondrial.

Figura 3.12. Distribuição dos haplogrupos Y pelo super-haplogrupo U/K mitocondrial.

Figura 3.13. Distribuição do padrão DAZ com e sem deleção na população de indivíduos férteis em relação aos haplogrupos mitocondriais.

Figura 3.14. Distribuição do padrão DAZ com e sem deleção na população de indivíduos inférteis em relação aos haplogrupos mitocondriais.

Figura 3.15. Frequências do padrão de DAZ com e sem deleção pelas populações de indivíduos férteis e inférteis.

Figura 3.16. Frequência do haplogrupo R pelas populações de indivíduos férteis e inférteis.

Figura 3.17. Distribuição do padrão de DAZ sem deleção para cada haplogrupo mitocondrial individualmente.

Figura 3.18. Distribuição do padrão de DAZ com deleção para cada haplogrupo mitocondrial.

Figura 3.19. Distribuição do padrão DAZ com e sem deleção dentro de cada haplogrupo mitocondrial na população de indivíduos inférteis

Figura 3. 20. Distribuição do haplogrupo R dentro de cada haplogrupo mitocondrial na população de inférteis.

Figura 3.21. Distribuição do padrão DAZ com e sem deleção dentro de cada haplogrupo mitocondrial na população de indivíduos férteis.

Figura 3. 22. Distribuição do haplogrupo R dentro de cada haplogrupo mitocondrial na população de inférteis.



## ÍNDICE DE TABELAS

Tabela 1.1 Variantes de ADNmt definidas por Digestão com Enzimas de Restrição.

Tabela 1.2. Polimorfismos da Região Codificante da Molécula de ADN Mitocondrial definidores dos Haplogrupos Mitocondriais

Tabela 1.3 Patologias Associadas aos Haplogrupos Mitocondriais.

Tabela 2.1. Sequências dos Primers utilizados para a Região Codificante

Tabela 2.2. Haplogrupos do Cromossoma Y e Padrões de DAZ dos Inférteis

Tabela 2.3. Haplogrupos do Cromossoma Y Padrões de DAZ dos Férteis

Tabela 3.1. Haplótipos Mitocondriais e respectivos Haplogrupos dos Indivíduos Férteis

Tabela 3.2. Haplótipos Mitocondriais e respectivos Haplogrupos dos Indivíduos Inférteis

Tabela 3.3. Valores de Probabilidade para o Teste  $X^2$  da comparação entre os Pares de Populações

Tabela 3.4. Valores de Probabilidade para o Teste de  $X^2$  resultante da comparação das Populações Caso e Controlo com as Populações do Norte de Portugal

Tabela 3.5. Valores de Probabilidade após correcção de Bonferroni

Tabela 3.6. Valores de Probabilidade para o Teste de  $X^2$  da Comparação entre Indivíduos Férteis e Inférteis dos Sub-Haplogrupos de U

Tabela 3.7. Resultados do Teste de Associação entre os Haplogrupos do Cromossoma Y e o Risco de Infertilidade.

Tabela 3.8. Valores de Probabilidade para o Teste de Fisher da comparação dos Haplogrupos do Cromossoma Y pelos Haplogrupos Mitocondriais em separado entre a População Caso e Controlo

Tabela 3.9. Resultados do Teste de Associação entre os Haplogrupos do Cromossoma Y e o Risco para a Infertilidade dentro do Haplogrupo Mitocondrial CRS

Tabela 3.10. Valores de Probabilidade para o Teste de  $X^2$  da comparação entre o Padrão DAZ com e sem deleção e os Haplogrupos Mitocondriais entre a População de Indivíduos Férteis e Inférteis

Tabela 3.11. Resultados da Associação entre os Grupos Filogenéticos Mitocondriais e o Padrão de DAZ com e sem deleção no Risco para a Infertilidade

Tabela 3.12. Valor de Probabilidade para o Teste de  $X^2$  entre o Padrão DAZ com e sem deleção na População de Inférteis



# Introdução

---

# CAPÍTULO I

## I.INTRODUÇÃO

A infertilidade, problema que tem vindo a ocupar um lugar de destaque no leque de preocupações da população humana, tem sido objecto de extensos estudos, visto impossibilitar a concretização de um desejo básico suportado pelo instinto natural, o ter filhos. Este problema atinge proporções incapacitantes na ordem dos 10%-15% dos casais, dos quais sensivelmente metade é atribuída aos homens (Moore & Reijo-Pera 2000).

A antiga tradição de relacionar patologias raras com alterações severas no genoma mitocondrial subsiste, embora vindo a sofrer alterações com o crescente número de estudos nos últimos anos. Do interesse em conhecer o poder das variantes do ADNmt no risco de doenças comuns surgiram dois campos de acção. O primeiro concentra-se na identificação de possíveis mutações patogénicas responsáveis, pelo menos parcialmente, por diversas patologias. O segundo, tem como base estudos populacionais, avocando a capacidade de algumas substituições no genoma mitocondrial actuarem, isoladas ou em conjunto, como factores de risco para a patologia.

O papel da genética na infertilidade masculina é ainda controverso devido à escassez de evidências susceptíveis de o confirmar. Contudo, a investigação prossegue baseada, sobretudo, num processo de discriminação (*screening*) de mutações em genes candidatos.

Um dos principais determinantes da infertilidade masculina respeita ao défice funcional dos espermatozóides humanos imposto pelo decréscimo na função motora. Esta faculdade depende, completamente, da capacidade funcional da cadeia de transferência de electrões (ETC) envolvendo o processo de fosforilação oxidativa (OXPHOS), daí a importância do metabolismo mitocondrial na mobilidade dos espermatozóides (Ford & Harrison 1981; Halangik *et al.* 1985; Pascual *et al.* 1996; Ruiz-Pesini *et al.* 1998).

Actualmente, é sabido que algumas das características do ADNmt, como a rápida replicação (Clayton *et al.* 1974; Fukunaga *et al.* 1979) e a ausência de mecanismos de reparação de erros e de proteínas protectoras, justificam a alta taxa de mutações verificada neste genoma extranuclear (Clayton *et al.* 1974). Cumulativamente, o facto de ser transmitido, unicamente, por via materna gera uma assimetria no processo de selecção natural passando a ocorrer apenas nas mulheres (Moore & Reijo-Pera 2000). As mutações com efeitos deletérios tendem, assim, a ter maior expressividade nos indivíduos do sexo masculino (Frank & Hurst, 1996).

Toda uma panóplia de doenças humanas, desde o foro degenerativo e do envelhecimento até à infertilidade, tem sido associada à ocorrência de diversas mutações no genoma mitocondrial (Taylor & Thurnbull, 2005; Wallace, 1999). Ao longo destes últimos anos, alguns estudos evidenciam uma associação positiva entre determinadas deleções no ADNmt, nomeadamente, as deleções de 4.977 pares de bases (pb), 7.345 pb e 7.599 pb, e um declínio motor dos espermatozóides e, conseqüentemente, à infertilidade (Kao *et al.*, 1995, 1998).

O mesmo se verifica para o cromossoma Y, alvo de frutíferos estudos no âmbito da infertilidade genética nos homens, dos quais surgiram três genes candidatos responsáveis por tal incapacidade localizados na região do factor azoospérmico (AZF): o gene deletado em azoospermia (DAZ) (Reijo *et al.*, 1995, 1996; Pryor *et al.*, 1997); o “RNA Binding-Motif” (RBM) (Ma *et al.*, 1993; Elliott & Cooke, 1997) e o gene “Drosophila Fat-Facets Related Y” (DFFRY) (Brown *et al.* 1998), cujas deleções ocorrem com maior incidência em homens azoospérmicos e oligoospérmicos.

Não obstante estas evidências sustentarem a existência, quer ao nível do ADNmt, quer do Cr Y, de uma associação entre a ocorrência de múltiplas deleções e um défice na função motora dos espermatozóides levando ao decréscimo da fertilidade masculina, é um facto que, mesmo com uma baixa incidência, algumas dessas deleções ocorrem, simultaneamente, em indivíduos férteis, sugerindo pois, a existência de outros factores viáveis no estabelecimento

desta disfunção humana. Ao averiguar-se uma possível correlação genética entre a variabilidade do ADNmt e a mobilidade dos espermatozóides, recorrendo aos haplogrupos mitocondriais já caracterizados e fundados em polimorfismos filogenéticos (Ruiz-Pesini *et al.*, 2000), algumas evidências sugerem que um fraco fundo genético, provavelmente provocado, quer por uma maior sensibilidade intrínseca na produção de energia, quer por uma reacção diferencial a factores ambientais ou interacções genéticas, poderá predispor à infertilidade masculina (Ruiz-Pesini *et al.* 2000).

Após variados estudos corroborando ou refutando associações entre os haplogrupos e as patologias, torna-se cada vez mais evidente que o poder modificador no risco de uma patologia resulta, maioritariamente, da acção sinérgica de um grupo de polimorfismos distintos ao invés do efeito de um único polimorfismo. Deste modo, a caracterização do haplogrupo torna-se num poderoso instrumento capaz de nos fornecer indicações sobre os factores genéticos suspeitos de modularem o fenótipo da infertilidade.

Pretende-se, no presente estudo, averiguar numa amostra populacional portuguesa, a possível ocorrência de um fundo genético mitocondrial bem definido, passível de entrar em conflito intergenómico na presença de um cromossoma Y masculino mutado em regiões associadas à infertilidade, que faculte informação sobre a base etiológica da infertilidade masculina.

## 1.1. A MITOCÔNDRIA

As mitocôndrias são organelos citoplasmáticos semi-autônomos, omnipresentes nas células eucariotas, que, por participarem na produção de energia através da OXPHOS, tornam-se essenciais à sua sobrevivência (Chan, 2006; Wallace, 2007) (Figura 1.1). Fruem da habilidade de converter energia em formas passíveis de serem utilizadas em diversos processos metabólicos intracelulares, incumbindo-lhes, assim, como função primária, a provisão de substratos energéticos, como trifosfato de adenosina (ATP) e apoio na respiração aeróbia. Suportam ainda outros processos metabólicos, incluindo o ciclo de Krebs, a B-oxidação, a síntese lipídica e do colesterol e o metabolismo de aminoácidos e esteróides (Chinnery, 2006). É provável que estas estruturas intracelulares com dupla membrana, embora consideradas como pequenos organelos isolados dentro da célula, formem sistemas de ligação realmente complexos. A considerável área na superfície da membrana mitocondrial interna acomoda a cadeia respiratória e as enzimas sintase de ATP, envolvidas no processo de fosforilação oxidativa. Já a matriz mitocondrial, para além das enzimas activas na oxidação do piruvato, de ácidos gordos e de ácido tricarboxílico (TCA), alberga diversas cópias do ADNmt idênticas, ribossomas mitocondriais, ácido ribonucleico de transferência (ARNt) e enzimas necessárias para a transcrição e tradução dos genes mitocondriais (Alberts et al., 1994).

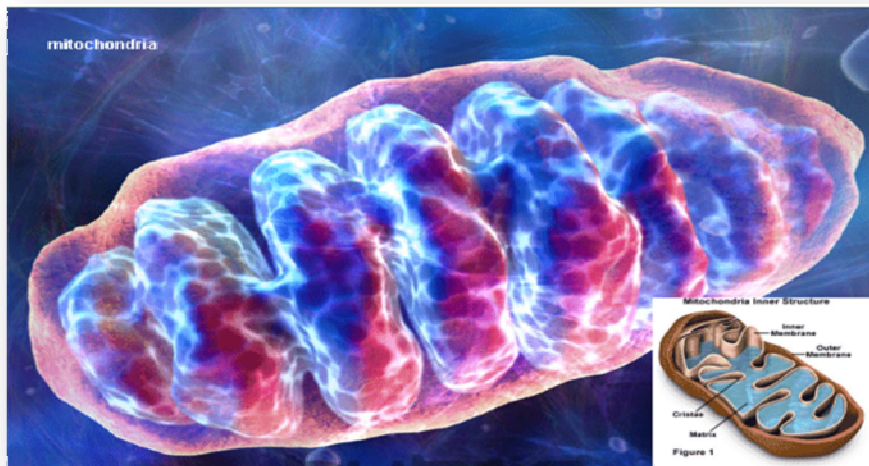


Figura 1. 1. Estrutura interna da mitocôndria revelada pelo método de fluorescência. Figura transcrita de Rosa A. (2007).

Com o propósito de produzir energia sob a forma de ATP e calor, a mitocôndria oxida o hidrogênio proveniente da nossa dieta de hidratos de carbono e gordura. Os cinco complexos envolvidos na OXPHOS compreendem cerca de 85 unidades que se situam na membrana interna mitocondrial (Figura 1.2). Dois elétrons doados ao complexo I pela dinucleótido de nicotinamida-adenina (NADH), ou ao complexo II pelo succinato são transferidos, através da coenzima Q, ao complexo II cedendo-os por sua vez ao citocromo c (Cyt c). São por fim transferidos para o complexo IV, que a partir de  $\frac{1}{2} O_2$  produz  $H_2O$ . A energia ocasionada por este fluxo de elétrons é, então, empregue no bombeamento de prótons para o espaço intermembranar da matriz mitocondrial através dos complexos I, III e IV (Mitchell, 1976). Cria-se uma diferença de potencial ao longo da membrana interna, útil na produção de ATP, à medida que os prótons voltam para a matriz através do complexo V. A conjugação entre a diferença de potencial e a produção de ATP define a eficácia do sistema (DiMauro & Bonilla 1997; Wallace, 1997).

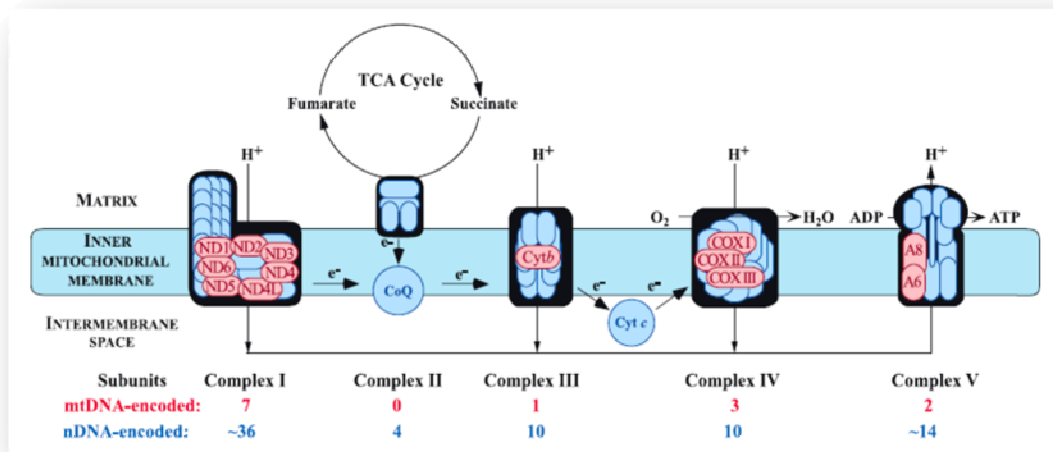


Figura 1. 2. Esquema ilustrativo da cadeia respiratória. Os componentes da cadeia de transporte de electrões envolvida no processo de fosforilação oxidativa estão localizados na membrana mitocondrial interna. A cadeia respiratória é composta por quatro complexos enzimáticos: **Complexo I** (NADH-ubiquinona oxidorredutase), **Complexo II** (succinato-ubiquinona oxidorredutase), **Complexo III** (ubiquinol-citocromo c redutase) e **Complexo IV** (citocromo c oxidase), e dois transportadores de electrões (ubiquinona e citocromo c). Figura transcrita de DiMauro (2004).

As mitocôndrias têm contribuído, de uma forma notável, na evolução dos animais, sendo comumente aceite a teoria de que surgiram, aproximadamente há 1.5 mil milhões de anos, como bactérias endossimbióticas absorvidas por células protoeucariotas, com quem mantinham uma relação simbiótica permutando energia por um ambiente estável e seguro (Margullis, 1975). Este passado procariota explicaria as semelhanças entre determinadas características do genoma mitocondrial e as bactérias modernas, bem como a existência de um genoma próprio responsável pela codificação de algumas das suas proteínas (Finnila, 2000).

## 1.2. GENOMA MITOCONDRIAL

Desde a sua origem que o ADNmt tem vindo a perder a maioria dos seus genes, e

consequentemente, a sua autonomia, tornando-se fortemente dependente dos genes nucleares. O genoma mitocondrial humano consiste em 1.500 genes (Gibson, 2005; Wallace, 2005), 37 codificados pelo ADNmt herdado via materna e os restantes codificados no ADN nuclear (ADNn) (Shoubridge, 2001; Ryan & Hoogenraad, 2007). Do conjunto de 37 genes que presentemente ostenta, todos manifestam funções na OXPHOS ou na síntese proteica. Os demais genes, essenciais à correcta manutenção do sistema mitocondrial, como os responsáveis pela codificação da polimerase do ADNmt, da polimerase do ARN mitocondrial (ARNmt) e vários outros a cargo da codificação de proteínas estruturais e de transporte, situam-se no genoma nuclear. A análise do genoma nuclear revela a existência de mais de 600 inserções nucleares (NUMTs) de sequência do genoma mitocondrial (25 vezes a própria molécula de ADNmt) (Olson & Yoder, 2002; Tourmen et al., 2002; Bensasson et al., 2003, Mishmar et al., 2004; Ricchetti et al., 2004; Hazkani-Covo & Graur, 2007), sugerindo que, acumulativo à transferência de genes, em diversos estádios da nossa recente história evolutiva deu-se, de forma semelhante, a inserção de vários segmentos do ADNmt no genoma nuclear. Tais processos de transferência e inserção parecem ser continuados e responsáveis pelo rearranjo dos genomas nucleares (Bensasson et al., 2001; Ricchetti et al., 2004). O proteoma mitocondrial moderno resulta então, de ambos os processos de redução e expansão, através dos quais, diversos genes mitocondriais ancestrais foram simplesmente desviados e eliminados (Karlberg et al., 2000; Andersson et al., 2003). Todavia, tal declínio terá sido contrabalançado por um abastecimento proveniente do citosol (Andersson et al., 1998; Berg & Kurland 2000).

### **1.2.1. Estrutura e Organização**

O ADN mitocondrial humano é uma molécula circular pequena, de dupla cadeia, com 16.569 pb, muito compacta e ostentando um conteúdo irrisório de repetições (Figura 1.3). Possui duas regiões com propriedades evolutivas dissemelhantes, sendo a maior (superior a

90% do total), uma região codificante usada como molde para a síntese de genes mitocondriais e onde a taxa de mutação é, aproximadamente, cinco vezes superior à do genoma nuclear. Codifica 13 polipéptidos envolvidos na ETC, 22 ARNt e dois ARNr (12S e 16S), essenciais à síntese proteica (Anderson et al., 1981). O ADNn codifica até 200 factores necessários para a manutenção e expressão do ADNmt, ou na formação dos complexos proteicos envolvidos na OXPHOS. Eventuais mutações nestes genes nucleares podem induzir distúrbios, com características fenotípicas, observadas nas patologias mitocondriais (Liang & Wong, 1998; Luoma et al., 2004; Zeviani & Carelli, 2007).

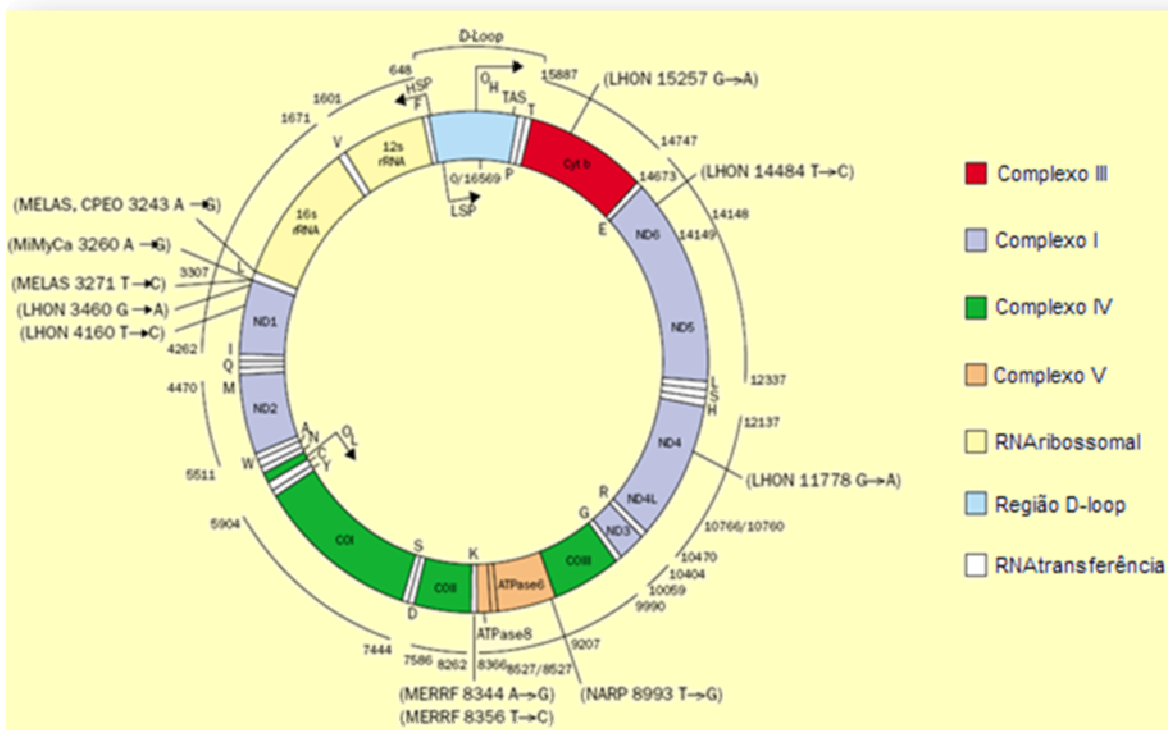


Figura 1. 3. O genoma mitocondrial humano. A molécula de ADNmt codifica 13 subunidades dos complexos da cadeia respiratória: sete subunidades do complexo I (ND1-6 e 4L), o citocromo b (Cyt b) do complexo III, as subunidades COX I-III da citocromo oxidase ou complexo IV e as subunidades ATPase 6 e 8 da sintase ATP. O ADNmt codifica ainda os genes de ARNr 12S e 16S bem como o ARNt 22. As abreviaturas dos nomes dos aminoácidos indicam os genes ARNt correspondentes. A cadeia externa e interna correspondem à cadeia pesada e leve de ADN respectivamente. As abreviaturas ori H e ori L equivalem as origens de replicação de ambas as cadeias pesada e leve. Figura adaptada de Leonard & Schapira, (2000).

A segunda região, designada por região controlo (CR) ou D-loop (*Displacement loop*), abrange cerca de 1.122 pb, compreendidos entre os nucleótidos 16024 e 576, com elementos reguladores nos processos de replicação e transcrição (Lightowers et al., 1997), os promotores

das cadeias leve (L) e pesada (H), o ponto de origem para a replicação da cadeia pesada (OH), três grupos de sequências conservadoras (CSBI, II e III) e as sequências de terminação associadas (TAS). Os múltiplos pontos de origem parecem estar relacionados com distintos modos de replicação, nomeadamente, a manutenção do ADNmt em determinadas condições como resposta a exigências fisiológicas (Coskun et al., 2003). É uma zona não codificante e divide-se em três regiões (Figura 1.4), comportando sequências altamente variáveis em relação ao resto do genoma, os segmentos hipervariáveis (HVS-I, HVS-II e HVS-III), igualmente conhecidos por regiões hipervariáveis (HVR) (Brandstatter et al., 2004). Não obstante a ténue definição dos limites dos segmentos da região hipervariável, a diversidade de polimorfismos existentes, tornou-a num alvo atractivo para estudos de variabilidade genética. A primeira sequência mitocondrial completamente caracterizada (Anderson et al., 1981), numa fase posterior revista por Andrews e colaboradores (1999), ficou conhecida por Sequência de Referência de Cambridge, (rCRS), e é profusamente utilizada na identificação dos vários haplótipos mitocondriais existentes na população humana. De todo o genoma mitocondrial, a região controlo é a que apresenta maior variabilidade, concentrando os locais mais polimórficos em dois segmentos em particular, a região HVS-I e a região HVS-II (Wilkinson-Herbots et al., 1996).

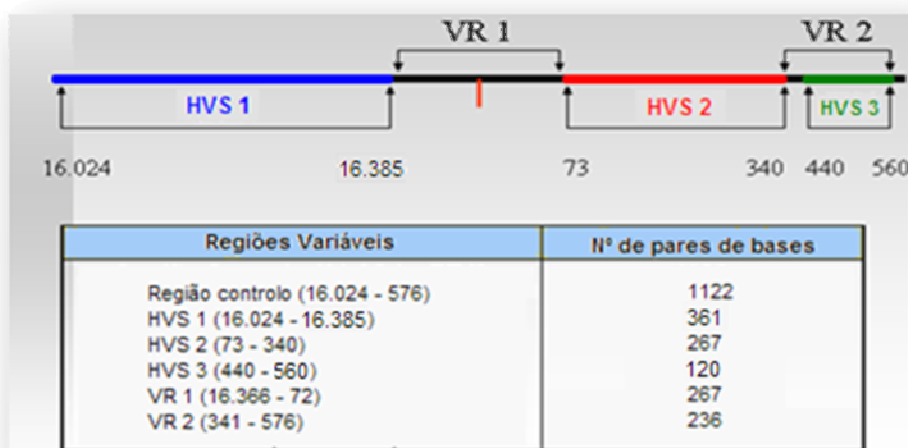


Figura 1. 4. Divisão da região controlo do ADN mitocondrial. Figura adaptada de Sant'Ana & Alves (2005).

Cada mitocôndria compreende uma ou mais cópias do genoma mitocondrial, variando consoante o tipo celular onde se encontra, do tamanho e, conseqüentemente, da energia necessária e exigida para a função determinada. Tecidos cujo consumo de energia atinge níveis expressivos, como o muscular, o cardíaco, o renal, o cerebral e o tecido germinal, apresentam milhares de mitocôndrias, cada uma delas com duas a dez cópias do genoma mitocondrial no seu citoplasma. As estimativas indicam a presença de 1.000 a 10.000 moléculas de ADNmt nas células somáticas (Lightowers et al., 1997). Na linha germinativa, os oócitos maduros ostentam um número médio de 200.000 moléculas de ADNmt (Chen et al., 1995a; Steuerwald et al., 2000; Reynier et al., 2001; Santos et al., 2006), enquanto nas células espermáticas reduz-se a um modesto número de 50 a 75 mitocôndrias, reflectindo-se em 50 a 1.200 moléculas de ADNmt (Diez-Sanchez et al., 2003).

### **1.2.2. Características Particulares**

O genoma mitocondrial tem sido um instrumento de primazia, preponderando em estudos genéticos, quer na reconstrução de eventos evolutivos, quer na análise da própria variabilidade, e em possíveis associações com uma variedade de patologia humanas, desde degenerativas e envelhecimento até à infertilidade (Folgero et al., 1993; Wallace, 1995). Esta influência fundamenta-se em determinadas qualidades exclusivas do seu genoma, originadas, em parte, pela sua localização citoplasmática e a sua quantidade expressiva de cópias.

#### *1.2.2.1. Herança matrilinea*

Toda a informação genética mitocondrial contida no citoplasma do óvulo é herdada, exclusivamente, por via materna (Giles et al., 1980; Stoneking, 1994; Stoneking & Soodyall, 1996; Wallace et al., 1999). Por esta ocasião, sobrevém uma assimetria no processo de selecção natural sobre o ADNmt mutado herdado via materna, que não afectando a fitness dos

homens, poderá vir a atingir frequências expressivas (Frank & Hurst, 1996). Mesmo perante a eventualidade de mistura das moléculas de ADNmt maternas e paternas durante a fertilização, a contribuição deste último para o zigoto seria diminuta dada a diferença no carregamento de moléculas de ADNmt presente nos oócitos e espermatozóides (Michaels et al., 1982; Diez-Sanchez et al., 2003). Adicionalmente, sugere-se a existência de um sistema activo nos primeiros estádios da embriogénese visando a eliminação, por um processo de ubiquinação da célula espermática, de eventuais moléculas de ADNmt paternas (Hopkin, 1999; Sutovsky et al., 2004). Não obstante à possibilidade de uma invasão de moléculas de ADNmt paternas, como consequência de uma deficiente qualidade dos oócitos (St. John et al., 2004), ou da disfunção no sistema de destruição do ADNmt paterno (Schwartz & Vissing, 2002), não existe quaisquer evidências suportando esta eventualidade em condições normais.

#### *1.2.2.2. Ausência de recombinação*

O ADN mitocondrial não troca genes com os demais segmentos genómicos, ou seja, não se recombina como os cromossomas nucleares (Olivo et al., 1983; Merriwether et al., 1991; Stoneking, 1994; Stoneking & Soodyall, 1996; Wallace et al., 1999), transmitindo-se às gerações seguintes sob a forma de blocos de genes designados por haplótipos. Estes haplótipos conservam-se inalterados nas linhagens maternas, alcançando dezenas de gerações no passado, até um ancestral comum. Este carácter privativo, que é a ausência de recombinação, tem sido alvo de muitos estudos e controvérsia, pois, perante a possibilidade do contrário se observar, a correcta caracterização de uma árvore genealógica torna-se pouco verosímil abalando as já elaboradas reconstruções evolutivas humanas. Contudo, estudos recentes exprobram tal casualidade, refutando qualquer evidência de recombinação no ADNmt (Jorde & Bamshad, 2000; Kumar et al., 2000; Kivisild & Villems, 2000; Ingman et al., 2000;

Wallis, 2000; Elson et al., 2001; Parsons & Irwin, 2000; Piganeau & Eyre-Walker, 2004). Apesar das mitocôndrias apresentarem toda a maquinaria necessária à recombinação (Thyagarajan et al., 1996), esta só poderia ocorrer entre diferentes haplótipos dentro do mesmo indivíduo, ou seja, numa situação de heteroplasmia, uma vez que num estado de homoplasmia, os ADNmt não difeririam do original (Pakendorf & Stoneking, 2005). No entanto, na eventualidade de processos de recombinação, por ser um fenómeno extremamente raro, parece não conseguir afectar os diversos estudos populacionais (Bandelt et al., 2005a; Sato et al., 2005).

### 1.2.2.3. *Elevada taxa mutacional*

O ADN mitocondrial apresenta uma taxa de mutação, quer espontânea, quer induzida por agentes físicos ou químicos, 10 a 100 vezes superior à do genoma nuclear (Pesole et al., 1999; Ingman & Gyllensten, 2001; Hudson et al., 2005), permitindo uma contínua produção de novos alelos (Rand, 2001). A inexistência de fenómenos de recombinação fomenta a sua persistência, mesmo quando semideletérios, conduzindo a uma situação de associação não aleatória entre os genes e, conseqüentemente, à ineficácia da selecção natural (Lynch & Blanchard, 1998). Quando comparado com o ADNn, sobressaem alguns supostos responsáveis por este carácter particular do ADNmt, como a inexistência de um sistema de reparação (*proofreading*) adequado e eficiente (Clayton et al., 1974; Shadel & Clayton, 1997); a ausência de um sistema protector como as histonas, subjugando o ADNmt a circunstâncias de maior susceptibilidade às mutações (Bogehagen, 1999); a inexistência de um processo de replicação célere (Clayton et al., 1974; Fukunaga et al., 1979) mantendo o genoma mitocondrial na condição vulnerável de cadeia simples por tempo em demasia e a actividade na produção de energia que fomenta a sua exposição a uma alta concentração de radicais livres mutagénicos provocando variados erros metabólicos, cuja frequência, por sua vez, é dilatada pelo fenómeno natural e espontâneo da mutação (Allen, 1996). Na própria molécula de ADNmt as taxas de mutação variam, de forma significativa, entre as várias regiões bem como

entre os diversos nucleótidos (Wakeley, 1994; Macaulay et al., 1997; Hasegawa et al., 1998; Finnila et al., 2001; Mishmar et al., 2003; Coble, 2004; Kivisild et al. 2006).

#### *1.2.2.4. Baixo tamanho efectivo populacional*

Como resultado do sistema haplóide e da transmissão matrilinea, o ADNmt apresenta um tamanho efectivo populacional de 1/4 em relação ao genoma nuclear. Por conseguinte, as mutações mitocondriais manifestam maior sensibilidade aos processos de deriva genética e de efeito gargalo (*bottleneck*) que as mutações nucleares (Birky et al., 1983). Para além disso, as alterações nas frequências alélicas são determinadas, primeiramente, pelo fenómeno de deriva genética em vez da selecção natural quando o produto do coeficiente entre o tamanho efectivo populacional e a última é menor que um. Os efeitos aleatórios sobrepõem-se aos da selecção (Hedrick, 1970), tornando menos eficiente a selecção natural na remoção de mutações deletérias do genoma mitocondrial.

#### *1.2.2.5. Segregação replicativa*

Existem milhares de moléculas por célula e milhões por indivíduo. Para a maioria das moléculas, a sua sequência será idêntica, homoplasma. A coexistência de moléculas de ADNmt selvagem e mutante em diversas proporções, heteroplasma, caracteriza as variadas patologias mitocondriais. (Poulton et al., 1998). Durante a divisão celular, incluindo a oogénese, as mitocôndrias são segregadas aleatoriamente, isto é, as moléculas selvagens e variantes são partilhadas pelos oócitos de forma casual, criando um padrão de heteroplasma ao longo da população de oócitos. Apesar do número expressivo de cópias de ADNmt nos oócitos maduros e o módico número de divisões celulares na linha germinativa feminina, as sequências variantes segregam rapidamente entre gerações (Poulton et al., 1998) por fenómenos de efeito gargalo. Apenas uma fracção diminuta da população de 150.000

moléculas de ADNmt presentes nos oócitos humanos é transmitida durante a oogénese, e subsequentemente, ao embrião. As estimativas para o número de unidades segregadas são, consideravelmente inferiores ao número de moléculas de ADNmt na célula, indiciando a ocorrência de uma restrição inicial na quantidade de material mitocondrial a ser transmitido, seguida de uma amplificação (Poulton et al., 1998). Tal eventualidade acarreta implicações importantes na transmissão do ADNmt variante, bem como na expressão da doença. A introdução desmesurada de genomas variantes na população de oócitos poderia resultar numa alta proporção de descendência afectada, isto é, uma alta taxa de transmissão (Chinnery et al., 1998).

#### *1.2.2.6. Homoplasma versus heteroplasma*

No âmbito das patologias mitocondriais, a noção de que a percentagem de moléculas variantes define ou contribui para a expressão da patologia, é um conceito que merece consideração. O fenótipo é normal até ser atingido uma proporção crítica de ADNmt variante no tecido e excedido o nível limite para a expressão do genótipo (Wallace et al., 1997). Quando a percentagem de variantes no genoma ultrapassa um determinado nível limiar, o efeito deletério da mutação não será contrabalançado pela coexistência com o ADNmt tipo selvagem, e será expresso fenotipicamente como uma disfunção celular, induzindo a expressões fenotípicas diferentes. A expressão fenotípica dependerá da natureza da mutação, da sua distribuição no tecido (Petruzzella et al., 1994), bem como da relativa dependência energética de cada sistema de órgãos. Presume-se que outros factores poderão colaborar na expressão fenotípica das mutações mitocondriais, como a influência dos genes nucleares, a idade e sexo do indivíduo, bem como factores ambientais, permanecendo no entanto, uma questão insuficientemente esclarecida.

### *1.2.2.7. Mutações somáticas relacionadas com a idade*

Com a idade, as mutações somáticas sobrevivem e acumulam-se no ADNmt colaborando no processo senescente dos tecidos (Trifunovic et al., 2004; Schriener et al., 2005). De entre as causas mais comuns, envolvidas numa ampla variedade de patologias e formas de cancro, destacam-se as espécies reactivas de oxigénio (ROS) originadas pela cadeia de respiração (Wallace, 2007; Xia et al., 2007; Zeviani & Carelli, 2007). Danificam o genoma mitocondrial induzindo alterações oxidativas nas suas bases, substituições e rearranjos. Ao longo da vida este processo é cumulativo e responsável pelo défice bioenergético ulterior, contribuindo directamente para o fenótipo senescente, ou envelhecimento, e à morte celular, ou apoptose (Trounce et al., 1998; Simonetti et al., 1992; Ozawa, 1995). Por acréscimo, o factor idade poderá ser preempório na fixação e progressão das patologias mitocondriais. A maioria das mutações herdadas é insuficiente para impor limitações no desempenho da OXPHOS, mas a acumulação das mutações somáticas nos tecidos pós-mitóticos exacerba essa limitação e o consequente défice funcional, incitando, posteriormente, à expressão fenotípica (Wallace et al., 1992; Wallace, 1995).

## **1.3. O ADN MITOCONDRIAL COMO MARCADOR GENÉTICO**

Supõe-se que ocorra cerca de uma alteração no ADNmt, resultante de uma eventual mutação, a cada 10.000 anos desde a existência do primeiro homem moderno. Estas substituições nucleotídicas acumularam-se sequencialmente ao longo da migração das linhagens maternas cuja expansão coincidiu, aproximadamente, com a colonização das populações humanas pelas diferentes regiões do mundo. Assim, as mulheres que migraram de África para os diversos continentes transportavam mutações no ADNmt consideradas, hoje em dia, polimorfismos com especificidade populacional, passíveis de formar grupos de haplótipos

relacionados, ou haplogrupos (Torrioni & Wallace, 1994; Wallace, 1995).

A aplicação destes marcadores no estudo da diversidade mitocondrial possibilitou a construção de uma única árvore filogenética das linhagens do ADNmt. Inicialmente começou por se utilizar 18 enzimas de restrição (RFLP), que cobriam cerca de 20% do ADNmt e, numa fase posterior a sequenciação da região HVS-I (Richards et al., 1996), com a inovadora técnica de amplificação (PCR). A Tabela 1.1 discrimina algumas das variantes do ADNmt e respectivos haplogrupos com especificidade geográfica. Estão identificados marcadores com especificidade continental para os Africanos (Chen et al., 1995b), Caucasianos Europeus (Torrioni et al., 1994a, 1996) e Asiáticos (Schurr et al., 1990).

Tabela 1. 1 Variantes de ADNmt definidas por Digestão com Enzimas de Restrição. Tabela adaptada de [www.mitomap.org](http://www.mitomap.org) (Acedida a 29 de Abril de 2008)

Continente	Haplogrupo	Variantes ADNmt	% Continental
<b>África</b>	L	3592+ HpaI	76
	H	7025- AluI	39
<b>Europa</b>	I	1715- DdeI; 10032+ AluI; 4529-HaeIII;	7
	J	8249+ AvaI; 16389+ BamHI/MboI	9
	K	13704- BstNI; 16065- HinfI	8
	Total	9052- HaeIII/HhaI	63
<b>Ásia</b>	A	663+ HaeIII	12
	B	8271-8281 9bp deletion; 16517+HaeIII	4
	F	12406- HpaI/HincII; 16517+ HaeIII	4
	M	10394+ DdeI; 10397+ AluI	57
	M-C	13259-/13262+ HincII/AluI	21
	M-D	5176- AluI	14
Total		77	
<b>América</b>	A*	663+ HaeIII	44
	A+	663+ HaeIII; 16329- RsaI	29
	B*	8271-8281 9bp deletion; 16517+ HaeIII	22
	M-C*	13259-/13262+ HincII/AluI	18
	M-D*	5176- AluI	16
Total		100	

\*(Ameríndeos)+(Na-Dene)

### 1.3.1. Haplogrupos do ADN Mitocondrial

Os haplogrupos designam-se na literatura por letra maiúscula, por exemplo U, seguida de um número representando as ramificações do haplogrupo, U6 (Schurr et al., 1990; Torrioni et al., 1996; Richards et al., 1998). O haplogrupo L1 representa 29% de todos os ADNmt

africanos, enquanto o haplogrupo L2 é responsável por uma parcela de 34%. Os restantes 37% pertencem ao haplogrupo L3, um grupo heterogêneo de diversas linhagens. Uma destas linhagens representa uma módica percentagem de ADNmt africano, todavia, parece ser o fundador de metade de todos os Europeus, Asiáticos e Americanos. Do conjunto dos ADNmt europeus, cerca de 99% incorpora-se em 9 haplogrupos específicos designados por H, I, J, K, T, U, V, W e X (Torrioni et al., 1996) podendo ainda ser consideradas outras subdivisões em quatro grupos HV, UK, TJ e WIX (Richards et al., 1998). Na Ásia, o super-haplogrupo M retrata 77% de todos os ADNmt, ramificando-se em subgrupos conhecidos por C, D, G e E. A maioria dos restantes ADNmt asiáticos pertencem aos haplogrupos A, B e F (Torrioni et al., 1994c). No continente americano, essencialmente toda a variabilidade mitocondrial observada nos nativo-americanos cinge-se aos haplogrupos A, B, C e D (Torrioni & Wallace, 1994). A Figura 1.5 exhibe os principais haplogrupos específicos dos três continentes.

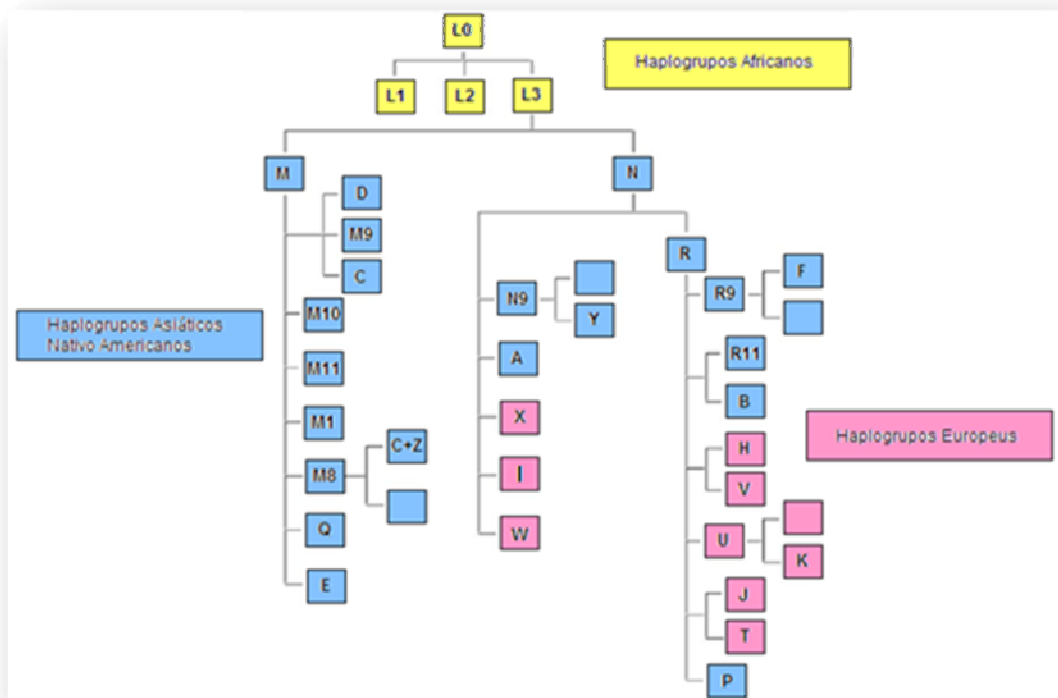


Figura 1. 5. Árvore simplificada dos principais haplogrupos com especificidade continental. Caixas em branco representam subgrupos adicionais não indicados. Figura adaptada de Herrnstadt, (2004).

### 1.3.1.1. Haplogrupos europeus

A análise das sequências de ADNmt veio demonstrar a existência de um nível significativo de homogeneidade entre as populações europeias, bem como distâncias genéticas inferiores àquelas observadas entre populações de outros continentes, especialmente em África (Comas et al., 1997).

Estudos evidenciando a convergência do genoma mitocondrial de três grandes populações europeias divergentes a 9 haplogrupos, H, I, J, K, T, U, V, W e X (Figura 1.6), sugerem que os mesmos detêm a maior parte da variabilidade mitocondrial europeia (Torroni et al., 1996). Cada um destes haplogrupos europeus é definido por um local polimórfico, relativamente ancestral e estável, localizado na região codificante (Torroni et al., 1996). Prevalece a opinião de que pelo menos seis dos haplogrupos europeus, H, I, J, K, T e W, estão essencialmente confinados a populações europeias tendo, provavelmente, surgido após a separação genética do ancestral caucasiano do ancestral moderno dos Africanos e Asiáticos (Torroni et al., 1996). Já o haplogrupo U, embora surja com maior frequência na Europa, é compartilhado em frequências reduzidas com os Japoneses, com as populações Berbere do Norte de África, Etíopes e Senegaleses (Ozawa, 1995; Torroni et al., 1996; Passarino et al., 1998; Macaulay et al., 1999). O haplogrupo K está agora incluído no haplogrupo U como um subgrupo (Hofmann et al., 1997; Richards et al., 1998; Macaulay et al., 1999). Estima-se que os haplogrupos H, J, T e V poderão ter tido uma origem recente, 8.000-30.000 anos (Torroni et al., 1996), sustentando a hipótese de que tiveram origem após a separação genética e geográfica do ancestral dos Caucásicos do ancestral dos modernos Africanos e Asiáticos. Por outro lado, o haplogrupo U demonstra ser mais antigo, 51.000-67.000 anos (Torroni et al., 1996), levantando a possibilidade de ter origem em África e, subsequentemente, difundido para a Europa e Ásia Central. Considera-se os haplogrupos caucasianos H e V muito próximos, ocorrendo, respectivamente, numa frequência de 45% e 5% em populações caucasianas europeias e americanas (Torroni et al., 1996; Macaulay et al., 1999; Allard et al., 2002). Os haplogrupos caucasianos J e T são haplogrupos próximos, encontrados em populações caucasianas europeias e americanas com frequências de cerca de 10% (Torroni et al., 1996; Macaulay et al., 1999; Allard et al., 2002). O super-haplogrupo U/K compreende cerca de 20%

de todo o legado mitocondrial da Europa. O haplogrupo caucasiano K é um subgrupo do haplogrupo U (Richards et al., 1998; Finnila et al., 2001; Achilli et al., 2005; Behar et al., 2006; Kivisild et al., 2006), ocorrendo numa frequência de cerca de 9% em populações europeias e norte americanas (Torroni et al., 1996; Allard et al., 2002). A frequência do haplogrupo U entre Europeus ronda os 7% (Richards et al., 1996; Torroni et al., 1996).

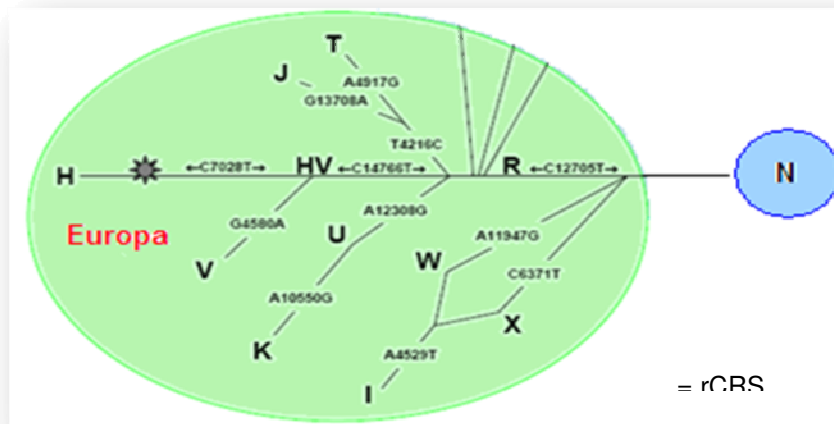


Figura 1. 6. Árvore filogenética simplificada dos haplogrupos típicos europeus. Os polimorfismos definidores de cada haplogrupo, à medida que diverge de CRS, estão indicados à direita da posição nucleotídica. Figura adaptada de [www.mitomap.org](http://www.mitomap.org) (Acedida a 29 de Abril de 2008).

### 1.3.2. Discriminação dos Haplótipos da Região HVS-I

Para a análise da variabilidade das sequências de ADNmt são consideradas as regiões HVR da molécula, contudo, a região HVS-I, que inclui o segmento do nucleótido 16.024 ao 16.385 é o mais utilizado na determinação dos haplótipos. Até à data, a maioria das sequências da molécula mitocondrial publicadas está limitada à região HVS-I. Os polimorfismos presentes no ADNmt formam conjuntos que quando comparados com a sequência rCRS, permitem a sua colocação, numa análise apriorística, em haplogrupos específicos. Devido à expressiva taxa de mutação e propensão para reversões mutacionais, a simples identificação dos haplogrupos baseada meramente na região CR, torna-se arriscada (Bandelt et al., 2006). Temos como exemplo o polimorfismo 73A associado ao haplogrupo H (Torroni et al., 1996; Macaulay et al., 1999; Allard et al., 2002) considerado um “fast site” mutacional da região CR (Meyer et al., 1999; Allard et al., 2002). Existem diversos casos de

reversões para 73G em indivíduos do haplogrupo H, dificultando sua distinção de indivíduos do haplogrupo U, a que efectivamente está associado (Torrioni et al., 1996; Macaulay et al., 1999; Allard et al., 2002), sem informação adicional da região codificante. Com o intuito de validar a fidelidade da análise destas variantes filogeneticamente associadas a um haplótipo específico, relativamente ancestral e estável e de diferenciá-las daquelas recentes e sujeitas a mutações repetidas, recorre-se à confirmação das variações identificadas na região HVS-I com polimorfismos distribuídos ao longo da região codificante da molécula de ADNmt (Bandelt et al., 1995) (Tabela 1.2).

Tabela 1. 2. Polimorfismos da Região Codificante da Molécula de ADN Mitocondrial definidores dos Haplogrupos Mitocondriais

Haplogrupo	Polimorfismo	Referências
<b>H</b>	A2706G/C7028T	Torrioni & Wallace (1994), Macaulay et al., (1999)
<b>V</b>	G4580A, C15904T	Torrioni et al., (1996), Herrnstadt et al., (2002)
<b>HV</b>	C14766T	Brandstatter et al., (2003), Kivisild et al., (2006)
<b>Pre-HV1</b>	C13188T	Kivisild et al., (2006)
<b>R</b>	G11719A/C12705T	Finnila et al., (2001), Herrnstadt et al., (2002)
<b>J/T</b>	A11251G	Brandstatter et al., (2003), Kivisild et al., (2006)
<b>J</b>	A12612G	Macaulay et al., (1999),
<b>J1</b>	G3010A	Finnila et al., (2001)
<b>J2</b>	G15257A	Finnila et al., (2001)
<b>T</b>	G13368A	Torrioni et al., (1996), Macaulay et al., (1999)
<b>T1</b>	C12633A	Finnila et al., (2001)
<b>T1a</b>	T9899C	Saxena et al., (2006), Kivisild et al., (2006)
<b>T2</b>	A14233G	Finnila et al., (2001)
<b>U</b>	A11467G/A12308G/G12372A	Torrioni et al., (1996), Macaulay et al., (1999)
<b>U3</b>	A14139G	Howell et al., (1995), Kivisild et al., (2006)
<b>U4</b>	T15693C	Finnila et al., (2001)
<b>U4a</b>	C8818T	Finnila et al., (2001), Kivisild et al., (2006)
<b>U5</b>	G9477A/T13617C	Finnila et al., (2001), Kivisild et al., (2006)
<b>U5b</b>	T14182C	Finnila et al., (2001), Kivisild et al., (2006)
<b>U6</b>	A3348G	Saxena et al., (2006)
<b>K</b>	G9055A/C14167T	Torrioni et al., (1996), Finnila et al., (2001)
<b>K2</b>	C11869T	Behar et al., 2006
<b>W</b>	G8994A/T12414C	Torrioni et al., (1996), Finnila et al., (2001)
<b>X</b>	A13966G	Finnila et al., (2001), Herrnstadt et al., (2002)
<b>N1</b>	T10238C/G12501A	Macaulay et al., (1999), Kivisild et al., (2006)
<b>I</b>	A4529T/T10034C/A13780G/G15043C	Finnila et al., (2001), Herrnstadt et al., (2002)

<b>A</b>	T4248C	Kivisild et al., (2006)
<b>N</b>	T9540C/T10873C/G15301A	Herrnstadt et al., (2002), Kivisild et al.,(2006)
<b>M</b>	C10400T/G15043A	Torrioni et al., (1993), Torrioni et al., (1992, 1994b)
<b>L1</b>	T14178C	Kivisild et al., (2004), Kivisild et al., (2006)
<b>L1b</b>	A14203G	Kivisild et al., (2006)
<b>L1c</b>	T14000C	Kivisild et al., (2006)
<b>L2</b>	A9221G/C13650T	Herrnstadt et al., (2002), Kivisild et al., (2006)
<b>L2a</b>	A13803G	Chen et al., (2000)
<b>L3</b>	T9540C/T10873C/G15301A	Herrnstadt et al., (2002), Kivisild et al., (2006)
<b>L3b</b>	C13914T	Kivisild et al., (2006)
<b>L3e</b>	A10819G	Silva et al., (2002), Kivisild et al., (2006)
<b>L3f</b>	T4218C	Kivisild et al., (2006)

A fusão da informação adquirida da análise da região HVS-I e dos polimorfismos da região codificante habilita-nos para a correcta identificação dos variados haplogrupos.

De acordo com a recente árvore mitocondrial fundada em sequências completas da região codificante (Kivisild et al., 2006), todas as sequências são individualizadas em quatro super-haplogrupos mitocondriais, H/V, U/K, T/J e W/I/X.

Caracterizam-se os indivíduos pertencentes ao haplogrupo H pela presença de polimorfismo 73A na região CR e ausência de mutações 2706G e 7028T na região codificante, bem como dos outros polimorfismos definidores dos demais haplogrupos (Torrioni et al., 1996) como os polimorfismos 14766T e 11719A (Macaulay et al., 1999; Saillard et al., 2000). Cumulativamente às mutações particulares do super-haplogrupo HV, o haplogrupo V é caracterizado pelas mutações 4580A e 15904T na região codificante (Torrioni et al., 1996, Herrnstadt et al., 2002) e pelos polimorfismos específicos da região controlo 72C e 16298C. Na distinção de indivíduos pertencentes ao haplogrupo V são usados os polimorfismos de diagnóstico 4580A e 15904T.

O super-haplogrupo J/T agrupa-se pelas mutações específicas 4216C, 11251G e 15452A na região codificante e pelo polimorfismo na região controlo 16126C (Torrioni et al., 1994a, 1996; Macaulay et al., 1999; Finnila et al., 2001; Brandstatter et al., 2003). As mutações na região codificante 10398G, 12612G e 13708A e o polimorfismo de diagnóstico 16069T definem o haplogrupo J (Finnila et al., 2001; Herrnstadt et al., 2002; Allard et al., 2002). Os polimorfismos 3010A e 15257A são utilizados na distinção dos ramos J1 e J2, respectivamente (Finnila et al., 2001). O haplogrupo T reúne as mutações específicas da região codificante

709A, 1888A, 4917G, 8697A, 10463C, 13368A, 14905A, 15607G e 15928A e o polimorfismo específico da HVS-I 16294T (Torrioni et al., 1996; Macaulay et al., 1999; Finnila et al., 2001; Herrnstadt et al., 2002). Divide-se em dois ramos, T1 e T2, diferenciados pelos polimorfismos C12633T e A14233G, na devida ordem (Finnila et al., 2001).

Os polimorfismos 12372A, 12308G e 11467G caracterizam o super-haplogrupo U/K (Torrioni et al., 1996; Macaulay et al., 1999). O haplogrupo K é definido pelas mutações 1811G, 9055A, 12308G, 12372A e 14167T e polimorfismos da região controlo 16224C, 16311C e 73G (Torrioni et al., 1996; Macaulay et al., 1999; Finnila et al., 2001; Allard et al., 2002). Divide-se em duas subdivisões, K1 e K2 pelos polimorfismos específicos T1189C (Finnila et al., 2001) e T9716C (Behar et al., 2006), respectivamente. O haplogrupo U divide-se, primeiramente, em dois grupos principais distinguidos pela mutação 1811G, do qual fazem parte um significativo número de ramos independentes, U1-U9 (Achilli et al., 2005). Do grupo dos haplogrupos que não apresenta a mutação 1811G fazem parte os ramos U1, U5 e U6 (Achilli et al., 2005). O haplogrupo U5 com o motivo 16192T e 16256T (Richards et al., 1998) diferencia-se dos restantes pelas mutações 9477A e 13617C e o haplogrupo U6, com os polimorfismos 16172C e 16219G, pela respectiva mutação 3348G (Achilli et al., 2005; Saxena et al., 2006; Kivisild et al., 2006)

O conjunto dos haplogrupos menos comuns, I, W e X é identificado pelo polimorfismo 12705T (Finnila et al., 2001), e partilham o polimorfismo 16223T na região HVS-I (Torrioni et al., 1996). O haplogrupo X é caracterizado pelos polimorfismos na região controlo 16189C, 16223C e 16278T e o13966G (Finnila et al., 2001; Herrnstadt et al., 2002) na região CR. As sequências características do haplogrupo W são identificadas pela presença do polimorfismo particular 8994A (Torrioni et al., 1996; Finnila et al., 2001) e 12414C (Kivisild et al., 2006) e dos polimorfismos de diagnóstico 16223C e 16292T. Do haplogrupo I fazem parte todas as sequências apresentando os polimorfismos 16129A e 16223C e as mutações 4529T, 10034C, 13780G e 15043A características da região codificante (Finnila et al., 2001; Herrnstadt et al., 2002).

O super-haplogrupo M é caracterizado pelos polimorfismos 10400T (Torrioni et al.,

1993), 14783C e 15043C (Torrioni et al., 1992, 1994c). Todas as sequências asiáticas pertencentes ao super-haplogrupo M albergam as substituições 8701G, 9540C, 10398G, 10873C, 12705T (também presentes no haplogrupo A), e G15301A (Herrnstadt et al., 2002).

Todas as sequências mitocondriais pertencentes aos haplogrupos africanos apresentam as alterações nucleotídicas nas posições 9540C, 10398G, 10873C, 15301A e 12705T (Herrnstadt et al., 2002). Distinguem-se os dois subgrupos, L3b e L3f, recorrendo às mutações 13914T e 4218C, respectivamente (Kivisild et al., 2006). Já o polimorfismo 10819G permite distinguir o ramo L3e dos haplogrupos L1 e L2 (Silva et al., 2002; Kivisild et al., 2006). Os haplótipos africanos L3 são caracterizados pela ausência dos polimorfismos específicos de L1 e L2, de entre os quais o polimorfismo 13650T. Os dois ramos L1c e L1b diferenciam-se através das mutações na região codificante características, 14000C e 14203G, respectivamente (Salas et al., 2002, 2004; Allard et al., 2005; Kivisild et al., 2006).

### **1.3.3. ADN Mitocondrial e Estudos Filogenéticos**

Uma árvore filogenética, também designada por Cladograma, é uma exibição em forma de uma árvore das relações evolutivas entre várias espécies ou outras entidades que podem ter um antepassado em comum. A variabilidade das sequências da molécula mitocondrial pode ser utilizada na construção destas árvores filogenéticas, ou várias árvores alternativas rearranjadas em “networks”, para revelar as relações evolutivas entre sequências individuais. Assim, estes estudos filogenéticos apoiam-se nas diferenças entre os indivíduos a nível molecular das sequências de ADNmt. A controversa e muito contestada teoria da Eva Mitocondrial, sugere que o grau de similitude entre seres humanos é passível de ser quantificado pela quantidade de mutações acumuladas no ADNmt, visto convergirem, na árvore evolutiva, para um único ancestral materno comum a todos os genomas mitocondriais

humanos, e que terá vivido na África Subsariana, há cerca de 170.000 anos (Ingman et al., 2000). A estrutura da árvore implica um modelo onde as alterações evolutivas exibem uma direção definida do ancestral para a população derivada (Li, 1997). A proximidade do nó interno à raiz da árvore determina a antiguidade do evento que provocou a divergência, ou seja, ramos mais próximos à raiz revelam-se mais antigos que aqueles mais afastados.

Existem, presentemente, mais de 500 sequências de ADNmt caracterizadas e publicadas. A acumulação desta informação com estudos enzimáticos de RFLP, sequenciação da região controlo e identificação de determinados polimorfismos de substituição de um único nucleótido (SNPs) (Ingman et al., 2000; Richards & Macaulay, 2001), tornou exequível a reconstrução de uma filogenia das principais linhagens do ADNmt (Figura 1.7). O ancestral comum mais recente de toda a filogenia data de há 172.000 anos e o ancestral para a ramificação entre as linhagens africanas e não africanas tem, aproximadamente, 52.000 anos (Ingman et al., 2000).

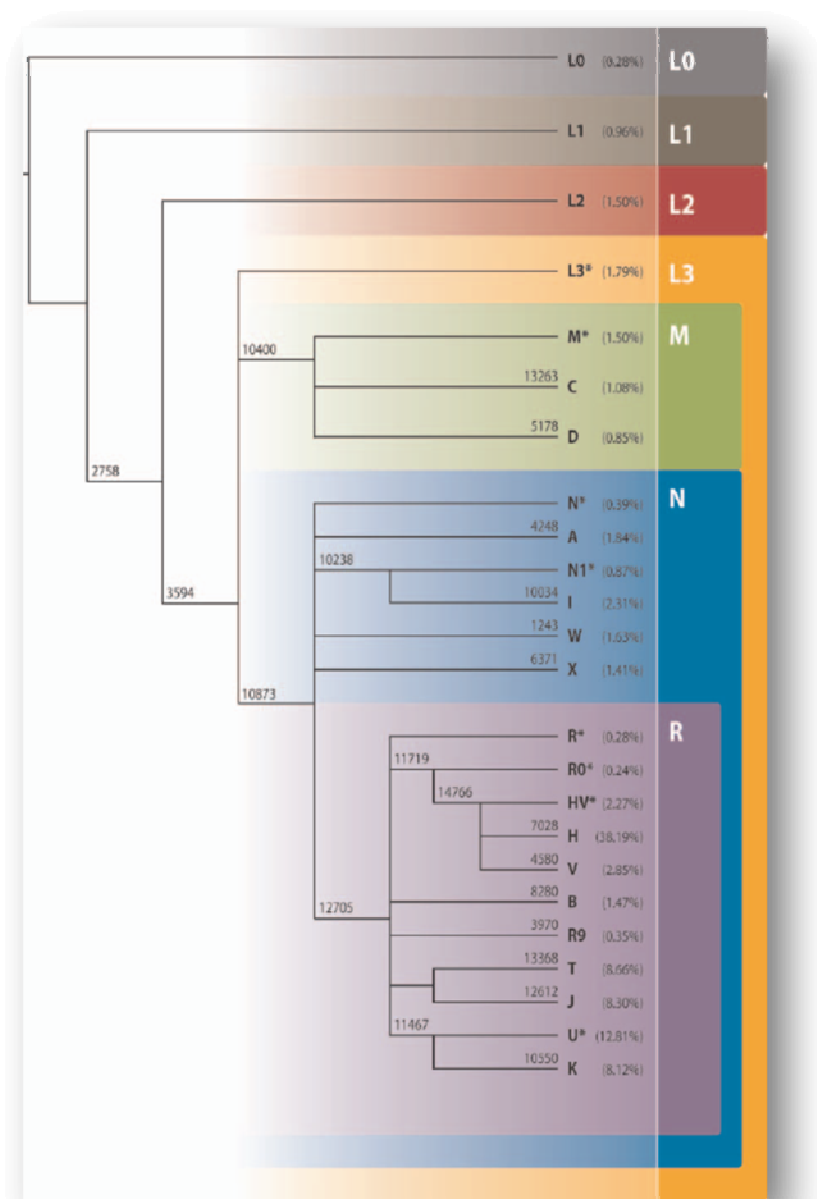


Figura 1. 7. Árvore filogenética simplificada exibindo os principais haplogrupos. As mutações da região codificante estão indicadas ao longo dos ramos. Figura transcrita de Behar et al. (2007).

Da árvore filogenética do ADNmt surge a completa separação das linhagens africanas das não africanas. Os primeiros três ramos levam exclusivamente a linhagens africanas (L0, L1 e L2), enquanto a quarta ramificação (L3), contém ambas as linhagens africanas e não africanas.

Da análise de sequências completas de ADNmt humanas relativamente a sequências de chimpanzés (Mishmar et al., 2003; Kivisild et al., 2006; Torroni et al., 2006), distinguiu-se o

super-haplogrupo L0 como o primeiro a emergir, e assim, comum a toda a variabilidade presente. Uma segunda diversificação teve lugar quando o super-haplogrupo L1 se dividiu em L1b e L1c e o super-haplogrupo L2 se difundiu por todo o continente africano. O terceiro super-haplogrupo, L3, teve origem na África Oriental há cerca de 65.000-75.000 anos, divergindo posteriormente *in situ*, em variados clados (Salas et al., 2002; Kivisild et al., 2004; Macaulay et al., 2005; Torroni et al., 2006; Kivisild et al., 2006). O super-haplogrupo L3 ter-se-à expandido por todo o continente, e saído dele há cerca de 65.000 a 60.000 anos, aquando da migração dos seus portadores, M e N (Forster et al., 2001; Kong et al., 2003, Mishmar et al., 2003; Macaulay et al., 2005), colonizando os restantes continentes e dando origem a todo o conjunto de ADNmt não africano (Figura 1.8).

O grupo N teve uma evolução relativamente rápida, criando diversos haplogrupos, de entre os quais o haplogrupo R há 60.000 anos (Kivisild et al., 2003; Macaulay et al., 2005). Como consequência directa, encontram-se descendentes destes três super-haplogrupos por toda a Eurásia, América, Austrália e Oceânia (Richards et al., 1998, 2000, 2003; Kivisild et al., 1999b, 2003; Macaulay et al., 1999, 2005; Ingman & Gyllensten, 2003; Metspalu et al., 2004, 2006; Friedlaender et al., 2005, 2007; Torroni et al., 2006; Sun et al., 2006; Hudjashov et al., 2007).

Há provavelmente 45.000 anos, as linhagens do Sudoeste da Eurásia expandiram-se em direcção às regiões interiores do continente, divergindo em numerosas subdivisões com uma alta especificidade continental (Figura 1.8). Presentemente, as populações do Sul da Ásia ostentam uma panóplia de linhagens basais M (Metspalu et al., 2004, Sun et al., 2006, Chaubey et al., 2007), como algumas linhagens dentro do haplogrupo N (Palanichamy et al., 2004), do R (Kivisild et al., 1999a, 2003; Palanichamy et al., 2004; Quintana-Murci et al., 2004), e diversas linhagens pertencentes ao super-haplogrupo M extensamente caracterizada no Nordeste da Ásia (Kong et al., 2003), bem como no Sudoeste Asiático (Forster et al., 2001; Kivisild et al., 2002; Merriwether et al., 2005).

Seguindo um trajecto junto à costa, outros tipos de ADNmt originaram os haplogrupos Q, S e P na Papua Nova Guiné (Forster et al., 2001) e demais subdivisões na Austrália (Ingman &

Gyllensten, 2003; Friedlaender et al., 2005, 2007; Hudjashov et al., 2007). Como resultado das propícias condições ambientais, (Forster et al., 1996; Smith et al., 1999; Silva et al., 2002; Rubicz et al., 2003), indivíduos carregando os haplótipos A, B, C e D da Ásia colonizaram as Américas há 14.000-37.000 anos (Forster et al., 1996).

O Oeste da Eurásia também foi colonizado pela migração africana (Figura 1,8), com o haplogrupo R dirigindo-se para o Oeste e Este central no início do Paleolítico superior, dando lugar a um conjunto de subgrupos, o haplogrupo R0, previamente conhecido por pré-HV, (Torroni et al., 2006), o super-haplogrupo JT e U. Adicionalmente, três outros ramos com módicas expressões, N1, N2 e X, derivaram directamente do nó basal do haplogrupo N. O conjunto destes variantes representam 98% do legado mitocondrial característico dos Europeus (Torroni et al., 1996; Richards et al., 1998, 2002; Macaulay et al., 1999).

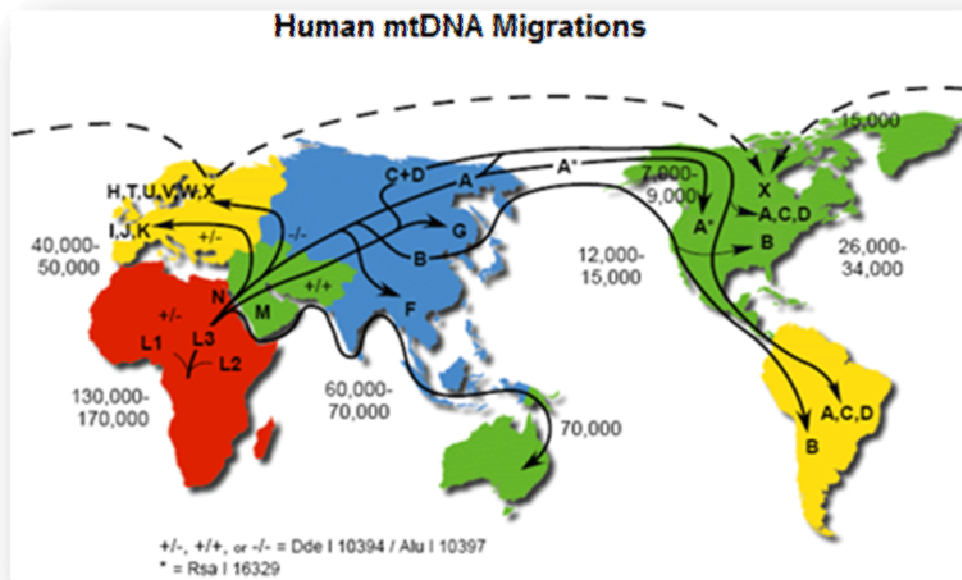


Figura 1. 8. Trajecto migratório dos haplogrupos do ADN mitocondrial. Figura transcrita de [www.mitomap.org](http://www.mitomap.org) (Acedida a 25 de Fevereiro de 2008).

#### 1.4. ADN MITOCONDRIAL E A PATOLOGIA

As mitocôndrias são componentes vitais de todas as células nucleadas. Não é surpreendente, por isso, que as patologias mitocondriais afectem vários tecidos e que as características clínicas sejam tão variadas. De facto, nos últimos anos têm surgido estudos que demonstram uma correlação de variantes de moléculas de ADNmt com o aumento/diminuição no risco de patologias tão comuns como a diabetes, o cancro ou as doenças cardiovasculares (Herrnstadt & Howell, 2004; Wallace, 2005; Zeviani & Carelli, 2007).

Existem duas vias pelas quais as mitocôndrias podem estar envolvidas numa patologia em particular: erros no ADNmt, onde uma mutação no próprio genoma mitocondrial provoca a patologia (estas doenças são herdadas por via materna e afectam a mitocôndria em si); erros no ADNn, onde uma mutação nos vários genes nucleares que codificam proteínas necessárias ao metabolismo mitocondrial pode induzir à patologia (estas patologias não costumam apresentar o padrão clássico de transmissão via materna, mas frequentemente, os padrões típicos da hereditariedade mendeliana).

As patologias mitocondriais tendem a ser progressivas e não causam sintomatologia nos primeiros anos de vida. Crê-se que mutações pontuais, como alterações fenotípicas na forma das proteínas, ribossomas ou RNAt potencialmente capazes de alterar a produção de energia, podem induzir a fenótipos debilitados onde as mitocôndrias ainda funcionem parcialmente (Scheffler, 1999). Contudo, esta limitação no desempenho da OXPHOS pode trazer consequências médicas significativas, manifestando-se, diferenciadamente, ao longo do tempo ou entre tecidos (Scheffler, 1999).

As doenças do ADNmt afectam células de um modo diversificado. De um modo geral os tecidos com maior dispêndio aeróbico e capacidade de regeneração reduzida, como o cérebro, coração e músculo esquelético, são mais susceptíveis e severamente atingidos, mas virtualmente, qualquer órgão ou tecido no corpo pode ser afectado, incluindo o trato gastrointestinal, fígado, rim e sistema endócrino.



episodes; MERRF, myoclonic epilepsy with ragged-red fibers; MILS, maternally inherited Leigh syndrome; NARP, neuropathy, ataxia, retinitis pigmentosa; PEO, progressive external ophthalmoplegia. Figura transcrita de DiMauro (2004).

#### **1.4.1. Mutações do ADN Mitocondrial**

As substituições de bases e deleções, que podem envolver grande parte da molécula, são o tipo mais frequente de mutações a ocorrerem no genoma mitocondrial. As conhecidas patologias mitocondriais hereditárias por via materna resultam das deleções, ao passo que a maioria das substituições mostram ser neutras. Os estudos genéticos evolutivos concentram-se nestas últimas. As alterações em larga escala no ADNmt podem ser deleções, ou mais raramente, duplicações. Ambos os tipos de mutação ocorrem sob a forma heteroplásmica estando sujeitas, ao longo do tempo, a variações na proporção de moléculas mutadas entre os tecidos e à consequente alteração no grau de heteroplasmia.

As deleções no ADNmt foram as primeiras mutações a serem descritas e associadas a patologias humanas (Holt et al., 1988). Usufruindo de seu tamanho variável, deleções desde uma única base a várias centenas, apresentam-se em qualquer parte da molécula. Ocorrem como tipo único, ou população, ou como múltiplas deleções com diferentes tamanhos. Foi relatado em doentes com o Síndrome de Kearns-Sayre (KSS), a presença de uma única deleção envolvendo um considerável número de pares de bases (Schon et al., 1989). Já a ocorrência de um conjunto dessas deleções é, associada, ao envelhecimento (Melov et al., 1995).

As duplicações isoladas no ADNmt não manifestam características patogénicas, mas poderão facultar a produção de deleções. Estão descritas, também, pequenas microdeleções em genes mitocondriais, como o da citocromo oxidase, citocromo b e complexo I, associadas a uma variedade de quadros clínicos.

Presentemente estão caracterizadas mais de 100 mutações pontuais com associação a doenças humanas (Servidei, 2004) e com expressão clínica variada abrangendo diversos fenótipos. São herdadas por via materna e podem ocorrer em genes do ARNr ou ARNt,

observadas na miopatia mitocondrial, encefalopatia, acidoses lácticas e trombozes (MELAS, Kobayashi et al., 1990), ou em genes codificadores de proteínas para os complexos da cadeia respiratória, responsáveis pela fraqueza neurogénica, ataxia, retinite pigmentosa (NARP, Fryer et al., 1994), encefalomiopatia mitocondrial (Clark et al., 1999) e neuropatia óptica hereditária de Leber's (LHON; Brown et al., 1992).

Muitos dos polimorfismos com faculdade para substituir aminoácidos definem haplogrupos e localizam-se na região codificante, dando origem a uma variedade de produtos finais proteicos. Assumindo que tal diversidade possa ter um efeito funcional, afirmou-se recentemente que tais polimorfismo, e consequentes variantes, conferem uma vantagem genética actuando na relação diferença de potencial/produção ATP da cadeia respiratória (Mishmar et al., 2003; Ruiz-Pesini et al., 2004), e por isso, seleccionados por adaptação climática (Mishmar et al., 2003). Esta nova interpretação de um possível envolvimento do ambiente na selecção dos haplogrupos e da consequente função adaptativa dos polimorfismos tem sido revista por outros autores (Kivisild et al., 2006). Já as mutações localizadas na região CR não prejudicam a produção de ATP ou de calor, nem promovem a geração de ROS, por não produzirem polipéptidos irregulares que actuem directamente na cadeia respiratória. A preponderância deste grupo de mutações poderá advir da sua possível influência na regulação da expressão génica mitocondrial.

A expressão fenotípica de uma mutação está sujeita à natureza da mesma, da sua distribuição no tecido e à necessidade de aprovisionamento energético de cada órgão (Schon et al., 1997). Tendo em conta a possibilidade das alterações nas sequências do ADNmt interagirem entre si, com genes nucleares ou com o ambiente na promoção das patologias, outros factores poderão ser preponderantes como a coexistência de polimorfismos mitocondriais (formando haplótipos), a influência de genes nucleares, a idade e sexo do indivíduo e o background nuclear (Cock et al., 1995).

## **1.5. ADN MITOCONDRIAL E A INFERTILIDADE MASCULINA**

Não obstante os avanços científicos atingidos nos últimos anos, escasseiam evidências a suportarem um papel da genética mitocondrial na infertilidade masculina. É reconhecido que o mau funcionamento do metabolismo mitocondrial poderá influir danos no tecido trazendo graves consequências ao organismo, e por isso, o seu genoma tem sido alvo de diversos estudos. Vários autores têm associado o débil funcionamento da cadeia respiratória, ocasionada pela acumulação de ADN patogénico, a diversas patologias humanas (Ozawa, 1997; Hofhans & Attardi, 1993) e, essencialmente, em órgãos requerentes de níveis excessivos de energia como o músculo-esquelético, coração, fígado, cérebro, rins e tecido germinal (Wallace, 1992; Ruiz-Pesini et al., 1998). Assim, o ADNmt tem sido implicado em algumas formas de infertilidade masculina, particularmente à astenospermia, por estar associada à mobilidade dos espermatozóides. Atendendo à dependência dos espermatozóides pela cadeia respiratória mitocondrial para a sua mobilidade (Ruiz-Pesini et al., 1998), é esperado que a acumulação de ADNmt patogénico, interferindo com o processo normal da cadeia respiratória, contribua para a disfunção do sémen e, provavelmente, induzindo a infertilidade. Demonstrou-se, bioquimicamente, uma correlação positiva entre a mobilidade dos espermatozóides e as actividades enzimáticas mitocondriais, sugestionando uma dependência significativa da capacidade motora na energia produzida pelas mitocôndrias (Carra et al., 2004). Por conseguinte, a cadeia respiratória é considerada o principal determinante da fertilidade masculina (St. John et al., 1997; Holoyoake et al., 2001). O seu indispensável tributo no processo da espermatogénese (Nakada et al., 2006) propõe, como causa provável em certos casos de infertilidade masculina sem etiologia identificada, a disfunção neste sistema.

Do processo de produção de ATP resultam os radicais livres, principais responsáveis pela ocorrência de erros metabólicos no genoma mitocondrial, também potenciado por eventos de mutação espontânea (Allen, 1996). A necessidade absoluta de maximizar a produção de energia para a mobilidade coage os espermatozóides a exporem o seu genoma mitocondrial aos produtos mutagénicos resultantes da cadeia respiratória. A exigência por energia necessária na espermatogénese e mobilidade gamética fomenta as substituições nucleotídicas aquando de uma produção ineficiente, interferindo com a fertilidade masculina, contrariamente

ao que se verifica com os gâmetas femininos. Na gametogénese, um menor dispêndio de energia leva a uma menor exigência energética, praticamente anulando tais circunstâncias de vulnerabilidade do genoma mitocondrial.

### **1.5.1. Mutações Mitocondriais**

Nas patologias mitocondriais quer as substituições de um único par de bases como grandes rearranjos podem ser patogénicos. Presentemente, mais de 100 SNPs patogénicos estão identificados e novos possíveis candidatos continuam sob investigação. Contudo, devido à considerável taxa mutacional da molécula, é particularmente complicado a classificação do carácter patogénico estando estes misturados num fundo genético de polimorfismos benignos.

Diversos polimorfismos presentes nos genes mitocondriais foram associados à infertilidade masculina (Holoyake et al., 2001; Spiropoulos et al., 2002). Num estudo realizado por Holoyake e colaboradores (1999, 2001), identificaram-se duas mutações pontuais específicas situadas nos nucleótidos 9055 e 11719, frequentes em homens com parâmetros de sémen abaixo dos valores normais. Diferente autor, Spiropoulos et al. (2002), demonstrou, igualmente, a presença de uma mutação herdada por via materna, A3243G, numa amostra de sémen de um paciente com quantidades consideráveis de moléculas mutadas. Em alguns estudos reconheceu-se a existência de certas deleções de grande escala no genoma mitocondrial, como a vulgar deleção de 4977pb, cuja incidência aumenta em fracções baixas de Percoll (Kao et al., 1995). Do mesmo modo, observaram-se a persistência de duas outras deleções, uma com 7345pb de tamanho e outra com 7599pb, em amostras de sémen apresentando perturbações na mobilidade (Kao et al., 1998). Esta associação entre determinadas deleções e a redução na qualidade do sémen, tem sido alvo de controvérsia sendo, presentemente, um assunto conflituoso. A contestação destes resultados surgiu com estudos que tornaram patente a não existência de uma correlação directa das deleções de 4977pb (Cummings et al., 1998) e 7.4 *kilo* pares de bases (kb) (St. John et al., 2001) na

capacidade motora dos espermatozoides. É certo que, até 2005, não surgiram evidências suficientemente convincentes que permitam asseverar a influência das substituições do genoma mitocondrial no funcionamento dos espermatozoides, quer directamente como mutações somáticas, quer indirectamente através de fundos genéticos haplotípicos (Pereira et al., 2007). Recentemente, um novo estudo demonstrou a ocorrência de uma mutação C11994T, no estado homoplásmico, em todos os indivíduos oligoastenoespérmicos estudados de uma amostragem formada por homens com problemas de fertilidade, em oposição à total ausência na população controlo (Selvi Rani et al., 2006). Numa conclusão apriorística, estes resultados transmitem a falsa interpretação de a condição de oligoastenozoospermia ser uma desordem mitocondrial, tendo como principal causa a mutação C11994T no gene ND4. Todavia, o grupo de Pereira et al. (2008) refutou este sofisma mostrando a ausência de qualquer transição nessa posição em indivíduos portugueses classificados como oligoastenozoospérmicos.

### **1.5.2. Haplogrupos Mitocondriais**

Após a instituição definitiva do papel fundamental do genoma mitocondrial no metabolismo celular (De Benedictis et al., 1999; Ruiz-Pesini et al., 2000; Carrieri et al., 2001; Niemi et al., 2003; Mancuso et al., 2004; van der Walt et al., 2004), o intento de averiguar possíveis associações entre linhagens mitocondriais e patologias multifactoriais e o envelhecimento, levou à execução de diversos trabalhos com resultados profícuos para a área de estudo. A Tabela 1.3 apresenta algumas das variadas doenças actualmente associadas a haplogrupos mitocondriais.

Tabela 1. 3 *Patologias Associadas aos Haplogrupos Mitocondriais. Tabela adaptada de Herrnstad & Howell (2004)*

Patologia	Haplogrupo	Associação	Referências
<b>LHON</b>	<b>J</b>	Alta penetrância (14484; 11778)	<i>Brown et al (1997) e Torroni et al. (1997)</i>
<b>LHON</b>	<b>H</b>	Baixa penetrância (14484)	<i>Howell et al. (2003)</i>
<b>AD</b>	<b>J; T<sup>a</sup></b>	Risco elevado; Risco reduzido	<i>Chagnon et al. (1999)</i>
<b>Occipital stroke</b>	<b>U</b>	Risco elevado	<i>Majamaa et al. (1998)</i>
<b>Mobilidade sémen</b>	<b>T; H</b>	Reduzida; Amplificada	<i>Ruiz-Pesini et al. (2000)</i>
<b>DIDMOAD</b>	<b>T</b>	“Disease clustering”	<i>Hofmann et al. (1997)</i>
<b>PD</b>	<b>J+K; J+T</b>	Risco reduzido; Risco elevado	<i>Van der Walt et al. (2003) e Ross et al., (2003)</i>

<sup>a</sup> Para algumas patologias tem sido proposto mais do que uma tendência. Por exemplo, Chagnon et al., (1999) reportou que o ADNmt pertencente ao haplogrupo J estava super-representado nos doentes com AD, enquanto os pertencentes ao haplogrupo T prevaleciam na população controlo. Os resultados para a mobilidade espermática e PD estão sumarizados de forma semelhante.

A ausência de recombinação intercromossomal na molécula de ADNmt permite ao fundo genético mitocondrial, de onde uma nova mutação é oriunda, ser conservado e transmitido em bloco. Por conseguinte, ao averiguar-se uma associação entre um haplogrupo mitocondrial e um grupo de homens subférteis, é legítimo inferir que uma suposta mutação tenha surgido juntamente com, ou depois, do polimorfismo que define esse haplogrupo em particular. Sendo a disfunção espermática a principal consequência fenotípica causada por alterações no genoma mitocondrial (Ruiz-Pesini et al., 2000), estas apresentam a capacidade de se fixarem como variantes estáveis, visto o modo de transmissão matrilinea impedir a acção da pressão selectiva no ADNmt na linhagem paterna (Frank & Hurst, 1996). Este novo raciocínio abriu novas direcções na investigação de possíveis relações entre fenótipo-genótipo (Howell et al., 2003; Quintana-Murci et al., 2003; Torroni et al., 2003). Efectivamente, Ruiz-Pesini e colaboradores (2000), ao investigarem variantes mitocondriais fixos, com prováveis consequências fenotípicas na qualidade do sémen humano, observaram uma associação positiva entre o haplogrupo T, haplogrupo relativamente frequente em populações euro-asiáticas, e a ocorrência da condição de astenozoospermia. Foi proposto que a contribuição do haplogrupo em particular na promoção deste fenótipo estaria, provavelmente, relacionada com uma maior sensibilidade intrínseca da cadeia de produção de energia, a uma variedade de factores ambientais e genéticos. O inverso foi verificado para o haplogrupo H.

O conceito de uma associação positiva entre uma linhagem mitocondrial e o fenótipo de infertilidade masculina subsistiu até 2005, momento em que Pereira e colaboradores tornaram evidente a ausência de qualquer relação entre haplogrupos mitocondriais de 101 indivíduos do Sul de Portugal com oligozoospermia e uma população controlo da mesma região. Como previamente descrito para o cromossoma Y, a subestrutura ou microestrutura da população mitocondrial potencia a introdução de sinais falaciosos, ludibriando o investigador em estudos envolvendo haplogrupos, podendo ter sido esta a vulnerabilidade do estudo realizado anteriormente. Presentemente, é reconhecido que como resultado do menor número efectivo populacional dos marcadores haplóides em relação ao autossómicos, a sua diversidade genética e distribuição mundial apresentam uma estruturação geográfica superior, dificultando a determinação de amostras adequadas para estudos caso-controlo.

## **1.6. O CROMOSSOMA Y**

O cromossoma Y, inicialmente um autossoma homólogo ao cromossoma X com tamanho e número de genes semelhante, diferenciou-se nos primórdios da evolução dos mamíferos, com a aquisição da importante função na diferenciação do sexo. Ao longo do tempo, as alterações no cromossoma Y instigaram à inibição da recombinação com o cromossoma X, nas áreas em redor dos genes determinantes do sexo. Como resultado, 95% do cromossoma Y está isento do fenómeno de recombinação, sendo conhecido por região não recombinante (NRY). No entanto, estudos ulteriores evidenciam que a recombinação (*crossing-over*) ocorre verdadeiramente e com relativa abundância, renomeando-a, então, para região com especificidade masculina (MSY, Rozen et al., 2003). A região NRY encontra-se flanqueada, em ambos os lados, por regiões pseudo-autossómicas (PAR 1 e PAR 2), onde a

recombinação entre X-Y é um evento normal e frequente na meiose masculina (Cooke et al., 1985; Simmler et al., 1985; Freije et al., 1992; Li & Hamer, 1995; Lien et al., 2000). A supressão de fenómenos de recombinação teria o intento de preservar os genes benéficos que se acumularam próximo aos genes determinantes do sexo, auferindo protecção a esta região de especificidade masculina (Lahn et al., 2001; Skaletsky et al., 2003; Graves, 2006). Na ausência de recombinação, as mutações deletérias acumularam-se, danificando alguns genes exclusivos do cromossoma Y até perderem a sua funcionalidade, tornando-se “lixo” genético. É assumido que este cromossoma humano, e tendo em conta que era idêntico ao cromossoma X há 300.000 anos, tenha perdido 1.393 genes dos seus supostos 1.438, retendo assim, apenas metade de um gene por mega pares de bases (Mb) do seu genoma. Valor irrisório, quando comparado aos 10 genes por Mb verificado no cromossoma X (Graves, 2004). Porém, a ocorrência com relativa frequência de amplificações dentro do cromossoma, parece ter equilibrado esta inevitável decadência manifesta nos sistemas genéticos haplóides. Para contrabalançar o efeito nocivo resultante da ausência de recombinação, o cromossoma Y desenvolveu competências para remover erros genéticos, com o envolvimento das suas estruturas palindrómicas em processos de conversão génica (Rozen, 2003; Bosch et al., 2004). Usufruindo de partes de si mesmo, como cadeia molde para corrigir os eventuais erros, manteve a integridade dos poucos genes que carrega. Este processo de degeneração terá sido igualmente acompanhado pela aquisição de novos genes com funções exclusivamente masculinas, conservando assim os residuais genes ancestrais, como o gene responsável pela determinação do sexo (SRY).

Actualmente, o cromossoma Y humano compreende somente 86 genes funcionais. É excessivamente pobre a nível genético, quando comparado com os 717 genes presentes no cromossoma X de 160 milhões de pares de base. Dos seus 23 Mb de eucromatina pseudo-autossómica, responsável pela codificação de 27 proteínas diferentes (Skaletsky et al., 2003), 8Mb pertencem ao seu braço curto (Yp) e 14.5Mb ao longo (Yq) (Figura 1.10). Adicionalmente aos dois blocos de heterocromatina primariamente descritos, um no centrómero com aproximadamente 1Mb (Tyler-Smith et al., 1993) e um outro maior, abrangendo uma

considerável porção do braço distal, com cerca de 40 Mb, é evidenciada a existência de um terceiro bloco de heterocromatina, apresentando cerca de 400kb com 3.000 repetições em tandem de 125pb, que interrompe as sequências de eucromatina do braço proximal Yq (Skaletsky et al., 2003).

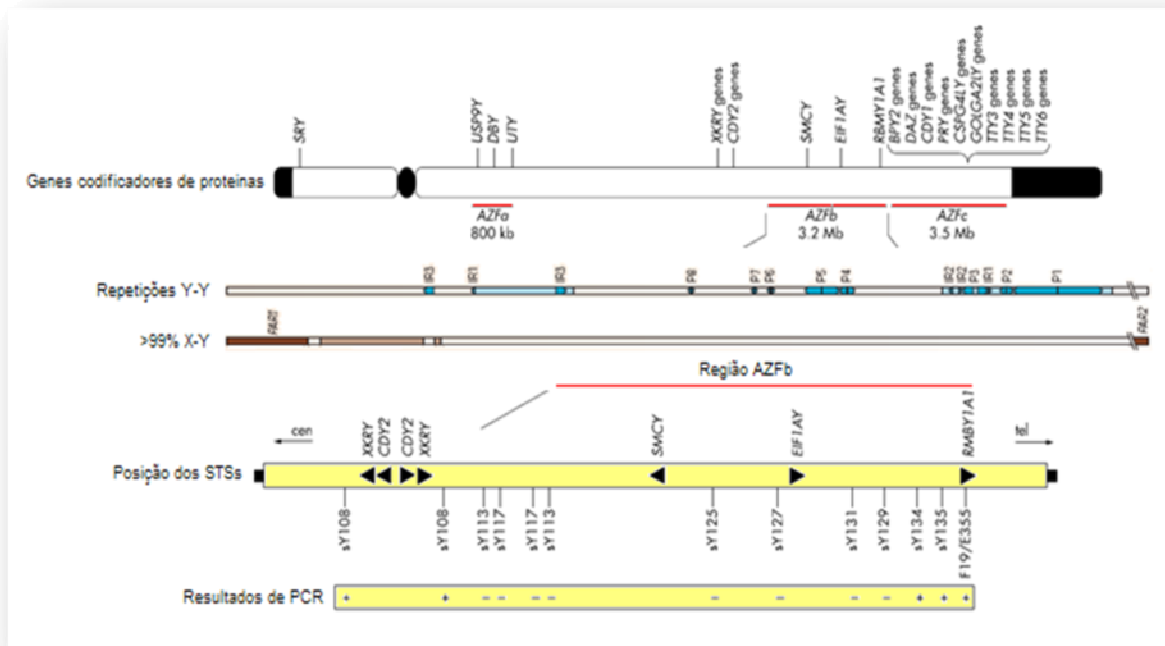


Figura 1. 10. Representação esquemática do cromossoma Y. É baseada na informação da sequência de ADN derivada majoritariamente de um único indivíduo pertencente ao haplogrupo R (Skaletsky et al., 2003). Heterocromatina está presente no centrômero e nos telômeros e intercalada com a eucromatina ao longo do resto do cromossoma. O centrômero divide o cromossoma num braço curto e longo. As regiões pseudo-autossômicas (5%) estão localizadas em ambos os lados. São as únicas porções ainda idênticas às regiões correspondentes do cromossoma X. Características estruturais incluem três regiões satélite (não indicadas), segmentos com identidade X-Y (PAR1 e PAR2; castanho escuro) e com alta similaridade (castanho claro), e sequências repetidas Y-Y onde as sequências com alta similaridade estão designadas por "IR", de repetições invertidas, e "P" para "palíndromas". Em baixo, está ampliada a região AZFb e regiões circundantes e a posição dos STSs utilizados num screening preliminar. Os genes estão orientados 5'3' pelos triângulos a preto. De seguida, estão indicados os resultados de PCR (+, amplificação normal; -, sem amplificação). Figura adaptada de Jobling & Tyler-Smith (2003) e Ferlin et al. (2003).

Os amplicões, segmentos de ADN resultantes de fenômenos de duplicação génica, característicos do braço Yq têm a particularidade de apresentarem oito estruturas palindrômicas que atingem 5.7Mb ou 1/4 da eucromatina da região NRY. Durante algum tempo, acreditou-se conter uma respeitável quantidade de ADN não funcional, particularmente não polimórfico. Todavia, devido ao seu real interesse médico associado à infertilidade masculina (ex. Vogt, 1998, 2004, 2005; Lin et al., 2005), a sua composição nucleotídica deixou de ser

somente direccionada para as porções AZFa e AZFc (Sun et al., 2000; Kuroda-Kawaguchi et al., 2001). Seis das oito famílias de genes identificadas até à data na região NRY localizam-se exclusivamente nestas estruturas, como os genes DAZ que ocorrem em 4 cópias, duas em cada palindroma P1 e P2 (Skaletsky et al. 2003). Adicionalmente, os amplicões incluem cinco conjuntos de repetições invertidas, IR (Schwartz et al., 1998; Tilford et al., 2001) e uma variedade de longos arranjos em tandem (Skaletsky et al., 2003). Analogamente ao ADN mitocondrial, o cromossoma Y ostenta algumas características evolutivas particulares e não usuais.

### **1.6.1. Características Particulares**

Devido às suas características singulares, devem ser seguidas estratégias alternativas para o estudo do cromossoma Y. De facto, as suas propriedades confrontam todas as normas surgidas no âmbito da genética humana, desde o seu papel não essencial à vida de um indivíduo, pois as mulheres não o possuem, à sua escassez de genes e excesso de repetições em tandem. Surpreendentemente, tais características são responsáveis pelo seu estatuto em estudos de investigação sobre a evolução humana recente, bem como nas áreas da Genética Médica e Genética Forense.

Por ser essencial na diferenciação sexual, o cromossoma Y é exclusivamente masculino, haplóide e com herança unicamente paterna, isto é, transmitido inalterado, apenas e somente, de pais para filhos. Os maiores rearranjos estruturais na sua história evolutiva impediram fenómenos de emparelhamento e recombinação com o cromossoma X, facilitando a extensão da região NRY ao longo do cromossoma Y (Lahn & Page, 1999; Lahn et al., 2001; Skaletsky et al., 2003). A ausência de um homólogo sugere que o cromossoma Y evade ao processo de recombinação, sendo transmitido intacto para as gerações seguintes. Consequentemente, os haplótipos, ou seja, as combinações alélicas estáveis dos marcadores ao longo do cromossoma são habitualmente transmitidos de geração em geração, sofrendo

alterações apenas por mutação e preservando, assim, informação única e simplificada da sua história evolutiva. Contudo, existem situações onde o processo de recombinação pode realmente ocorrer sob forma de episódios de conversão génica entre os parálogos, ou regiões pseudo-autossómicas, PAR 1 e PAR 2 (Rozen et al., 2003).

A transmissão exclusiva do cromossoma Y através da linha germinativa masculina declara ser mais mutagénica que a linha germinativa feminina, incitando uma alta frequência de mutações. Apesar da quantidade de genes e do empobrecimento observado no cromossoma Y, este é enriquecido por diversos tipos de repetições, onde se incluem os elementos nucleares, SINES, retrovirus endógenos e duplicações de segmentos. Estima-se que surgiu há 40 milhões de anos (Bailey et al., 2002) e que cerca de 5.2% do seu genoma está duplicado, colocando-o num estado susceptível a rearranjos por processos de recombinação homóloga não alélica, originando níveis expressivos de polimorfismos entre os humanos, o que traz implicações profundas no nosso genoma.

As mutações observadas são originadas exclusivamente por processos intra-alélicos e, embora este processo ocorra em todos os cromossomas, no Y haplóide não há interferência de demais factores, como eventos interalélicos e diversidade alélica (tornando estes estudos no cromossoma Y essenciais e importantes). Tais polimorfismos são responsáveis pelo carácter imprescindível do cromossoma Y em estudos evolutivos e filogenéticos, pois permitem identificar marcadores moleculares que, dependendo da sua taxa de mutação, são utilizados, quer na caracterização de linhagens paternas ancestrais, marcadores de eventos únicos (UEPs), quer no estudo da variabilidade entre essas linhagens, haplogrupos, como os microssatélites que apresentam taxas mutacionais mais elevadas. Existem hoje, mais de 600 polimorfismos binários adequadamente caracterizados.

O cromossoma Y, de modo semelhante ao genoma mitocondrial, apresenta um tamanho efectivo populacional de 1/4 em relação a qualquer outro autossoma, observando-se assim, uma variabilidade na sua sequência menos expressiva que em qualquer outro local no genoma

nuclear (Hammer, 1995a; Thomson et al., 2000). Esta particularidade torna-o mais susceptível à acção do fenómeno de deriva genética que, com o envolvimento de alterações aleatórias na frequência haplotípica, devido à amostragem de uma geração para outra, acelera a diferenciação entre grupos do cromossoma Y nas diferentes populações. Característica útil na investigação de eventos passados.

### **1.7. O CROMOSSOMA Y COMO MARCADOR GENÉTICO**

A acumulação de mutações ao longo do tempo, e conseqüente transmissão à descendência masculina, permite traçar um passado histórico directo, caracterizando linhagens patrilineas. Após a descrição do primeiro polimorfismo, há cerca de 18 anos, o cromossoma Y tem liderado os estudos evolutivos como sistema altamente informativo. A importância dos microssatélites do cromossoma Y reflecte-se na área das Ciências Forenses, onde um conjunto de nove microssatélites é profusamente utilizado e forma a base para três principais bases de dados forenses cobrindo a Europa, Estados Unidos da América e a Ásia, a partir das quais se podem estimar frequências haplotípicas populacionais (Roewer et al., 2001; Kayser et al., 2002) (Figura 1.11).

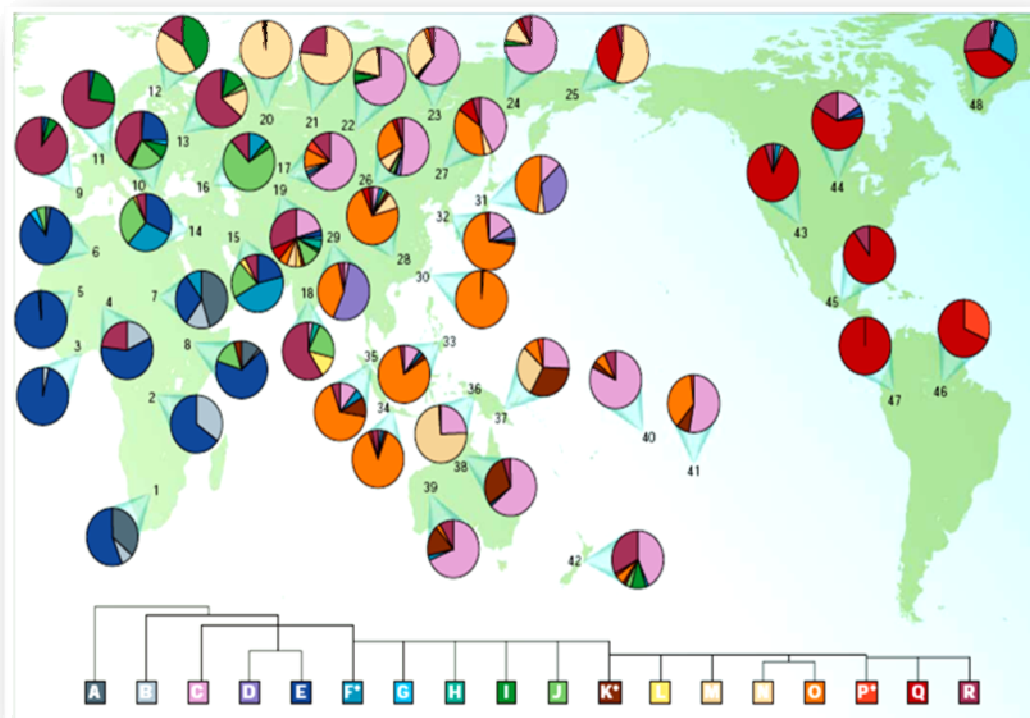


Figura 1. 11. Distribuição mundial dos haplogrupos do cromossoma Y. Figura transcrita de Y Chromosome Consortium (YCC, 2002) (Acedida a 29 de Janeiro de 2008).

### 1.7.1. Estudos Filogenéticos e o Cromossoma Y

A correcta identificação e aplicação dos polimorfismos binários associados à região NRY, que preservam o legado genético paterno humano, permitem inferir sobre a evolução humana, as afinidades populacionais, bem como a história demográfica (Hammer & Zegura, 1996). A filogenia do cromossoma Y está presentemente bem estabelecida, com os principais ramos da árvore genética justamente identificados, restando apenas algumas linhagens por estudar. Contrariamente, a nível cronológico ainda se alterca a idade aceitável para o ancestral comum recente dos cromossomas Y contemporâneos. A árvore genética do cromossoma Y diferencia 32 linhagens originadas de 56 variantes detectadas num estudo feito por Thomson et al. (2000), recorrendo a uma mutação no ADN, com cerca de 64 kb, presente em 43 indivíduos. Ainda que, menos pormenorizada que a árvore filogenética do ADNmt, manifesta diversas similaridades. Exibe uma separação completa entre as linhagens africanas e não africanas com as duas primeiras ramificações indicando exclusivamente linhagens africanas e o terceiro

ramo abrangendo ambas as linhagens africanas e não africanas. A presumível idade para o ancestral comum mais recente de toda a filogenia ronda os 59.000 (40-140) anos, assumindo 25 anos/geração, enquanto para o ancestral comum mais recente da ramificação entre a linhagem africana e não africana os 40.000 (31-79) anos. A árvore filogenética original, publicada em 2002 pelo Y Chromosome Consortium (YCC, 2002), evidenciava as relações entre 153 haplogrupos baseados em 243 polimorfismos únicos, representando a maior parte dos marcadores binários conhecidos até à data (Karafet et al., 2008). Vários estudos populacionais, a nível mundial, trouxeram novas informações aditando novos marcadores moleculares (Underhill et al., 1997; Karafet et al., 2008) aos primariamente caracterizados (Hammer & Zegura, 1996). Actualmente, o cromossoma Y providencia informação filogenética rigorosa com apoio em 311 haplogrupos definidos por um total de, aproximadamente, 600 marcadores binários (Karafet et al., 2008).

A Figura 1.12 apresenta a árvore filogenética do cromossoma Y simplificada indicando somente os 20 principais haplogrupos.

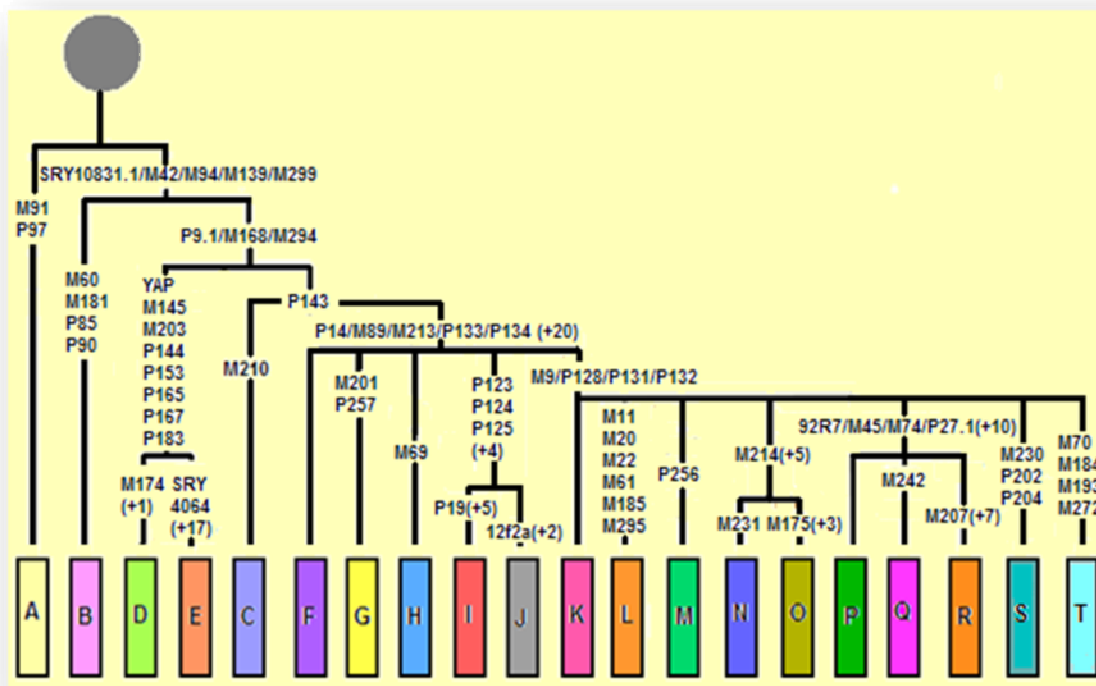


Figura 1. 12. Árvore filogenética simplificada dos haplogrupos do cromossoma Y. Apenas é indicada os principais haplogrupos de A - T com os respectivos marcadores binários. A raiz está representada pelo círculo a cinzento. A filogenia baseia-se na recentemente descrita em Karafet et al. (2008).

Da análise global filogeográfica do cromossoma Y surge a certeza de uma especificidade geográfica relevante, sugerindo o continente africano, presumivelmente a zona Este, como o reputado local de sua origem (Underhill et al., 2000, 2001; Hammer et al., 2001; Ke et al., 2001). As linhagens mais profundas da filogenia do cromossoma Y retratam-se nos dois principais haplogrupos A-M91/P97 e B-M60/M181/P85/P90, com uma distribuição quase exclusiva na África Subsariana (Karafet et al., 2008). Reflectindo uma modesta frequência, na ordem dos 6-7% (Underhill et al., 2000; Semino et al., 2002; Wood et al., 2005; Rosa et al., 2007), demonstra que a variabilidade do cromossoma Y moderno procedeu, recentemente, do continente africano. A dispersão mundial do cromossoma Y moderno tem, assim, sido interpretada segundo a hipótese “Out of Africa” encontrando apoio de diversos autores (Calafell et al., 1998; Hammer et al., 2001; Underhill et al., 2001, Yu et al., 2002).

O marcador M168 (=P9) demarca o ponto central da expansão de África (Figura 1.12), sendo basilar a todas as restantes classes encontradas fora do continente. De entre as múltiplas estimativas para o último ancestral comum a todos os cromossomas Y não africanos, a mais recente está estipulada nos 80.000 anos com a diferenciação do haplogrupo B e subsequente diversificação por volta dos 60.000 anos (Underhill & Kivisild, 2007). Admite-se uma primeira migração pelo Sul do continente africano, ao longo do Oceano Índico (Lahr & Foley, 1994; Stringer, 2000, 2003; Bowler et al., 2003) e outra ulterior, em direcção à Eurásia via o corredor de Levantine (Bar-Yosef et al., 1986, 2002). Com efeito, os haplogrupos encontrados no sudeste da Ásia e na Austrália são distintos dos haplogrupos presentes no resto do continente asiático e na Europa (Figura 1.13).

As linhagens colonizadoras do Oeste da Eurásia estão reflectidas nos grupos F-M89 e K-9 (Rosser et al., 2000; Semino et al., 2000; Underhill et al., 2000; Hammer et al., 2001; Wells et al., 2001; Hammer & Zegura, 2002; Kivisild et al., 2003), suportando a ideia de ter sido o Sudoeste da Ásia o primeiro local a ser atingido pela migração.

Após a colonização inicial da Eurásia, a composição genética do cromossoma Y evoluiu, originando grupos modestos de humanos modernos albergando as linhagens fundadoras C, F

e K que dispersaram, desenvolvendo variantes com especificidade geográfica (revisto em Underhill, 2003). O haplogrupo E expandiu-se maioritariamente em África, Oeste da Ásia e Europa, ao passo que o haplogrupo F e suas subdivisões invadem a maioria das regiões fora de África. A Noroeste da Ásia e Europa predominam os haplogrupos I, J, N e R. Estas observações permitem-nos ponderar sobre a possibilidade de os haplogrupos C, D, M e O terem vindo com a migração pelo Sul, enquanto os I, J, N e R emergido com a migração pelo Norte (Jobling & Tyler-Smith, 2003). Esta concentração dos haplogrupos C, D e O (uma subdivisão do haplogrupo F) a este da Ásia, em contraste com a mais expressiva distribuição dos haplogrupos E, I, J, N e P a Norte e Oeste do continente asiático, sugere uma diferenciação de Sudeste para Noroeste como já observado para o ADN mitocondrial. Recentemente, o haplogrupo previamente descrito como K2 (K-M70) (YCC, 2002) foi renomeado para haplogrupo T (Karafet et al., 2008), sendo encontrado em baixas frequências no Médio Oriente, África e Europa (Underhill et al., 2002; King et al., 2007). De igual forma, o haplogrupo K-M230 passou a ser conhecido por clado S e observado predominantemente na Oceania e Indonésia (Kayser et al., 2006; Scheinfeldt et al., 2006).

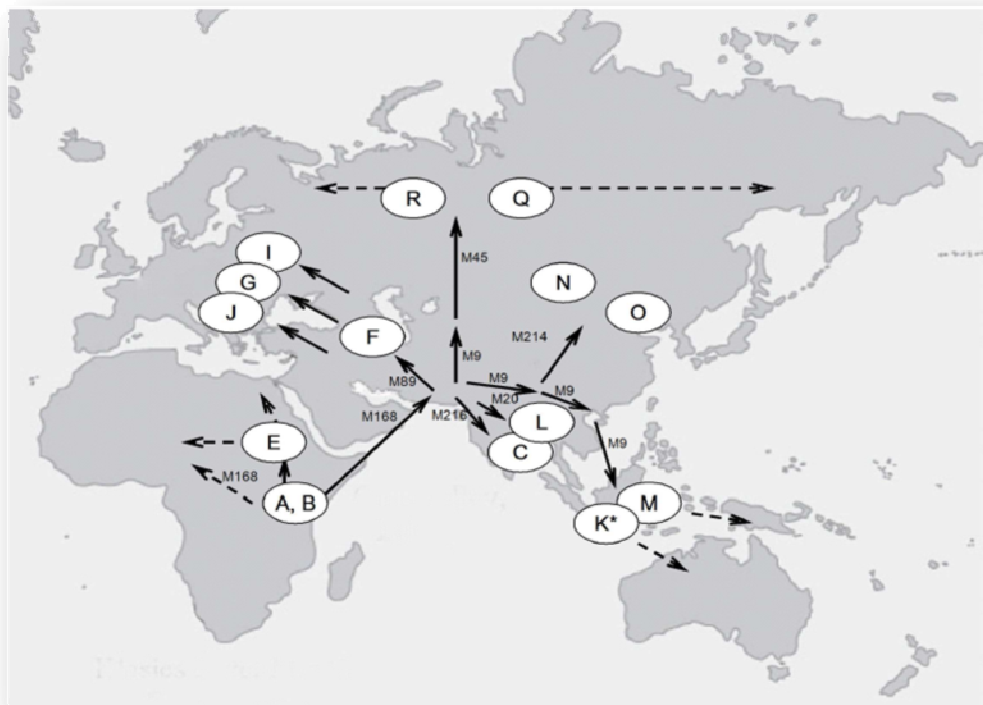


Figura 1. 13. Reconstrução esquemática da origem e dispersão mundial do super-haplogrupo F-M89 do cromossoma Y, com subsequente diversificação das linhagens M9. As linhas preenchidas não indicam trajetectos de migração precisos mas apenas a

direcção das deslocações. As linhas a tracejado indicam deslocações subsequentes dos grupos. Figura transcrita de Rosa A. (2007).

## 1.8. O CROMOSSOMA Y E A INFERTILIDADE MASCULINA

O primeiro indício do envolvimento de factores genéticos na falência espermática (Tiepolo & Zuffardi, 1976), veio confirmar a susceptibilidade da linha germinativa a alterações mutagénicas e pró-mutagénicas (Tiepolo & Zuffardi, 1976). A instabilidade genética resultante desta variabilidade, embora responsável pela diversidade genética necessária ao processo evolutivo, favorece a criação de mutações responsáveis por patologias genéticas, como o cancro e a infertilidade. O carácter vulnerável do cromossoma Y às alterações no ADNmt poderá provir da sua incapacidade de participar no mecanismo de reparação, através de eventos de recombinação. São conhecidos dois tipos de fontes mutagénicas: erros na replicação correlacionados com a idade e fragmentação do ADNmt provocado por recombinações aberrantes, uma deficiente compactação da cromatina, apoptose abortiva e stress oxidativo. Avanços recentes têm implicado dois factores triviais na promoção da infertilidade masculina, o stress oxidativo e as deleções no cromossoma Y.

Este genoma haplóide é particularmente susceptível a deleções devido à sua inabilidade para recombinar e assim eliminar os erros presentes. A observação da perda da capacidade motora dos espermatozóides sujeitos a condições elevadas de oxigénio *in vitro* (MacLeod, 1943), firmou o carácter susceptível das células germinativas ao stress oxidativo (MacLeod, 1943). Capazes de produzir peróxido de hidrogénio a partir do oxigénio, ou seja, espécies de oxigénio reactivas, exacerbam o stress oxidativo e comprometem assim a viabilidade do sémen. O resultado nocivo imposto pelo stress oxidativo atinge não só a capacidade espermática das células, bem como a integridade do seu genoma presente no núcleo e mitocôndrias, sendo a correlação entre o stress oxidativo e a fragmentação do ADN, real. O recurso à infertilidade, perante a presença de tais danos no cromossoma Y, pode ser

examinado como um mecanismo de defesa com o intuito de limitar a propagação das mutações na linha germinativa (Aitken & Krausz, 2001).

As microdeleções no cromossoma Y (Yq) têm vindo a conquistar o primeiro lugar na causa molecular mais frequente para a infertilidade severa (Foresta et al., 2001). Como resultado da composição das populações estudadas, as estimativas para a sua incidência entre homens inférteis diferem de estudo para estudo, variando de 1% a 55% (Krausz et al., 1999). Não obstante esta disparidade, as deleções no cromossoma Y ocorrem com uma considerável frequência, revelando a sua particular susceptibilidade à perda espontânea de material genético. A maioria procede da recombinação intra-cromossômica homóloga entre as suas estruturas palindrômicas, cujas sequências são quase completamente idênticas (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001). Com excepção dos casos herdados, surgem frequentemente como eventos *de novo*, produzindo simultaneamente a perda de vários genes situados nas zonas AZFb e AZFc (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001; Stuppia et al., 2001; Ferlin et al., 2003). As deleções na região AZFa surgem com menor frequência, envolvendo apenas dois genes. A deleção por completo de AZFc (deleção 2b/4b) remove oito famílias de genes, incluindo todos os membros da família do gene DAZ responsável pelo fenótipo da infertilidade (Vogt et al., 1995; Foresta et al., 2001; Kuroda-Kawaguchi et al., 2001; Reijo et al., 1995; Oates et al., 2002; Repping et al., 2002; Ferlin et al., 2005). Na causa para a falha espermática e consequente infertilidade masculina, estão as deleções AZFc (Reijo et al., 1995; Vogt et al., 1996), apesar das deleções no cromossoma Y não serem completamente incompatíveis com a fertilidade. Têm sido descritos casos onde a transmissão natural de deleções AZFc de pai para filho foi observada (Krausz et al., 2001; Saut et al., 2000) indicando, talvez, a influência de efeitos ambientais ou fundos genéticos na variabilidade de fenótipos entre pais e filhos.

As deleções das cópias DAZ2, DAZ3 e DAZ4 (Figura 1.14), encontradas tanto em homens férteis como inférteis, são consideradas variantes familiares herdadas de pais para filhos (Vogt et al., 1996; Saxena et al., 2000; Fernandes et al., 2002, 2004). Já as deleções de



inférteis (Kuroki et al., 1999), mesmo sem uma confirmação ulterior dos resultados (Carvalho et al., 2003). Outras possíveis associações entre os haplogrupos e a infertilidade foram evidenciadas na população japonesa com o haplogrupo D2b e numa amostra dinamarquesa com o haplogrupo K\* (xP) (Krausz et al., 2001). A linhagem ancestral do Norte da Europa e Ásia, o haplogrupo N, parece estar associada à deleção 2b/3b e DAZ3/DAZ4 (Ferlin et al., 2005), enquanto, nalgumas populações italianas encontram-se diferenças significativas entre amostras controlo e inférteis (Previdere et al., 1999). Já em populações europeias, a associação entre microdeleções do Y e a infertilidade não foi perceptível (Paracchini et al., 2000; Quintana-Murci et al., 2001), exceptuando numa população dinamarquesa (Quintana-Murci et al., 2001).

Apesar das evidências, estes estudos pecam pela falta de confirmação dos seus resultados. Para a maioria dos estudos que sugerem uma associação, os resultados não foram reproduzidos (Kuroki et al., 1999; Carvalho et al., 2003), tirando-lhes a fiabilidade, enquanto noutros esse facto seria passível de ser justificado pelo fenómeno de estrutura populacional (Previdere et al., 1999). Logo, não se chegaram a resultados conclusivos sobre o papel dos haplogrupos Y na infertilidade ou em associação com microdeleções Y. No entanto, devido à especificidade geográfica de variantes do cromossoma Y, a ausência de associação não implica que se verifique o mesmo noutras populações onde predominam linhagens diferentes.



## **OBJECTIVOS DA PRESENTE INVESTIGAÇÃO**

Da complexa sinergia entre o ADN mitocondrial e a fixação de uma patologia surge um padrão patogénico albergando um conjunto de situações diversas, com influência sobre a etiologia da mesma. O grau de penetrância de certas mutações patogénicas do ADN mitocondrial tem sido associado ao fundo genético onde ocorrem, daí a importância de se adquirir conhecimento sobre as variantes mitocondriais e seus respectivos haplótipos, na pesquisa de possíveis mutações patogénicas no ADN mitocondrial. Tais genótipos passíveis de conferir risco têm sido associados à infertilidade masculina.

No presente estudo de natureza descritiva explora-se, numa primeira fase, a possível existência de um determinado haplótipo mitocondrial com capacidade de influenciar a fixação da infertilidade masculina. Numa abordagem ulterior, especula-se a possibilidade de uma particular combinação entre os haplótipos do ADN mitocondrial e os haplogrupos do cromossoma Y de contribuir para o risco da patologia em estudo. Pretende-se assim, amplificar o conhecimento sobre a variação haplotípica do ADN mitocondrial e cromossoma Y e suas relações com a patologia, acrescentando novas informações vantajosas no campo Médico e Clínico.



## Materiais e Métodos

---



## **CAPÍTULO II**

### **II. MATERIAIS E MÉTODOS**

Neste capítulo descreve-se a metodologia adoptada e todo o trabalho experimental que permitiu a realização da presente dissertação. Inclui-se no capítulo a caracterização do objecto de estudo, a metodologia laboratorial das amostras e o conseqüente processo de análise dos dados obtidos.

#### **2.1 Amostra Populacional**

O recrutamento de amostras de indivíduos teve lugar no Norte de Portugal através do Serviço de Genética da Faculdade de Medicina do Hospital de São João do Porto, cedidas, posteriormente, ao Laboratório de Genética Humana da Universidade da Madeira (LGH) para a realização da investigação proposta. Foram analisadas amostras de ADN mitocondrial de duas populações caso e controlo. Da população caso fizeram parte 122 indivíduos inférteis dos quais, 95 previamente estudados pelo grupo do Laboratório de Genética Humana para os haplogrupos do cromossoma Y, padrão do gene DAZ e variados síndromas clínicos definidos (Fernandes et al., 2006). Todos os pacientes apresentavam um cariótipo normal (46, XY). A população controlo resumiu-se a 90 indivíduos férteis, dos quais 80 caracterizados para o cromossoma Y e padrão do gene DAZ num estudo prévio realizado pelo LGH (Fernandes et al., 2006). Os dados foram analisados com o consentimento informado de todos os indivíduos envolvidos no estudo.

#### **2.2. Metodologia Experimental**

A classificação dos haplogrupos humanos baseados em marcadores genéticos, especificamente por meio de polimorfismos de substituição de um nucleótido, SNPs, tem evoluído nos últimos anos à medida que novos marcadores são identificados. A caracterização dos sistemas genéticos, cromossoma Y e ADNmt, resulta do estudo hierárquico dos variados polimorfismos de acordo com as frequências dos haplogrupos e com a ordem de ocorrência dos eventos mutacionais.

A metodologia preferencialmente praticada no estudo dos polimorfismos do ADN mitocondrial consiste na amplificação da região controladora através da técnica de PCR e na subsequente sequenciação do produto amplificado. São, então, identificadas mutações pontuais, inserções e deleções em relação à sequência padrão de referência descrita, primeiramente, por Anderson (1981) e revista, posteriormente, por Andrews (1999).

### 2.2.1. Extração de ADN

Todo o processo de extração de ADN das amostras aqui estudadas foi efectuado no Serviço de Genética da Faculdade de Medicina do Hospital de São João do Porto. A extração de ADN seguiu o método modificado, comumente utilizado, de *Salting-Out* (Miller et al., 1988). Seguidamente, as amostras foram cedidas ao Laboratório de Genética Humana da Universidade da Madeira (LGH), para o prosseguimento do trabalho de investigação.

### 2.2.2. Estudo do ADN mitocondrial

Estima-se que a média de ocorrência de diferenças nos pares de bases entre dois genomas mitocondriais varia entre 9.5 a 66 alterações (Zeviani et al., 1998). Por apresentar uma alta taxa mutacional, revertendo na acumulação de uma expressiva variabilidade de substituições nucleotídicas neutras com especificidade populacional, a molécula de ADN

mitocondrial tem sido objecto de diversos estudos genéticos e moleculares. As populações humanas podem, assim, ser divididas em diversos haplogrupos baseadas em SNPs específicos. O termo haplótipo é usado para descrever a variabilidade da região HVS-I e HVS-II. Para a análise da variabilidade das sequências de ADN mitocondrial é seleccionado o segmento da região HVS-I compreendido entre os nucleótidos 16024 e 16385 (Anderson et al. 1981) e os locais polimórficos definidores dos haplogrupos na região codificante.

### 2.2.2.1. Estudo da região controlo (HVS-I)

A caracterização dos haplogrupos mitocondriais tem por base a particularidade da região controlo, ou “D-loop”, apresentar a maior taxa de variabilidade do genoma mitocondrial com os locais mais polimórficos concentrados nos seus dois segmentos hipervariáveis, HVS-I e HVS-II (Wilkinson-Herbots et al. 1996). Com o objectivo de caracterizar as amostras de ADNmt dos indivíduos em estudo, somente o segmento da região HVS-I, compreendido entre as posições 16024-16385, foi analisada para a identificação dos motivos correlacionados com os haplogrupos, definidos por variados SNPs mitocondriais. A Figura 2.1 mostra a sequência da região HVS-I, utilizada como referência na identificação dos variados haplogrupos, apresentando um motivo de polimorfismos típico da linhagem L1b.

```
16001 - attctaattt aaactattct ctgttctttc atggggaagc agatttgggt accaccaag tattgactca cccatcaaca
accgctatgt atttcgtaca ttactgccag ccacatgaa tattgtacgg taccataaat actgaccac ctgtagtaca
taaaaaccca atccacatca aaaccCctc cccatgctta caagcaagta cagcaatcaa ccCtcaacta tcacacatca
actgcaactc caaagccacc cctCacccaC taggatacca acaaacctac ccAcccttaa cagtacatag tacataaagc
catttaccgt acatagcaca ttacagtcaa atcccttctc gtcccatgg atgaccccc tcagataggg – 16389 (Haplótipo
L1b)
```

Figura 2. 1 Sequência da região HVS-I da sequência de referência CRS utilizada na caracterização dos haplogrupos mitocondriais. As letras a bold indicam o local de ocorrência de polimorfismo exemplificando um haplótipo característico da linhagem L1b.

### - Amplificação

Neste estudo foi amplificado por PCR o segmento hipervariável I do ADN mitocondrial da região controlo utilizando o par de *primers* L15907 (cadeia leve 15907-15928) e H16547 (cadeia pesada 16525-16547) desenhado no EBC (L15907 – 5' ATACACCAGTCTTGTAACC 3'; H16547 – 5' GGAACGTGTGGGCTATTTAGG 3').

A mistura de reacção consistiu em: 2µl - 3µl de ADN extraído; 0.3µl de Fire Pol Taq DNA polimerase (5U/ µl) (Solis Biodyne); 1.5µl de tampão de reacção 10X contendo 75mM Tris-HCl pH 8.8 a 25°C, 20mM NH<sub>2</sub> SO<sub>4</sub>, 0.01% Triton X-100, 0.5% Ficoll 400, 1 mM Tartrazine (Solis Biodyne); 1.6 µl de MgCl<sub>2</sub> (2.5 mmol/L) (Solis Biodyne); 0.4µl de dNTP's (0.2mmol/L) (Promega), 0.3µl de *primer forward* e *reverse* (10µmol/L) (Thermo Scientific) e dH<sub>2</sub>O esterilizada (Braun) até perfazer um volume final de 15µl.

As amplificações foram realizadas no termociclador “Biometra UNO II” usando as seguintes condições: um passo inicial de desnaturação a 94°C por 3min (activação da Fire Pol Taq) seguido de 40 ciclos de amplificação compreendendo os passos de desnaturação a 94°C por 30 s, ligação a 58°C durante 30s e extensão a 72°C por 45s, seguindo-se uma extensão final a 72°C por 5min.

#### **- Determinação grau de pureza**

Uma alíquota de 4µl de produto de PCR foi fraccionada, por electroforese, num gel de agarose a 1.2%, contendo 0.5µg/ml de brometo de etídeo, para a determinação de pureza e tamanho dos fragmentos de ADN. As corridas electroforéticas variaram entre os 30min a 45min aplicando uma voltagem constante de 90-100 volts (V).

#### **- Purificação dos produtos de amplificação**

Os fragmentos de amplificação correctamente identificados foram submetidos a um tratamento de purificação através de colunas de purificação GFX (Pharmacia), com Sephadex

G-50 (Amersham Biosciences).

### **- Sequenciação automática**

A mistura de reacção consistiu em: 1.6µl de BigDye Terminator (Applied Biosystems), 1.5µl de primer forward ou reverse (10µmol/L), 1µl – 2µl de produto PCR e  $d_2H_2O$  até perfazer um volume final de 10µl. As amplificações foram realizadas no termociclador “Biometra UNO II” usando as seguintes condições: 4min iniciais de desnaturação a 94°C, seguido de 35 ciclos compreendendo os passos de desnaturação a 94°C por 10s, ligação a 50°C por 5s e extensão a 60°C por 4s e um passo final de extensão durante 10min a 60°C.

Após a purificação dos produtos de PCR através de colunas de purificação GFX (Pharmacia) com Sephadex G-50 (Amersham Biosciences) e uma vez completamente secas as amostras, juntou-se formamida seguida de uma passo de desnaturação durante 3min a 94°C e 3min no gelo. A sequenciação foi efectuada num sequenciador automático “ABI PRISM<sup>tm</sup> 310 Genetic Analyser” (Applied Biosystems).

A região HVS-I foi sequenciada para a totalidade das amostras com a respectiva identificação e marcação dos polimorfismos. Foi dada preferência ao primer forward L15907 na amplificação embora recorrendo ao primer reverse H16547 sempre que necessário, como quando presente a uma má resolução da sequência forward ou nas situações onde ocorreu a conhecida substituição de uma timina por citosina nas regiões *poli C* das regiões hipervariáveis.

As sequências obtidas foram alinhadas com a Sequência de Referência de Cambridge revista (Figura 2.2) e editadas no programa informático “SeqMan – DNASTar”. A maioria das sequências mitocondriais quando alinhadas com a sequência rCRS apresentaram motivos que permitiram a colocação apriorística das mesmas em haplogrupos específicos. A Figura 2.2 exemplifica a identificação de polimorfismos na região HVS-I tendo como referência a sequência rCRS. Todos os polimorfismos observados são correctamente anotados, resultando num motivo característico de um dos haplogrupos da filogenia do ADNmt.

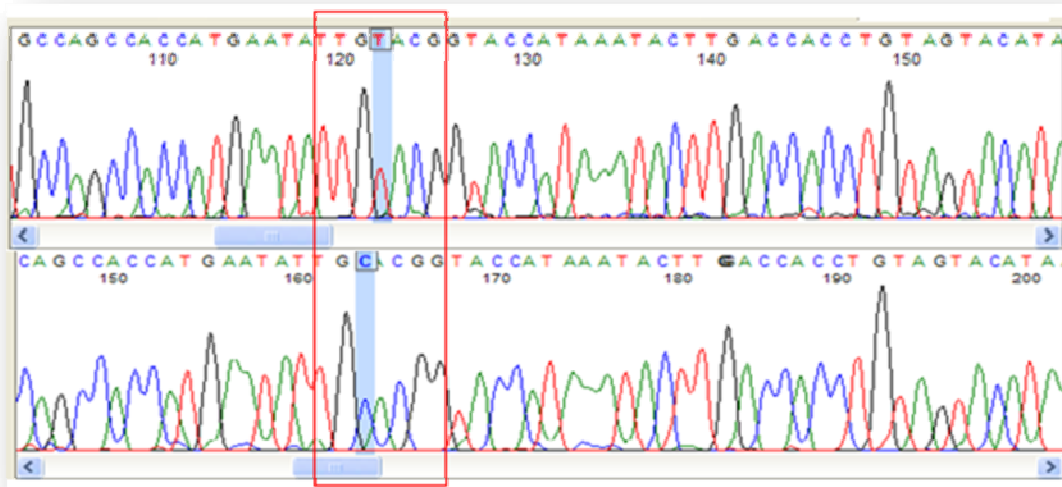


Figura 2. 2. Comparação de electroferogramas. Está representado o electroferograma de um segmento da região HVS-I da sequência rCRS e de uma amostra analisada neste estudo. A inversão T/C na posição 16126 assinalada pela caixa vermelha e a sombra indica a presença de um polimorfismo característico do haplogrupo J.

Todas as sequências mitocondriais foram, primariamente, classificadas com base nos motivos de polimorfismos apresentados na região HVS-I. Utilizam-se números absolutos (-16000) na descrição da posição nucleotídica do polimorfismo relativamente à sequência rCRS. É prática comum apenas indicar, com letras, as alterações nucleotídicas resultantes de transversões (ex. 16114CA), evitando rotular as transições (ex. 16093TC), visto tais alterações poderem ser certificadas através da sequência rCRS (Richards et al., 1998).

#### 2.2.2.2. Estudo da região codificante

Devido à alta taxa mutacional e sua propensão para mutações recorrentes, a tipagem dos haplogrupos firmada somente na informação transmitida pela região controlo é dubitável. O recurso aos SNPs distribuídos ao longo de toda a região codificante da molécula de ADNmt permite corroborar a fidelidade da análise destes haplótipos, bem como, diferenciar tais polimorfismos da região controlo filogeneticamente associados a um determinado haplótipo e assim, relativamente ancestral e estável, daquelas variantes recentes, sujeitas a mutações repetidas ou recorrentes (Bandelt et al., 1995). A escolha dos SNPs mitocondriais seguiu as seguintes considerações: i) os principais pontos na filogenia mitocondrial, obtidos de um

conjunto de sequências completas do ADNmt (Kivisild et al., 2006); ii) os haplogrupos mais frequentes entre as populações sujeitas ao estudo (Pereira et al., 2000; González et al., 2003), por exemplo, os haplogrupos T e U são frequentes em Portugal (González et al., 2003); iii) SNPs comumente utilizados na identificação de haplogrupos específicos, previamente publicados (Richards et al., 2000), por exemplo, deu-se preferência ao polimorfismo 7028T sobre o 2706G na identificação do haplogrupo H.

### **- Metodologia**

Os haplogrupos do ADN mitocondrial dos indivíduos da população caso e controlo foram confirmados através de amplificação e subsequente sequenciação, ou restrição de fragmentos, permitindo a identificação dos locais polimórficos informativos da região codificante. A Figura 2.3. discrimina os polimorfismos da região codificante escolhidos neste estudo para a caracterização haplotípica dos indivíduos férteis e inférteis.

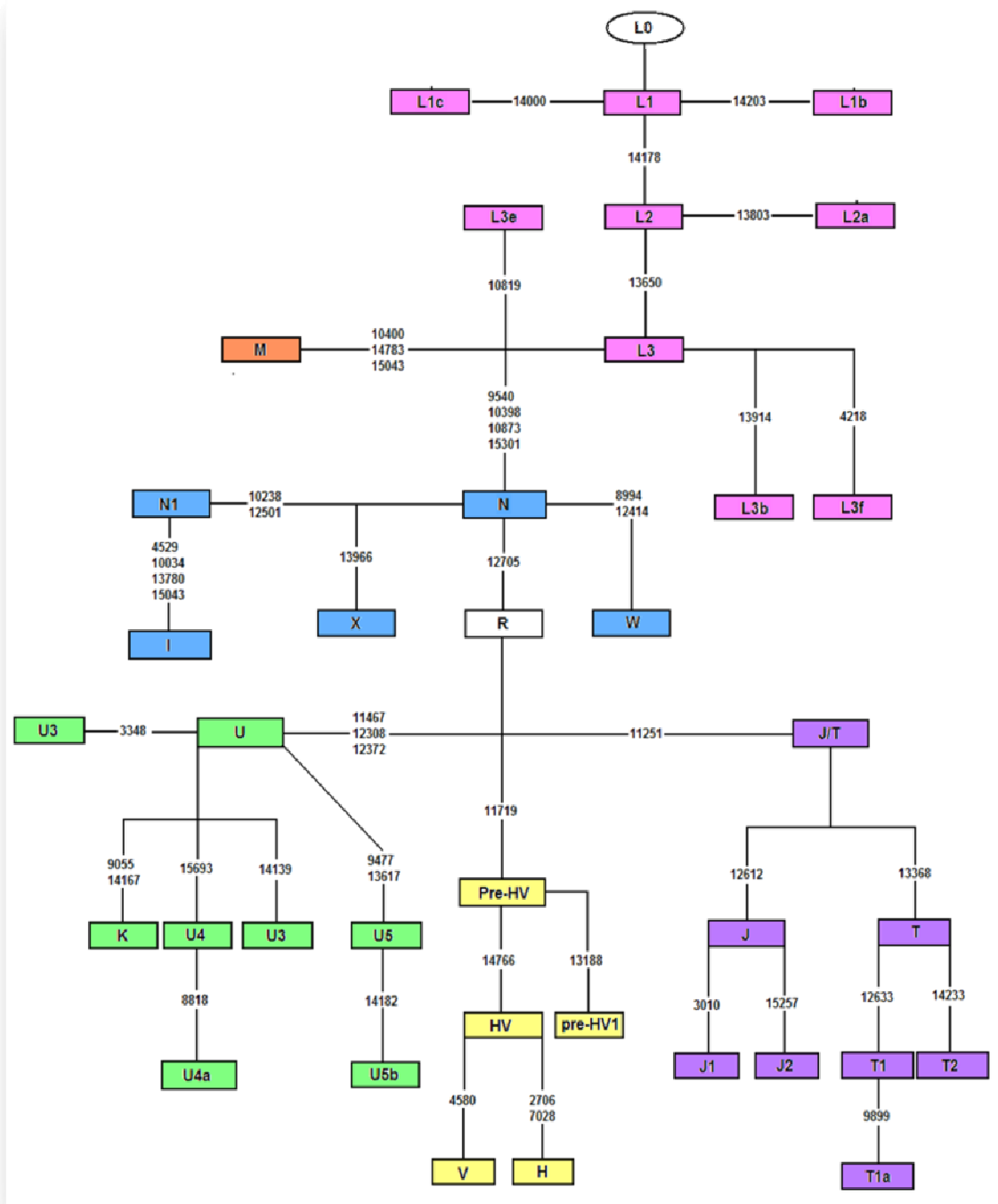


Figura 2. 3. Polimorfismos da região codificante utilizados na caracterização dos haplogrupos dos indivíduos em estudo.

As condições de amplificação para os locais da região codificante, como a temperatura de ligação e tempo de extensão, foram ajustadas e otimizadas de acordo com o tamanho do fragmento pretendido e dos primers utilizados (Tabela 2.1). Os reagentes envolvidos nas misturas de reacção de PCR e sequenciação seguiram as proporções anteriormente descritas para a amplificação da região HVS-I. Sequenciou-se, preferencialmente, com o primer forward

tendo recorrido ao primer reverse sempre que as condições o pediam. A Tabela 2.1 indica os primers e suas sequências utilizados na tipagem dos indivíduos para os vários haplogrupos.

### 2.2.2.3. Classificação filogenética

A classificação dos respectivos haplogrupos teve apoio nas diversas análises filogenéticas e nomenclatura dos ADNmt Europeus e Africanos estipulados nos estudos: Chen et al. (1995b, 2000), Torroni et al. (1996), Macaulay et al. (1999), Quintana-Murci et al. (1999), Richards et al. (2000), Finnila et al., (2001), Richards & Macaulay (2001), Herrnstadt et al., (2002), Salas et al. (2002), Brandstatter et al., (2003), Allard et al., (2005), Achilli et al. (2005), Behar et al., (2006) e Kivisild et al., (2006).

Tabela 2. 1. Sequências dos Primers utilizados para a Região Codificante

Primer	Sequência 5'-3'	Posição 3'
10 F	CTCTTCGTCTGATCCGTCCT	6469
10 R	AGCGAAGGCTTCTCAAATCA	7315
14 F	CCCACCAATCACATGCCTAT	9230
14 R	TGTAGCCGTTGAGTTGTGGT	10130
16 F	GCCATACTAGTCTTTGCCGC	10672
16 R	TTGAGAATGAGTGTGAGGCG	11472
17 F	TCACTCTCACTGCCCAAGAA	11314
17 R	GGAGAATGGGGGATAGGTGT	12076
18 F	TATCACTCTCCTACTTACAG	11948
18 R	AGAAGGTTATAATTCCTACG	12772
19 F	AAACAACCCAGCTCTCCCTAA	12571
19 R	TCGATGATGTGGTCTTTGGA	13507
20 F	ACATCTGTACCCACGCCTTC	13338
20 R	AGAGGGGTCAGGGTTCATTC	14268

21 F	GCATAATTAACCTTTACTTC	14000
21 R	AGAATATTGAGGCGCCATTG	14998
22 F	TGAAACTTCGGCTCACTCCT	14856
22 R	AGCTTTGGGTGCTAATGGTG	15978
S3 F	TTCAAATTCCTCCCTGTACG	3108
S3 R	CGGTCCGCGAACATCAGTGG	5917
L F	CTAGGCTATATACTACGC	3388
L R	GGCTACTGCTCGCAGTG	3717
S13 F	GCCCTATTCTTCATAGCCG	3967
S13 R	CTCACAAGTGAAAGGGGGCT	4812
H F	AAGCAATATGAAATGATCTG	6890
H R	CGTAGGTTTGGTCTAGG	7131
K1 F	CCTAGCCATGGCCATCCCCTTATGAGC	8829
K2 R	GGCTTACTAGAAGTGTGAAAAC	9184
S7b F	TAGCCACAGGCTTCCACGG	9802
S7b R	CCTCCCTACTATGCCTAGAA	10551
S7 R	TGGGGGGTAAGGCGAGGTTAGCG	11873
S12 F	GCCATACTAGTCTTTGCCGC	10672
S12 R	ATTAGGAGGGGGGTTGTTAG	10959
U F	CTCAACCCCGACATCATTACC	12104
U R	ATTACTTTTATTTGGAGTTGCACCAAGATT	12338
R F	GCCACAACCCAAACAACC	12541
R R	CGGGCGTATCATCAACTG	12818
J F	CCTCCCTGACAAGCGCCTATAGC	13583
J R	CTAGGGCTGTTAGAAGTCCT	13843
S9 F	CGCTGTCACTTTCTTAGGAC	13809
S9 R	GGAACGTGTGGGCTATTTAGG	16547
HV F	CAATGATATGAAAAACCATC	14701
HV R	TAATTAATTTTATTAGGGGG	14799

### 2.2.3. Estudo do cromossoma Y

Para o estudo do sistema do cromossoma Y, previamente realizado pelo grupo do Laboratório de Genética Humana da Universidade da Madeira, foram utilizados os marcadores, SNPs, do NRY e consequente classificação hierárquica, segundo a filogenia estipulada pelo YCC (YCC 2002). Do grupo dos polimorfismos regularmente analisado destacam-se os seguintes, YAP (Hammer & Horai, 1995), 92R7 (Mathias et al., 1994), SRY4064, SRY10831 (Whitfield et al., 1995), PN2 (Hammer, 1995), P25 (Hammer et al., 2001), M40 (Hammer et al., 1998), M1, M9, M35, M45, M89, M91, M94, M96, M168, M170, M172, M173, M201, M207, M267 e M304 (Underhill et al., 2000, 2001), aqui estudados (Figura 2.4).

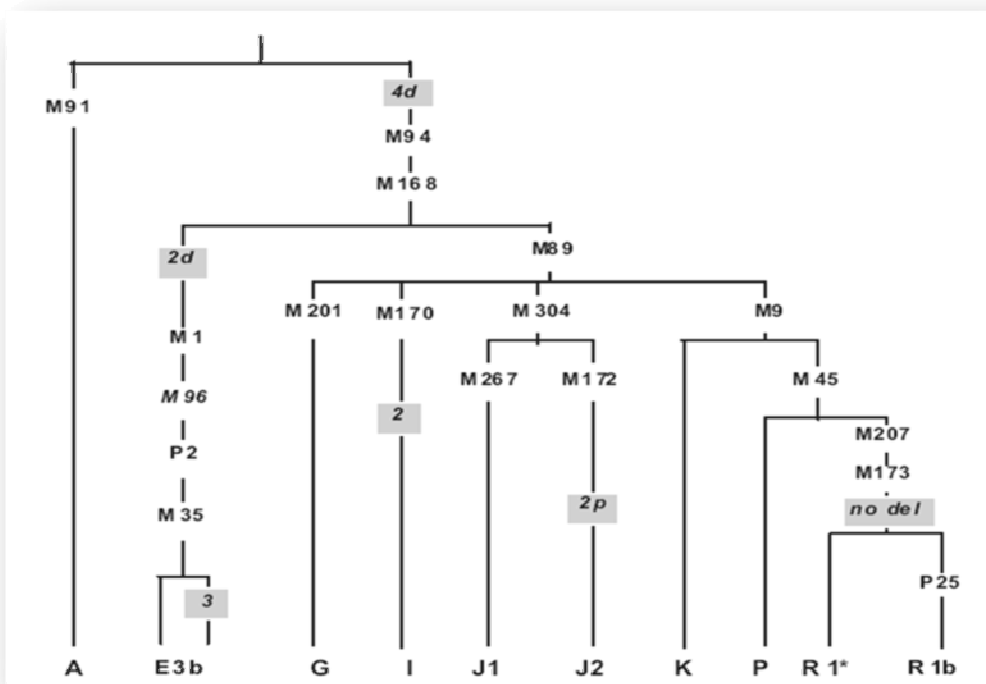


Figura 2. 4. Filogenia dos cromossomas Y das amostras analisadas neste trabalho. Os Y-SNPs seleccionados estão assinalados ao longo dos ramos e os haplogrupos em baixo de acordo com o YCC (2002) ou Underhill et al. (2000). As caixas a cinzento indicam a posição relativa das mutações do gene *DAZ* que leva ao haplótipo *DAZ*. Estão incluídos apenas os haplogrupos presentes nas amostras analisadas. Figura transcrita de Fernandes et al. (2006).

A mistura de reacção no processo de amplificação seguiu as mesmas condições adoptadas para o ADN mitocondrial com programas diferentes de acordo com os diversos marcadores do cromossoma Y.

Para a caracterização dos haplótipos *DAZ*, com recurso aos SNVs/STs para a distinção das quatro cópias do gene *DAZ*, todas as amostras de indivíduos férteis e inférteis foram determinadas através da análise de seis variantes nucleotídicas de *DAZ* (SNVI-VI) e dois *DAZ*-STS (*DAZ*-RRM3) e Y-*DAZ*3, como previamente descrito (Fernandes et al., 2002).

A Tabela 2.2 exhibe os haplogrupos do cromossoma Y determinados para os indivíduos em estudo e respectivos padrões de *DAZ*. Manteve-se a classificação das amostras como estabelecido em Fernandes e colaboradores (2006), letra Y (Inférteis) e YF (Férteis), seguida de um número.

Tabela 2. 2. Haplogrupos do Cromossoma Y e Padrões de DAZ dos Inférteis (Fernandes et al., 2006)

Inférteis	Tipo	Haplogrupo	Padrão DAZ
97OLIF	AZS	R1b	1*2*4
Y55	AZS HP(Sz)	I	2*4d
Y631	OZS	R1b	4p
Y965	AZS HP(Sz)	R1b	*
Y998	AZS SO+D26	P	4d
Y1001	AZS MA	R1*	*
Y1028	AZS HP(Sz)	E3b1	2d*4d
Y1030	AZS HP(Sz)	I	2*4d
Y1035	AZS SO	R1b	*
Y1037	AZS HP(Sz)	E3b3	2d*3*4d
Y1052	AZS SO(Sz)	G	4d
Y1062	AZS MA	R1b	*
Y1077	AZS HP(Sz)	R1b	*
Y1096	AZS HP(Sz)	J1	1*2*4d
Y1106	AZS MA	I	2*4d
Y1107	AZS MA	J1	
Y1116	AZS HP(Sz)	J1	4d
Y1128	AZS HP(Sz)	R1b	*
Y1134	AZS SO 47XXY	G	4d
Y1145	AZS MA	E3b2	2d*4d
Y1155	OLIGO HP(Sz)	R1b	*
Y1159	AZS HP(Sz)	R1*	*
Y1164	AZS SO	R1b	1*2
Y1168	AZS SO 47XXY	R1b	*
Y1174	AZS MA	I	2*4d
Y1183	AZS SO	E3b1	2d*4d
Y1184	AZS SO	I	1*2*3
Y1185	NORMAL	I	2*4d
Y1192	AZS SO	R1b	*
Y1196	AZS HP(Sz)	I	2*3*4
Y1202	AZS HP(Sz)	R1b	*
Y1205	AZS HP(Sz)	I	2*4d

Y1211	AZS HP(Sz)	J2	4d
Y1214	AZS SO	J2	2p*4d
Y1216	AZS HP(Sz)	R1b	*
Y1226	TERATOASTENO	R1b	*
Y1229	AZS SO	R1b	*
Y1236	AZS SO 47XXY	R1b	*
Y1238	AZS HP(Sz)	R1b	*
Y1243	AZS SO F508del	J2	4d
Y1264	AZS SO	E3b*	2d*4d
Y1268	AZS SO	I	2*4d
Y1294	AZS SO	R1b	*
Y1295	AZS SO	E3b1	2d*4d
Y1301	AZS SO	R1b	*
Y1304	AZS HP(Sz)	R1b	*
Y1306	Azoospermia MA	R1b	*
Y1318	AZOOSPERMIA		4d

(continua)

Tabela 2.2 (continuação)

Y1418	AZS	R1b	*
Y1464	AZS SO	E3b3	2d*3*4d
Y1479	AZS	G	4d
Y1480	OAT GRAVE	G	4d
Y1481	AZS	R1b	*
Y1482	AZS	R1b	*
Y1485	AZS	E3b2	2d*4d
Y1486	OAT	R1b	*
Y1487	AZS	R1b	*
Y1488	AZS	R1b	*
Y1489	OZS	R1b	*
Y1490	AZS	R1*	3*4
Y1495	TERATOZOOSPERMIA	R1b	*
Y1496	TERATO SEVERA	K2	4d
Y1497	AZS	R1b	*
Y1498	AZS	R1b	*
Y1499	AZOOSPERMIA SO	R1b	*
Y1500	AZO CBAVD F508del	R1b	*
Y1503	AZS	R1b	*
Y1504	OLIGO SEVERA	E3b2	2d*3*4
Y1505	AZS	R1b	*
Y1507	AZS	R1b	*
Y1509	AZS 47XXY	R1b	3*4
Y1532	OZS	I	2*4d
Y1534	OLIGO MODERADA	R1b	*
Y1535	47XXY	J1	1*2*4d
Y1536	AZS SO	R1b	*
Y1537		J1	4d
Y1538	OZS	K	4d
Y1539	AZS SO	R1b	*
Y1540		E3b2	2d*4d
Y1541	AZS	R1b	*
Y1543	OZS MA del AZFb	R1*	1*2
Y1560	AZS SO	R1b	*
Y1561	OAT GRAVE	R1b	*
Y1562	AZS MA	R1b	*

Y1563	OZ LIGEIRA	R1b	2d
Y1564	TERATO	E3b2	2d*3*4d
Y1572	TERATO SEVERA	R1b	*
Y1575	OZS	E3b*	2d*3*4d
Y1578	OZS	E3*	2d*3*4d
Y1581	OAT GRAVE	I	2*4d
Y1585	AZS	J2	2p*4d
Y1587	OAT GRAVE	R1b	
Y1603		I	2*4d
Y1604	TERATO GRAVE	I	2*3*4
Y1608		J2	2p*4d
Y1675		J1	4d

Tabela 2. 3. Haplogrupos do Cromossoma Y Padrões de DAZ dos Férteis (Fernandes et al., 2006)

Férteis	Haplogrupo	Padrão DAZ
YF1	I	2*4d
YF10	I	2*4d
YF105	R1b	*
YF115	R1b	*
YF116	R1b	*
YF117	R1b	*
YF118	R1b	*
YF119	R1b	*
YF120	K2	4d
YF121	R1b	*
YF122	R1b	*
YF124	R1b	*
YF125	R1b	*
YF126	R1b	*
YF127	R1b	*
YF128	R1b	*
YF129	R1b	*
YF130	J2	2p*4d
YF131	R1b	*
YF132	R1*	*
YF133	E	2d*3*4d
YF134	R1b	*
YF135	R1b	*
YF136	R	4d
YF137	R1b	2d?
YF139	J	3*4d
YF140	G	4d
YF141	R1b	*
YF142	E	2d*3*4d
YF143	R1b	*
YF144	R1b	
YF145	R1b	
YF146	R1b	
YF35	R1b	*
YF36	J1	4d
YF40	R1b	*

YF41	R1b	*
YF42	R1b	*
YF43	R1b	*
YF44	R1b	*
YF46	R1b	*
YF47	E3b1	2d*3
YF48	I	2*4d
YF49	R1b	*
YF5	J2	2p*4d
YF51	G	4d
YF58	I	2*4d
YF61	R1b	4p

(continua)

Tabela 2.3. (continuação)

YF71	R1b	*
YF73	R1b	*
YF75	R1b	*
YF89	J2	2p*4d
YF9	R1b	*
YF90	R1b	3
YFH1	R1b	*
YFH10	J2	2p*4
YFH11	R1b	4d
YFH12	E	2d*3*4d
YFH13	R1b	*
YFH14	R1b	
YFH15	R1b	*
YFH18	I	2*4d
YFH19	I	2*4d
YFH2	R1b	*
YFH20	R1b	*
YFH21	R	*
YFH22	R	2p*4
YFH25	I	2*4d
YFH26	E	2d*4
YFH27	R1b	*
YFH28	E	2d*4d
YFH29	J	
YFH3	R1b	4p?
YFH30	R1b	*
YFH5	R1b	4p?
YFH6	R1b	*
YFH7	R1b	*
YFH8	R1b	*
YFH9	E	
YFPH	R1b	*

### 2.3. Análise Estatística

Com o intuito de evitar grupos com números irrisórios de indivíduos comprometendo os resultados estatísticos, alguns dos haplogrupos foram agrupados de acordo com considerações filogenéticas: HV, pré-HV e V (HV/V), W, X, I, N (W/X/I/N) e em determinadas situações juntamos a este último grupo o haplogrupo L formando o grupo “Outros”. Nalguns casos juntou-se o grupo CRS ao grupo H (H\*) a título de análise.

Sendo o método mais indicado para estudos caso-controlo abordando a análise da distribuição dos haplogrupos (Samuels et al., 2006), recorreu-se ao teste do qui-quadrado ( $X^2$ ) na comparação das duas amostras em estudo. Para a análise dos vários haplogrupos comparou-se cada haplogrupo contra todos os outros em conjunto utilizando o teste do  $X^2$ , já para os casos em que o número esperado de indivíduos da respectiva classe revelou ser inferior a cinco, o teste de Fisher foi a aproximação estatística adoptada, como recomendado na literatura (Fowler et al., 1998). No cruzamento de dados entre os haplogrupos mitocondriais e do cromossoma Y, aos valores do teste de  $X^2$  foi aplicado a correcção de *Yate's* evitando ao máximo o enviesamento de resultados procedente do uso de amostras diminutas. Visto terem amostras pouco expressivas recorreu-se igualmente ao agrupamento dos haplogrupos.

Os resultados foram considerados significativos ao nível convencional de 0.05.





## **CAPÍTULO III**

### **III. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

Neste capítulo descrevem-se os resultados do estudo da variabilidade do ADN mitocondrial, quer da região controlo HVS-I, quer de locais polimórficos na zona codificante, que discriminam os diversos haplogrupos mitocondriais. Para tal, foi analisada uma amostra populacional de 212 indivíduos oriundos do Norte de Portugal, sendo 122 indivíduos diagnosticados como inférteis e 90 indivíduos férteis.

Inicialmente serão apresentados os resultados da caracterização dos haplogrupos mitocondriais e do cromossoma Y para a totalidade dos indivíduos representantes da amostra.

De seguida, serão expostos e discutidos os resultados adquiridos da análise estatística da associação da infertilidade masculina com os haplogrupos mitocondriais e posteriormente, a discussão dos resultados atingidos, procedentes do cruzamento de dados entre os haplogrupos mitocondriais e do cromossoma Y e possível associação com a patologia em estudo.

Por último, é feita uma apreciação às limitações inerentes à típica investigação caso-controlo e considerações futuras.





### 3.1. Estudo do ADN Mitocondrial

#### 3.1.1. Região HVS-I

A análise de 212 indivíduos oriundos do Norte de Portugal permitiu a caracterização de seus haplótipos e colocação de todos os doentes inférteis e controlos férteis no grupo dos haplogrupos mitocondriais característicos europeus (Tabelas 3.1 e 3.2). Para a análise da variabilidade das sequências de ADN mitocondrial considerou-se o conjunto dos diversos polimorfismos situados no segmento da região HVS-I, compreendido entre os nucleótidos 16024 e 16385 (Anderson et al. 1981), e as mutações características dos haplogrupos dispersas por toda a região codificante da molécula. A maioria das sequências HVS-I mitocondrial, quando alinhadas com a sequência rCRS, exibiu motivos de polimorfismos concludentes permitindo a sua colocação apriorística em haplogrupos específicos. O grupo dos haplótipos mitocondrial caracterizado revelou a presença de todas as principais linhagens típicas europeias. Individualizaram-se todas as sequências em quatro super-haplogrupos mitocondriais, H/V, U/K, T/J e W/I/X, (Tabelas 3.1 e 3.2), tendo por base as diversas filogenias disponíveis na literatura como a recente árvore mitocondrial fundada em sequências completas da região codificante (Kivisild et al., 2006; MITOMAP, 2008)

Tabela 3. 1. *Haplótipos Mitocondriais e respectivos Haplogrupos dos Indivíduos Férteis*

<b>Indivíduos Férteis</b>	<b>Haplótipo HVS-I (-16000)</b>
CRS	
YF149	s/ mutação
YF142	s/ mutação
YF143	s/ mutação
YF150	s/ mutação
YF131	s/ mutação
YF139	s/ mutação
YF136	s/ mutação

YF153	s/ mutação
YF75	s/ mutação
YF135	s/ mutação
YF157	s/ mutação
YFH30	s/ mutação
YFH25	s/ mutação
YFH26	s/ mutação
YF44	s/ mutação
YFH20	s/ mutação
YFH1	s/mutação
YFH6	s/mutação
YF105	s/mutação
YF46	s/mutação
<b>H</b>	
YFH5	356
YFH2	362
YF47	176
YFH21	180
YF89	294
YF156	189
YF120	218
YF48	124
YF41	111
YF121	124
YFH7	154
YF145	310
YFH19	311
YF129	304
YF5	145
YF140	320CA
YFH8	311-362
YF51	172-192
YF148	162-209
YFPH	051-162-259
YFH12	093-269-270
<b>V (298)</b>	
YF40	298
YF155	189-298
YFH29	298-335
YF43	189-298

(continua)

Tabela 3.1. (continuação)

YF9	224-298-311
<b>T1 (16126-16163-16186-16189-16294)</b>	
YFH14	126-163-186-189-294
YF130	126-163-186-189-294
<b>T2 (16126-16294-16296)</b>	
YF117	294-304
YFH27	126-292-294-296
YF137	126-294-296-304
YFH13	126-294-296-304
YF128	126-292-294-304
<b>J (16069-16126)</b>	
YFH18	069-126

YF146	069-126
YF144	051-069-126
YF49	069-126-261
YF10	069-126-311
YF124	069-126-153-290
YF42	069-126-193-278
YFH10	069-126-145-172-222-261
YFH22	069-126-145-172-222-261
YF73	069-126-145-172-222-261-305
<b>U4 (16356)</b>	
YF35	293-356
YF126	134-356
YF152	179-356
YF61	093-356
YFH9	189-356
<b>U5 (16270)</b>	
YF125	192-270
YF127	192-270
YF118	093-189-192-270
YFH28	192-256-270-362-399
YFH15	189-192-256-270-362
YF151	114CA-192-256-270-294
YF141	093-183AC-187-189-192-270
<b>U6 (16172-16219)</b>	
YF132	172-219-278
YF119	172-174-188-219-311
YF36	172-219-271-278-362
<b>K (224-311)</b>	
YF116	224-311
YF154	093-224-311
YF134	093-224-266-311
YF90	093-183AC-189-197-224-311
<b>W (16223-16292)</b>	
YF133	223-292-311
<b>N1b (16145-16176G-16223)</b>	
YF71	145-176CG-223
<b>I (16129-16223)</b>	
YF58	129-223-291

(continua)

Tabela 3.1. (continuação)

YF1	129-172-223-311
YF122	129-172-223-311
<b>L3e (16223)</b>	
YFH11	051-264
YF115	051-223-264
<b>L3b (16124-16223-16278-16362)</b>	
YFH3	124-189-223-278

Tabela 3. 2. *Haplótipos Mitocondriais e respectivos Haplogrupos dos Indivíduos Inférteis*

Indivíduos Inférteis	Haplótipo HVS-I (-16000)
CRS	
Y2519	s/mutação

Y2033	s/mutação
Y2008	s/mutação
Y2595	s/mutação
Y1174	s/mutação
Y1159	s/mutação
Y1107	s/mutação
Y1031	s/mutação
Y631	s/ mutação
Y965	s/ mutação
Y1535	s/ mutação
Y1603	s/ mutação
Y1301	s/ mutação
Y1268	s/ mutação
Y1226	s/ mutação
Y1238	s/ mutação
Y1236	s/ mutação
Y1116	s/ mutação
Y1030	s/ mutação
Y1604	s/ mutação
Y1295	s/ mutação
Y1479	s/ mutação
Y1028	s/ mutação
Y1509	s/mutação
Y1243	s/mutação
<b>H</b>	
Y1205	169
Y1481	209
Y1106	354
Y1229	354
Y1294	362
Y1488	320CA
Y1480	291
Y1575	291
Y1318	213
Y1608	256
Y1306	189

(continua)

Tabela 3.2. (continuação)

Y1145	111
Y2134	179
Y1985	221
Y2363	362
Y1184	259
Y2078	180
Y2503	114
Y1499	325
Y1134	162-209
Y1538	235-291
Y1214	114-344
Y1497	218-368
Y1505	162-209
YF97OLIF	093-362
Y2478	075-178
Y2609	104-189

Y1963	114CA-304
Y55	183-189
Y1485	114CA-192
Y1487	093-235-263
Y1486	258-319-320
Y1532	093-189-293
Y1572	126-361-362
<b>HV</b>	
Y1539	311
Y1581	298
<b>R0a (Pré-HV1) (16126-16362)</b>	
Y1561	126-264-362
Y1543	126-264-362
<b>V (298)</b>	
Y1010	298
Y1183	298
Y1564	298
Y1077	189-298
Y1118	093-298
<b>T (16126-16294)</b>	
Y1587	126-189-294
Y1595	126-153-189-294
<b>T1 (16126-16163-16186-16189-16294)</b>	
Y1489	126-163-186-189-294
Y1570	126-163-171-186-189-294
Y1035	126-163-186-187-189-294
Y1155	126-163-171-186-189-294
<b>T2 (16126-16294-16296)</b>	
Y1503	126-292-294
Y1585	126-294-304
Y1264	126-266-294-304
Y1536	126-294-296-304
Y1185	093-126-294-296-304
Y1507	051-126-294-296-304

(continua)

Tabela 3.2. (continuação)

Y1062	126-171-292-294-324
<b>J (16069-16126)</b>	
Y2260	069-126
Y1534	069-126
Y1490	069-126
Y1211	069-126
Y2360	069-126-218
Y1500	069-126-291
Y1562	069-126-319
Y1304	069-126-324-366
Y1096	069-093-126-193
Y1496	069-126-193-319-360
Y1001	069-093-126-145-172-261
<b>U</b>	
Y1540	051-189
Y2508	189-192-256-362
Y1168	178-189-197-324
Y1196	051-129-189-327-362

<b>U3 (16343)</b>	
Y1495	093-343-356
Y1464	093-223-256-343
<b>U5 (16270)</b>	
Y1922	189-270
Y1482	189-270
Y1537	224-270
Y1128	224-270
Y1541	256-270
Y1498	192-256-270
<b>U6 (16172-16219)</b>	
Y1617	172-219-235-278
Y1675	172-219-235-278
Y1563	172-219-235-278
<b>K (224-311)</b>	
Y1052	224-311
Y2237	093-224-311
Y1216	186-224-311
Y1418	093-224-311
Y1192	224-311-320
<b>I (16129-16223)</b>	
Y1250	129-223
Y1560	129-189-223-391
<b>X (16189-16223-16278)</b>	
Y1164	189-223-278
<b>L3 (16223)</b>	
Y998	093-140-169-193-195-223-243-261
<b>L3f (16209-16223-16311)</b>	
Y1335	209-223-311
Y1227	209-223-311
<b>L2a (16223-16278-16294)</b>	
Y1037	223-278-294

(continua)

Tabela 3.2. (continuação)

<b>L1b (16126-16187-16189-16223-16264-16270-16278-16311)</b>	
Y1202	126-187-189-223-264-270-278-293-311
Y1504	126-187-189-223-264-270-278-293-311
<b>L1c (16129-16187-16189-16223-1616278-16294-16311)</b>	
Y1578	086-129-187-189-223-278-292-293-294-311

### 3.1.2. Região codificante

No presente estudo, os polimorfismos 2706G e 7028T revelaram estar ausentes na totalidade das sequências pertencentes ao haplogrupo H. As demais amostras pertencentes aos restantes haplogrupos T, J, L, X e K, exibiam os polimorfismos 14766T e 11719A na região

codificante, em concordância com estudos prévios (Macaulay et al., 1999; Saillard et al., 2000). Para distinção de indivíduos pertencentes ao haplogrupo V foram utilizados como SNPs, os polimorfismos de diagnóstico 4580A e 15904T.

Nas populações em análise, o haplogrupo T, previamente determinado pelo polimorfismo 13368A, pôde ser dividido em dois ramos, T1 e T2, diferenciados pelos polimorfismos 12633A e 14233G, na devida ordem. Neste estudo recorreu-se ao polimorfismo 12612G para identificar o haplogrupo J, e posteriormente, os polimorfismos 3010A e 15257A na distinção das suas subdivisões, os ramos J1 e J2, respectivamente.

Na caracterização do super-haplogrupo U/K recorreu-se ao grupo dos polimorfismos 12372A, 12308G e 11467G. Do haplogrupo U individualizaram-se cinco subgrupos U3, U4, U5 e U6. Os haplogrupos U3 e U4 exibiram os polimorfismos esperados na região codificante, 14139G e 15693C, respectivamente. Diferenciou-se o grupo U5 dos restantes com a identificação das mutações 9477A e 13617C e o haplogrupo U6 pela presença da respectiva mutação 3348G. O haplogrupo K foi identificado pela presença das mutações 9055A e 14167T.

Em relação ao super-haplogrupo W/X/I, os indivíduos em estudo pertencentes às três linhagens manifestaram o polimorfismo 12705T. Para a determinação do haplogrupo X, recorreu-se à mutação 13966G. As sequências características do haplogrupo W foram identificadas pela presença do polimorfismo particular 8994A e 12414C. Do haplogrupo I fazem parte todas as sequências exibindo as mutações características da região codificante 4529T, 10034C, 13780G e 15043A.

Para a determinação do super-haplogrupo M valeram-se os polimorfismos 10400T, 14783C e 15043C. Dos indivíduos em estudo nenhum apresentou quaisquer polimorfismos característicos deste haplogrupo típico da população asiática.

Todas as sequências do ADNmt pertencentes aos haplogrupos africanos manifestaram as alterações nucleotídicas nas posições 9540C, 10398G, 10873C, 15301A e 12705T. Do haplogrupo L3 individualizaram-se dois grupos, L3b e L3f, recorrendo às mutações 13914T e 4218C, respectivamente. O polimorfismo 10819G permitiu a distinção do ramo L3e dos haplogrupos L1 e L2. Do haplogrupo L1, caracterizado pelo polimorfismo 14178C,

diferenciaram-se dois ramos L1c e L1b através das mutações na região codificante características, 14000C e 14203G respectivamente.

### **3.1.3. Distribuição dos haplogrupos**

O factor determinante para o sucesso de um estudo caso-controlo resume-se ao recrutamento das amostras, com particular atenção ao grupo controlo. A má escolha da população controlo poderá induzir em erro os investigadores, dissimulando associações verdadeiras, resultados falsos-negativos, ou criando resultados falsos-positivos (Ellsworth & Manolio, 1999; Cardon & Bell, 2001). A replicação dos resultados noutras populações permite detectar os falsos-positivos, porém, a identificação e subsequente eliminação dos resultados falsos-negativos revela ser uma tarefa complexa. Por ser crítico a escolha de uma população controlo oriunda da mesma região, bem como uma fenotipicamente homogénea (Pereira et al., 2005), os indivíduos da amostra controlo têm a mesma proveniência relativamente aos indivíduos da amostra caso e estão bem caracterizados em termos de infertilidade. Adicionalmente, uma segunda população controlo, representada por indivíduos do Norte de Portugal (González et al., 2003), é utilizada como referência com o intuito de se verificar se a distribuição dos haplogrupos controlo está em concordância com a distribuição esperada para o país.

A distribuição dos haplogrupos mitocondriais está representada nas Figuras 3.1 e 3.2 e reflecte a bem estabelecida super-representação do haplogrupo H nas populações europeias. Em ambas as populações em estudo a distribuição dos haplogrupos mitocondriais está em concordância com dados previamente publicados sobre a genética populacional portuguesa (Pereira et al., 2000; González et al., 2003).

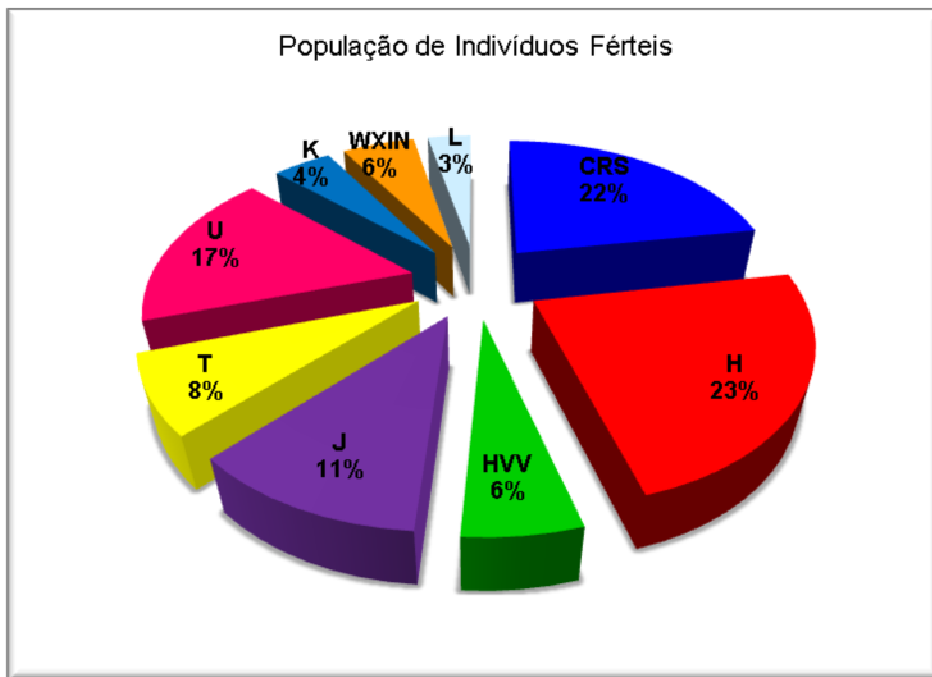


Figura 3. 1. Distribuição das frequências haplotípicas do ADN mitocondrial na população de indivíduos férteis.

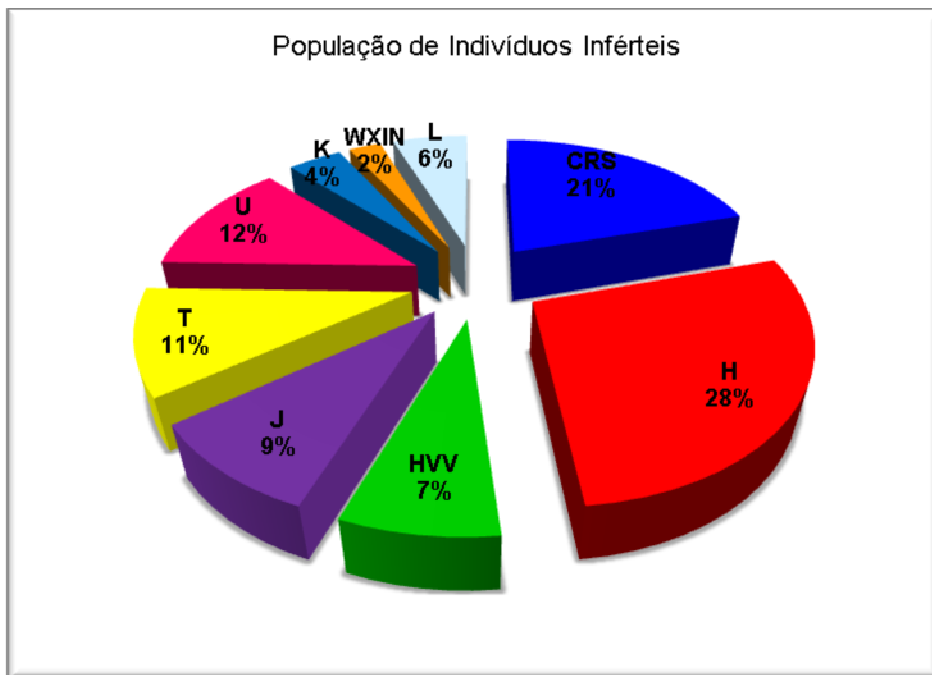


Figura 3. 2. Distribuição das frequências haplotípicas do ADN mitocondrial na população de indivíduos inférteis

Como previsto para a região do Norte de Portugal (Figura 3.3), indivíduos partilhando o haplótipo L escasseiam, contrariamente ao padrão observado no Sul de Portugal (González et

al., 2003). Já o haplogrupo U demonstra superioridade, como é característico desta região (González et al., 2003). Bem representado, também, encontra-se o haplogrupo T, como seria de esperar para o Norte de Portugal, visto deter a maior fracção de haplótipos do subgrupo T1, relativamente à Europa (González et al., 2003).

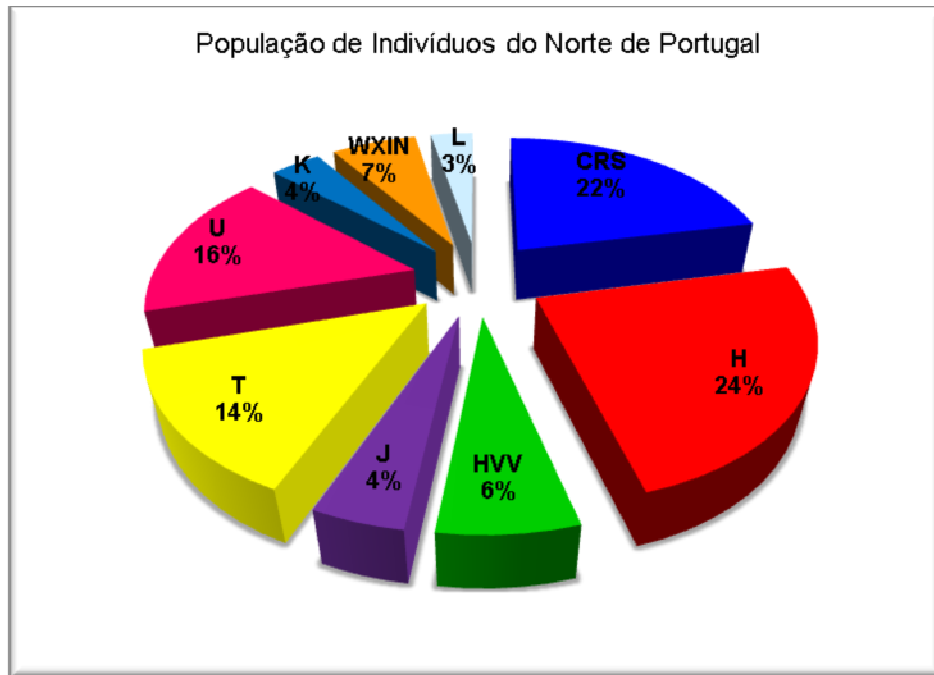


Figura 3. 3. Distribuição das frequências haplotípicas do ADN mitocondrial na população do Norte de Portugal (González et al., 2003).

Em relação à análise da distribuição dos haplogrupos do cromossoma Y, está igualmente de acordo com a genética populacional portuguesa, como precedentemente estabelecido num estudo realizado por Fernandes e colaboradores em 2006.

### 3.2. Associação da Infertilidade Masculina com os Haplogrupos Mitocondriais

Para a pesquisa de uma possível associação dos haplogrupos mitocondriais com a infertilidade masculina comparou-se, então, a população de inférteis com as duas populações controlo, bem caracterizadas em termos de origem geográfica. Uma população de indivíduos férteis do Norte de Portugal bem caracterizada, quer fenotipicamente, quer geograficamente, e uma segunda população de referência, igualmente do Norte de Portugal (1) mas sem

fertilidade conhecida (González et al., 2003). Da distribuição dos haplogrupos mitocondriais não se observaram diferenças estatísticas entre as duas populações em estudo. Resultados semelhantes foram obtidos quando as populações caso e controlo foram comparadas com a população referência da mesma região do Norte de Portugal (1). Como já analisado nos gráficos anteriores, as distribuições haplotípicas esperadas para o Norte de Portugal foram as observadas para as duas populações em estudo. A Tabela 3.3 mostra os valores de probabilidade para o teste  $X^2$ , resultante da comparação entre os pares de populações.

Tabela 3. 3. *Valores de Probabilidade para o Teste  $X^2$  da comparação entre os Pares de Populações*

<b>Populações</b>	<b>Norte de Portugal(1)</b> (Pop. Referência)	<b>Férteis</b> (Pop. Controlo)
<b>Férteis</b> (Pop. Controlo)	0.589	-
<b>Inférteis</b> (Pop. Caso)	0.438	0.839

Focando a análise para os haplogrupos individualmente, ou seja, para a comparação da frequência de um haplogrupo contra os outros restantes, entre a população caso e a população controlo, os resultados não apontam diferenças entre a população de indivíduos férteis e inférteis, oriundos da mesma região de Portugal. Na Figura 3.4 podem observar-se os valores de probabilidade, com a respectiva correcção de *Yate's* para o teste  $X^2$ , resultantes da análise individual de cada haplogrupo entre as amostras de indivíduos férteis e inférteis.

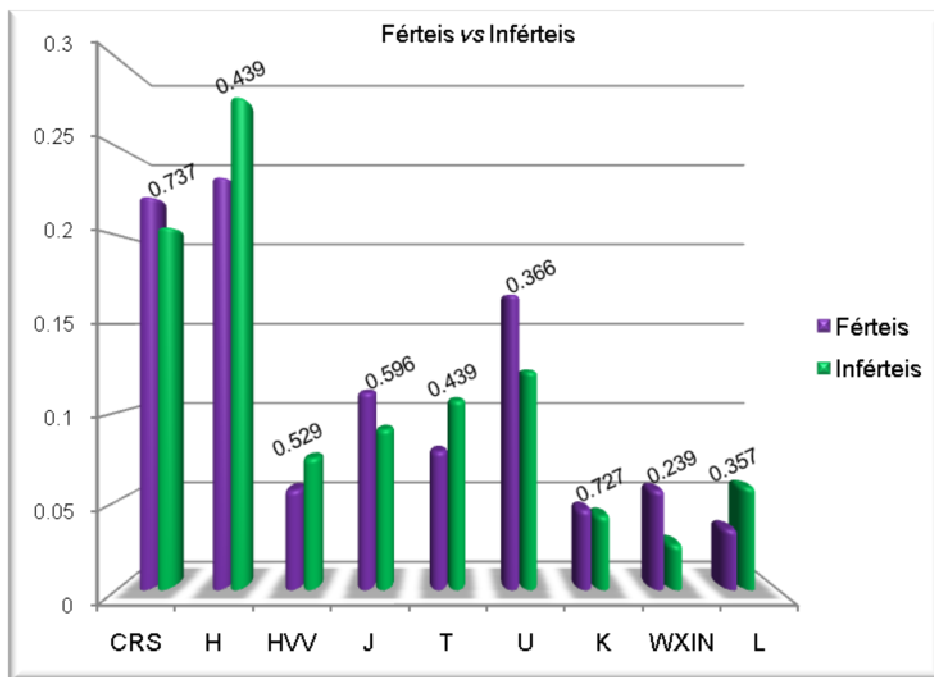


Figura 3. 4. Distribuição dos haplogrupos mitocondriais na população caso inférteis e controlo férteis.

Inesperadamente, quando a mesma aproximação é aplicada para a população de férteis e a população de referência do Norte de Portugal (1), surgem valores significativos para o haplogrupo J ( $p = 0.039$ ), o mesmo não se verificando em relação ao grupo dos inférteis, para nenhum dos haplogrupos (Tabela 3.4). Tais resultados, a serem verdadeiros, indicariam uma lacuna na caracterização das populações, visto serem da mesma região mas incompatíveis em termos de suas distribuições haplotípicas. A título de experiência, comparou-se as amostras controlo e caso com outra população de referência do Norte de Portugal (2), retirada de outro estudo conduzido por Pereira e colaboradores (2000). Desta análise, e contrariamente ao resultado alcançado anteriormente, já não se obteve qualquer diferença entre os haplogrupos das duas populações de indivíduos férteis e do Norte de Portugal (2). Todavia, desta vez o mesmo não se verificou para a população de indivíduos inférteis. Quando se comparou a segunda população de referência do Norte de Portugal (2) com a população de inférteis, obteve-se diferença estatística com significância para o haplogrupo U ( $p = 0.035$ ), resultado, uma vez mais, não observado quando comparada com a primeira população do Norte de Portugal (1) utilizada. Igualmente, a ser verídico tal produto, estaria aqui implícito um factor de

risco para o fenótipo da infertilidade em indivíduos pertencentes à linhagem U. Dificilmente este padrão seria observável visto este haplogrupo reflectir o segundo grupo de linhagens mais frequente no Norte de Portugal, o que implicaria uma significativa expressão do fenótipo da infertilidade masculina na região.

A Tabela 3.4 apresenta os resultados da comparação das populações de férteis e inférteis com ambas as populações de referência do Norte de Portugal (1) (2).

Tabela 3. 4. Valores de Probabilidade para o Teste de  $X^2$  resultante da comparação das Populações Caso e Controlo com as Populações do Norte de Portugal

Haplogrupo	Férteis		Inférteis	
	NPortugal(1)	NPortugal(2)	NPortugal(1)	NPortugal(2)
H*	0.896	0.527	0.633	0.269
HV/V	0.641	0.505	0.736	0.768
J	<b>0.039</b>	0.205	0.103	0.369
T	0.114	0.449	0.349	0.821
U	0.819	0.276	0.376	<b>0.035</b>
K	0.729	0.598	0.701	0.554
WXIN	0.641	0.381	0.093	0.643
L	0.725	0.568	0.299	0.689

(1) – População do Norte de Portugal retirado de González et al., 2003

(2) – População do Norte de Portugal retirado de Pereira et al., 2000

H\* = H + CRS

Estas diferenças estatísticas observadas terão que ser analisadas com extrema precaução, tentando ao máximo eliminar possíveis fontes de enviesamento, visto algumas limitações actuais terem sido evidenciadas, em diversos estudos, com a crescente exaltação de possíveis associações entre linhagens mitocondriais e patologias comuns.

Quando numa abordagem estatística para um determinado estudo, o teste é repetido em vários subgrupos, como quando as análises estratificadas são conduzidas sem uma

hipótese pré-estabelecida de que a primeira associação deverá diferir entre esses subgrupos, torna-se crítico determinar qual o limite adequado para afirmar significativo um valor de  $p$  do teste estatístico (Perneger, 1998). O problema inerente à aplicação de múltiplos testes, cada um ao mesmo nível de significância ( $\alpha$ ), incide no facto da probabilidade de encontrar pelo menos 1 resultado significativo ser maior que esse próprio nível de significância (Zaykin et al., 2002) aumentando a probabilidade de falsas rejeições da hipótese nula, ou erros do tipo I. A solução típica tem se reflectido na diminuição dos valores de  $\alpha$ , reduzindo a probabilidade de um resultado falacioso, através das correcções de Bonferroni (Holm, 1979; Miller, 1981; Rice, 1989). De facto, após aplicada as referidas correcções aos testes efectuados anteriormente, os resultados tidos como significativos deixam de o ser como a tabela o indica.

Tabela 3. 5. *Valores de Probabilidade após correcção de Bonferroni*

Populações	Valor $p$	Valor $p$ ajustado
Férteis	<u>0,039</u>	0,315 > 0,05
Inférteis	<u>0,035</u>	0,284 > 0,05

Contudo, a este método de Bonferroni tem sido associado um baixo poder estatístico (Jennions & Moller 2003), colocando sérias dúvidas à sua aplicação no estudo de dados. O ajustamento da significância estatística para o número de testes parece criar mais problemas do que resolve (Perneger, 1998). Implica uma diferente interpretação para uma dada comparação de acordo com o número de testes efectuados bem como a inflação dos erros do tipo II (a probabilidade de aceitarem a hipótese nula quando a alternativa é verdadeira) como efeito directo da diminuição dos erros do tipo I, o objectivo do método de Bonferroni (Rothman, 1990). Outro problema surge quando, mesmo entre os estatísticos, não se impõe uma decisão consensual sobre em que situações a aplicabilidade das correcções de Bonferroni é apropriada (Perneger, 1998; Nakagawa, 2004).

Atendendo a todos estes considerandos e por concordar que a melhor abordagem

passa pela simples descrição do que foi feito e porquê e a discussão de possíveis interpretações de cada resultado permitindo uma conclusão plausível que satisfaça as regras da lógica e da razão (Moran, 2003), mantem-se os resultados obtidos sem a correcção de Bonferroni seguindo o mesmo critério ao longo da tese.

Com efeito, neste resultado ambíguo então, poderá estar patente o problema recorrente do recrutamento de indivíduos e subsequente subestruturação populacional. O grupo de indivíduos que compreende as amostras caso e controlo está mais confinado à região do Porto, ao passo que a população de referência (1) possui maior abrangência por todo o Norte de Portugal. Adicionalmente, relativamente à segunda amostra de referência do Norte de Portugal (2), não foi publicada informação exacta sobre a origem dos indivíduos representativos.

Embora muito comum o uso de controlos de estudos prévios ou de amostras tratadas noutros laboratórios corre-se o risco de enviesar os resultados deste estudo. É habitual faltar informação precisa sobre a amostra em diversos aspectos, desde a patologia à origem geográfica, dificultando a correcta escolha da amostra controlo para combinar com a amostra caso. É sempre aconselhável recrutar uma nova população controlo bem caracterizada a nível geográfico e dirigida à patologia de interesse. Tendo estas considerações em conta, enfatiza-se, uma vez mais, a escolha acertada para a amostra controlo do presente estudo. Por estar bem caracterizada, quer geograficamente, quer a nível da patologia de interesse, a população controlo de férteis é a mais indicada para o presente estudo.

Esta incongruência nos resultados dos testes comparativos impele a questionar a eficácia deste tipo de abordagem utilizada correntemente na análise entre os haplogrupos individualmente.

A presença de múltiplos grupos, com frequências haplotípicas distintas numa população, poderá induzir a resultados erróneos. Se por casualidade, no recrutamento dos indivíduos que

farão parte da amostra, se alcançam indivíduos de uma região onde prevalece um determinado haplogrupo, os resultados do estudo poderão ser falaciosos ou tendenciosos para um falso-positivo. Sempre que se analisar os haplogrupos em separado, na comparação de duas populações, estar-se-á sujeito a possíveis influências de subestruturação populacional resultantes das microregiões. Depreende-se destes resultados que a informação correcta sobre a região de recrutamento dos indivíduos é crucial para a escolha da população controlo, uma vez que pode trazer falsos-positivos ao estudo.

Da comparação das frequências de distribuição dos haplogrupos do cromossoma Y não foram observadas diferenças significativas (Fernandes et al., 2006). Resultados similares foram obtidos aquando da confrontação de ambas as populações de indivíduos férteis e inférteis com a população de referência da mesma região do Norte de Portugal (Fernandes et al., 2006)

### 3.2.1. Haplogrupo U e a infertilidade masculina

Recentemente, um grupo de investigadores recorreu a uma nova estratégia na avaliação do envolvimento do ADN mitocondrial na mobilidade do sémen (Montiel-Sosa et al., 2006). Supostamente, alguns sub-haplogrupos do haplogrupo U estarão correlacionados com a maior ou menor mobilidade dos espermatozóides. Estipulam que de entre estes subgrupos, a linhagem U5 será superior em termos de mobilidade e viabilidade dos espermatozóides, deixando para trás o grupo U caracterizado pela substituição 1811 (U2, U3, U4, U8, U9 e K). Por acréscimo, os níveis de mobilidade e viabilidade observáveis no haplogrupo H acusaram ser inferiores aos revelados pela linhagem U5b, e os do sub-haplogrupo U4 menores que do haplogrupo T. Perante tal resultado seria de conjecturar a presença de diferenças, com significância estatística, entre as diversas linhagens do haplogrupo U dos indivíduos das

populações em estudo, em particular, uma prevalência da linhagem U5 na população dos indivíduos férteis. Com o intento de indagar sobre tal conjectura, examinou-se a provável existência de diferença estatística entre a população de férteis e inférteis, para os subgrupos do haplogrupo U. Agruparam-se os indivíduos em três linhagens U5, U1811 e U6 e comparou-se as suas frequências na população controlo e caso. Do grupo U1811 fizeram parte os indivíduos pertencentes aos sub-haplogrupos U3 e U4. A Figura 3.5 mostra a frequência dos subgrupos em ambas as populações.

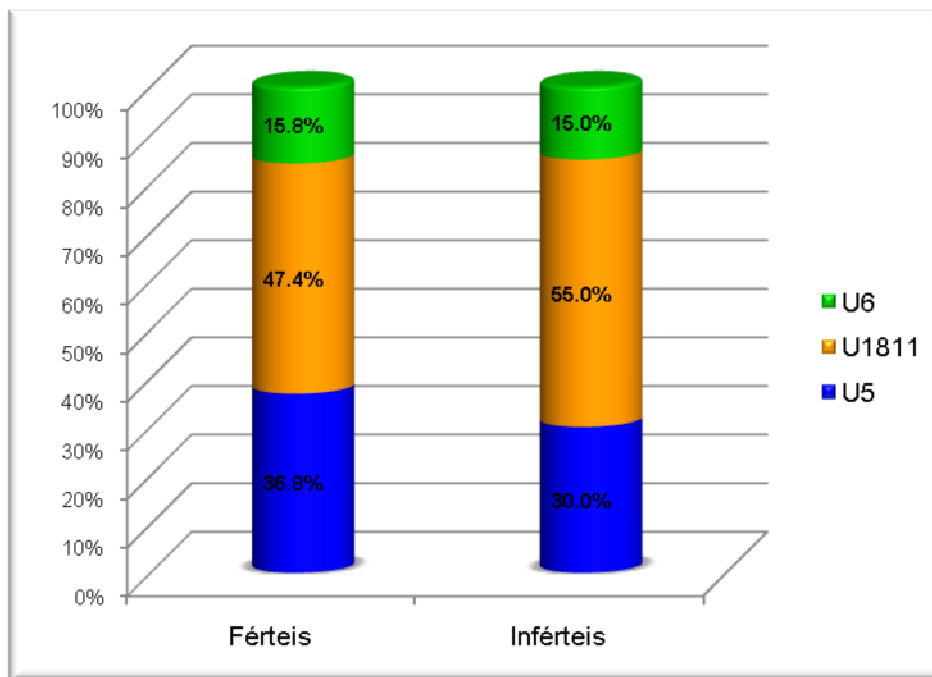


Figura 3. 5. Distribuição dos sub-haplogrupos U nas populações de férteis e inférteis.

Efectivamente, observando o gráfico verifica-se uma predominância do haplogrupo U1811, supostamente responsável pela fraca mobilidade, na população de indivíduos inférteis, contrariamente ao haplogrupo U5, que parece prevalecer na população dos férteis. Todavia, ao compará-las estatisticamente não se obteve qualquer diferença significativa entre as duas populações ( $p = 0.762$ ), nem tão-pouco da análise dos haplogrupos em separado. A Tabela 3.6 exhibe os valores de  $p$  da comparação de ambas as populações para cada classe.

Tabela 3. 6. Valores de Probabilidade para o Teste de  $X^2$  da Comparação entre Indivíduos Férteis e Inférteis dos Sub-Haplogrupos de U

<b>Fért vs Infért</b>	<b>U5</b>	<b>U1811</b>	<b>U6</b>
<b>U5</b>	0.573	-	-
<b>U1811</b>	-	0.566	-
<b>U6</b>	-	-	0.654

De facto, a ser autêntica esta relação entre as linhagens do haplogrupo U e a mobilidade e viabilidade das células espermáticas, a frequência de indivíduos com problemas de fertilidade seria expressiva nas populações europeias, uma vez que para além destas linhagens do U, o haplogrupo T, também frequente e característico na Europa, tem sido igualmente envolvido na fraca mobilidade e viabilidade dos espermatozóides (Ruiz-Pesini et al., 2000).

### **3.3. Associação da Infertilidade Masculina com os Haplogrupos do Cromossoma Y**

Para a análise de uma possível associação entre os haplogrupos do cromossoma Y e a infertilidade masculina, recorreu-se aos dados obtidos, por Fernandes e colaboradores (2006), da caracterização para o cromossoma Y dos mesmos indivíduos das populações em estudo. As frequências dos haplogrupos do cromossoma Y, representadas nas Figuras 3.6 e 3.7, estão em concordância com as frequências típicas das populações europeias, com a prevalência do haplogrupo R (Semino et al., 2000; Jobling & Tyler-Smith, 2003).

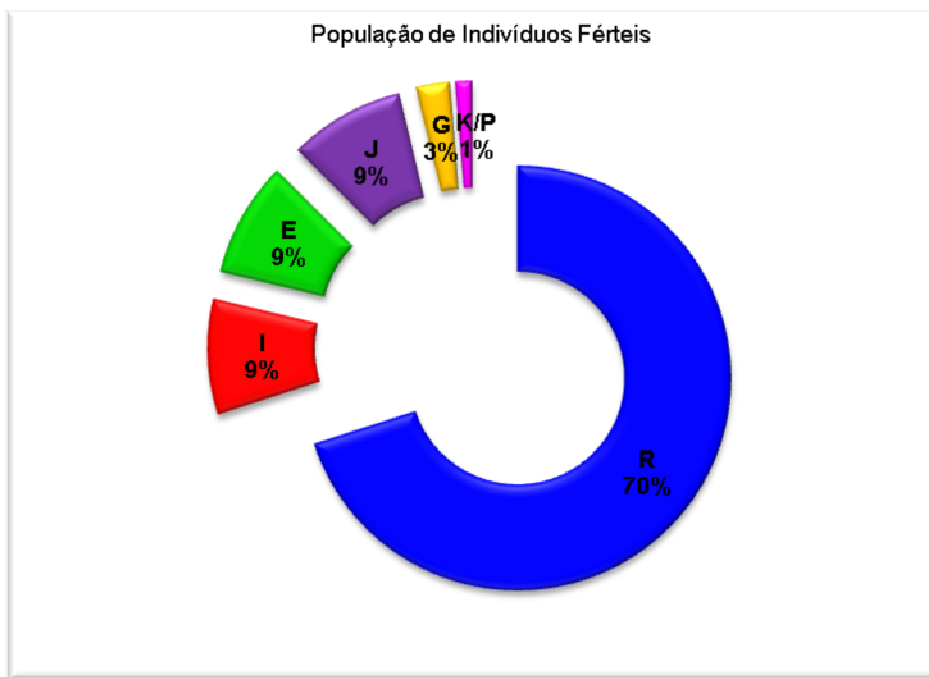


Figura 3. 6. Distribuição dos haplogrupos do cromossoma Y na população de indivíduos férteis.

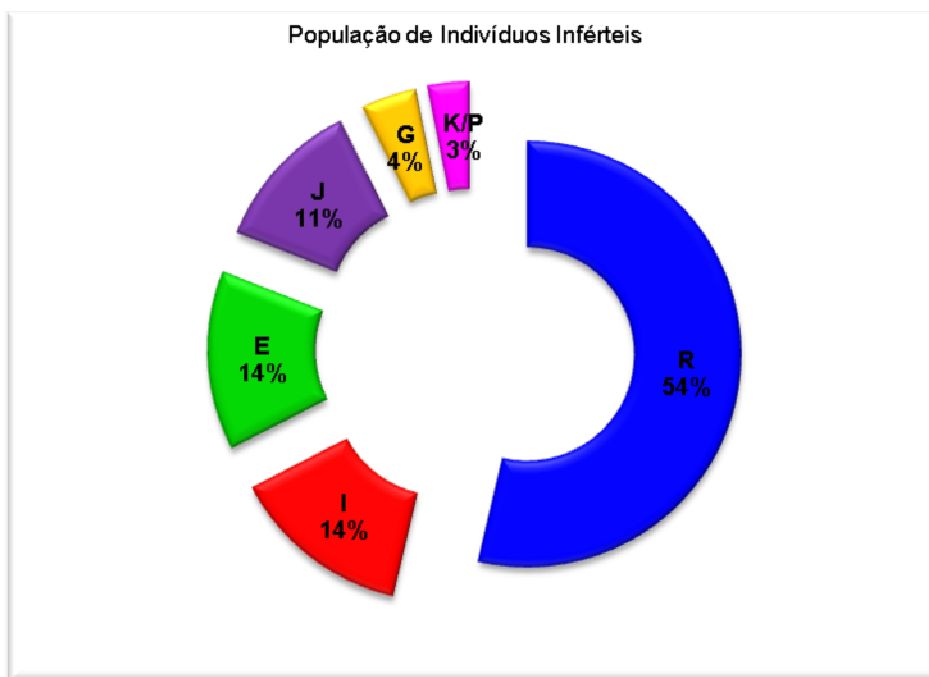


Figura 3. 7. Distribuição dos haplogrupos do cromossoma Y na população de indivíduos inférteis.

As populações de indivíduos férteis e inférteis quando comparadas com uma população de referência da mesma região de Portugal (Gonçalves et al., 2005), não demonstraram

diferenças estatísticas (Fernandes et al., 2006).

Similarmente ao observado em estudos anteriores (Fernandes et al., 2006), a comparação dos haplogrupos do cromossoma Y entre ambos os grupos, controlo e caso, não apontou diferenças significativas,  $p=0.399$  (Figura 3.8).

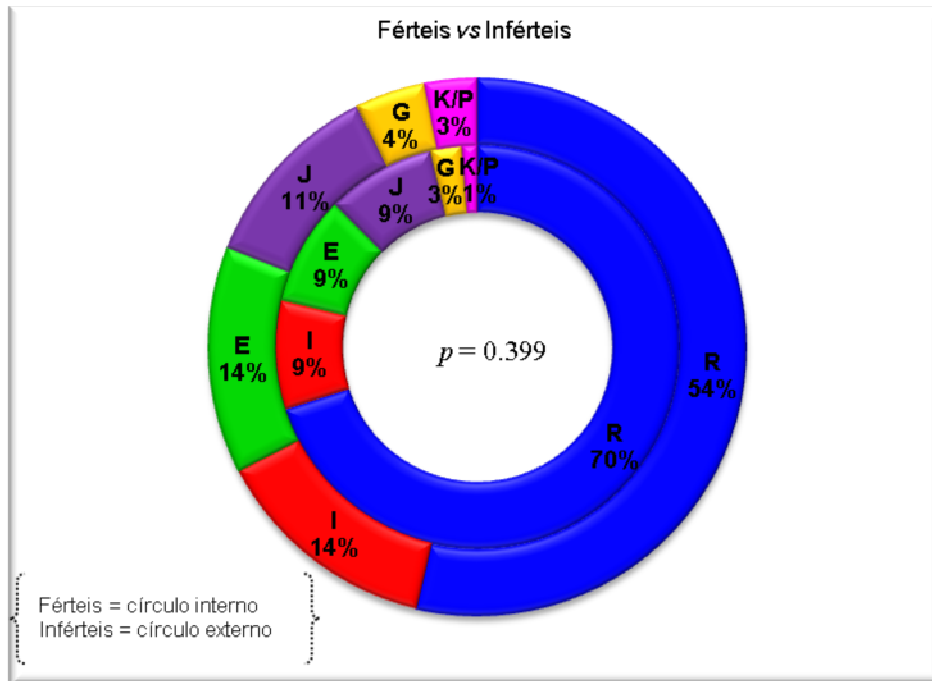


Figura 3. 8. Comparação dos haplogrupos do cromossoma Y entre a população de indivíduos férteis e inférteis.

Quando se direccionou a análise para cada haplogrupo individualmente, surgiram diferenças significativas (Tabela 3.7), entre as duas populações, para o haplogrupo R ( $X^2$  OR = 0.49, 95% CI = 0.27-0.93,  $p = 0.027$ ). Para os demais haplogrupos não se verificaram diferenças entre a população de indivíduos férteis e inférteis. A Tabela 3.7 apenas mostra os valores de *odds ratio* (OR) e intervalos de confiança 95% (CI) para os haplogrupos com associação positiva observada.

Tabela 3. 7. Resultados do Teste de Associação entre os Haplogrupos do Cromossoma Y e o Risco de Infertilidade.

CRS x

Haplogrupo	Férteis	Inférteis	$X^2$	Valor $p$	OR [95%CI]
------------	---------	-----------	-------	-----------	------------

<b>R</b>	56 (0.7)	51 (0.54)	4.9	<b>0.027</b>	0.5[0.27-0.93]
<b>I</b>	7 (0.09)	13 (0.14)	1.13	0.287	
<b>E</b>	7 (0.09)	13 (0.14)	1.13	0.287	
<b>J</b>	7 (0.09)	11 (0.12)	0.46	0.498	
<b>G</b>	2 (0.03)	4 (0.04)	0.6	0.439	
<b>K/P</b>	1 (0.01)	3 (0.03)	1.04	0.309	

\*A todos os valores de  $X^2$  foi aplicado a correcção de Yate's.

Dos resultados obtidos poder-se-ia depreender que o haplogrupo R do cromossoma Y possuiria uma influência positiva na fertilidade masculina, no entanto, seria imprudente tirar tal conclusão sem aprofundar a investigação. Tendo em conta que o problema de subestruturação populacional aqui não se enquadra, pois ambas as populações estão correctamente combinadas microgeograficamente, resta a condição deste haplogrupo ser o mais frequente na população típica europeia, e então, estar a influenciar os resultados. Seguindo esta linha de pensamento decidiu-se averiguar este domínio do haplogrupo R na população controlo de indivíduos férteis.

#### **3.4. Associação da Infertilidade Masculina com Haplogrupos Mitocondriais e do Cromossoma Y: Cruzamento de Dados.**

Dirigiu-se a análise para a distribuição dos haplogrupos do cromossoma Y pelos diversos haplogrupos do ADNmt individualmente. Para esta abordagem, recorreu-se, novamente, ao agrupamento dos haplogrupos com menor número de indivíduos com o intuito de não comprometer o teste estatístico. A comparação das duas populações, caso e controlo, para a frequência de distribuição dos haplogrupos do cromossoma Y em cada haplogrupo mitocondrial, não exibiu diferenças significativas, relativamente aos haplogrupos de Y-SNPs detectados em cada uma das populações. A Tabela 3.8 mostra os valores de  $p$  resultantes do teste de Fisher, entre as populações de indivíduos férteis e inférteis, quando se comparou as frequências dos haplogrupos do cromossoma Y pelos haplogrupos do ADNmt em separado.

Tabela 3. 8. Valores de Probabilidade para o Teste de Fisher da comparação dos Haplogrupos do Cromossoma Y pelos Haplogrupos Mitocondriais em separado entre a População Caso e Controlo

Fért	Infér	CRS	H	H*	HV/V	J/T	U/K	Outros
CRS		0.202	-	-	-	-	-	-
H		-	0.976	-	-	-	-	-
H*		-	-	0.530	-	-	-	-
HV/V		-	-	-	0.533	-	-	-
J/T		-	-	-	-	1	-	-
U/K		-	-	-	-	-	0.757	-
Outros		-	-	-	-	-	-	0.419

H\* = H + CRS

Outros = W + X + I + N + L

Já da análise estatística para cada classe haplotípica do cromossoma Y, ocorrendo em cada haplogrupo mitocondrial, contra todos os restantes haplogrupos, obteve-se significância estatística, uma vez mais, entre indivíduos férteis e inférteis (Tabela 3.9). A análise demonstrou uma diferença, com nível significativo, para o haplogrupo R do cromossoma Y ocorrendo no haplogrupo CRS mitocondrial ( $X^2$  OR = 0.22, 95%CI = 0.05-0.94,  $p = 0.033$ ). Evidencia-se, assim, uma combinação entre o haplogrupo CRS mitocondrial e o haplogrupo R do cromossoma Y, com predomínio na população de indivíduos férteis. A Tabela 3.9 mostra a distribuição do haplogrupos do cromossoma Y dentro do haplogrupo CRS mitocondrial e seus respectivos valores de  $p$ , resultantes do teste estatístico utilizado.

Tabela 3. 9. Resultados do Teste de Associação entre os Haplogrupos do Cromossoma Y e o Risco para a Infertilidade dentro do Haplogrupo Mitocondrial CRS

#### CRS x

Haplogrupo	Férteis	Inférteis	$\chi^2$	Valor $p$	OR [95%CI]
R	12 (0.75)	8 (0.4)	4.54	<b>0.033</b>	<b>0.2[0.05-0.94]</b>
I	1 (0.06)	5 (0.25)	2.55	0.11	
E	2 (0.13)	2 (0.1)	0.32	0.572	
J	1 (0.06)	4 (0.2)	1.73	0.188	
G	0	1 (0.05)	2.06	0.151	

\*aos valores de  $X^2$  foi aplicada a correcção de Yate's

Este resultado, e tendo em conta o problema trivial relacionado com o tamanho da amostragem, poderá indiciar um possível efeito protector nos indivíduos que carregam tal combinação, diminuindo o risco de infertilidade masculina. De facto, estudos anteriores patenteiam a estabilidade desta linhagem do haplogrupo Y. Embora tenham concluído que a estrutura do cromossoma de indivíduos do haplogrupo R não seja protector contra deleções, as suas sequências palindrómicas são mais estáveis (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001; Fernandes et al., 2004). Talvez esta combinação entre haplogrupo R do cromossoma Y e CRS do ADNmt proporcione um fundo genético com condições de estabilidade propícias à fixação do fenótipo da fertilidade. Contudo, está bem assente que o haplogrupo R retrata o grupo de linhagens mais frequente na população típica europeia (Semino et al., 2000; Jobling & Tyler-Smith, 2003), bem como na população portuguesa (Gonçalves et al., 2005), o mesmo se verificando para o haplogrupo CRS mitocondrial (González et al., 2003). A ser real a influência desta combinação entre haplogrupos do Y e do ADN mitocondrial no risco para a infertilidade masculina, verificar-se-ia uma diminuição na frequência do fenótipo da infertilidade na população portuguesa, relativamente a outras populações não europeias, como consequência directa. Seria uma possibilidade a ser testada em estudos vindouros.

As Figuras 3.9, 3.10, 3.11 e 3.12, exibem a distribuição dos haplogrupos do cromossoma Y pelos restantes haplogrupos mitocondriais, nas populações de indivíduos férteis e inférteis, com os respectivos valores de probabilidade resultantes do teste de comparação entre ambas. Apenas a aproximação para o haplogrupo CRS foi apresentada em tabela (Tabela 3.9), visto ser a única a exibir um resultado estatístico com relevância, possibilitando assim, a exposição de todos os dados.

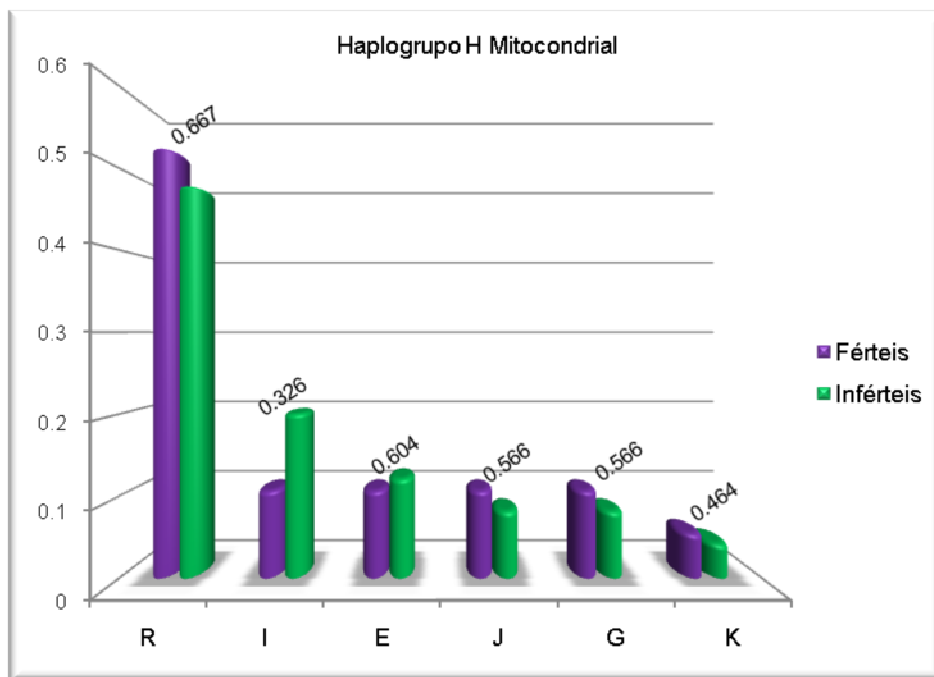


Figura 3. 9. Distribuição dos haplogrupos Y pelo haplogrupo H mitocondrial.

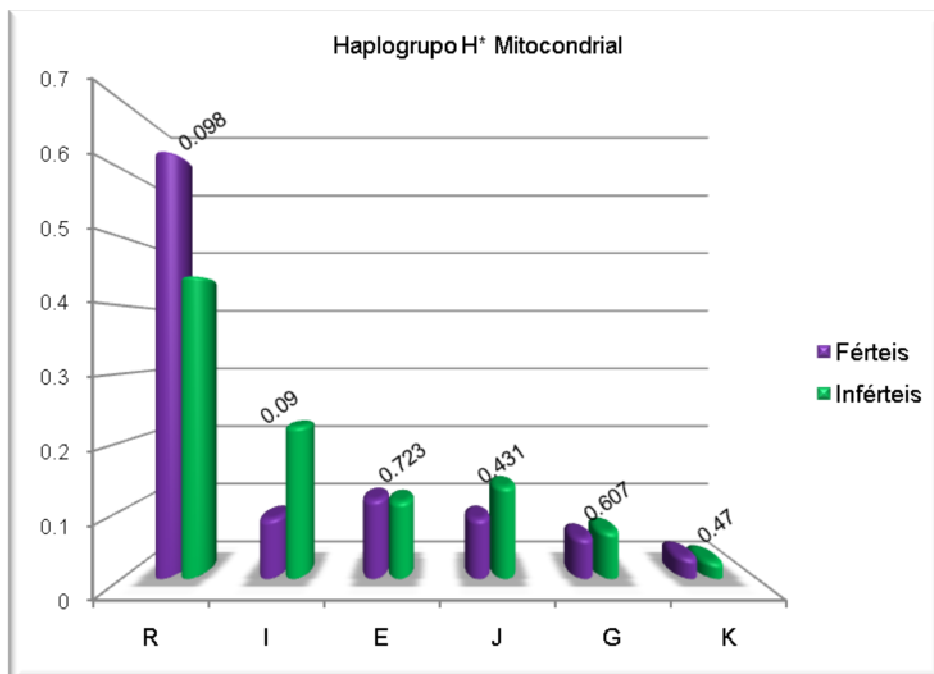


Figura 3. 10. Distribuição dos haplogrupos Y pelo haplogrupo H\* (H + CRS) mitocondrial.

No haplogrupo H\* (H+CRS), e embora não havendo significância estatística ( $p = 0.09$ ), nota-se uma ligeira predominância do haplogrupo I com o padrão 2\*4d no grupo dos indivíduos inférteis (Figura 3.10). Talvez pela amostra não ser suficientemente significativa, não se obteve

um resultado estatístico significativo.

Outro problema inerente aos estudos associativos, para além da questão do número de indivíduos por amostra, relaciona-se com as baixas frequências de distribuição para alguns haplogrupos, quer do cromossoma Y, quer do ADN mitocondrial. Efectivamente, o haplogrupo I do cromossoma Y não pertence ao grupo dos haplótipos mais representativo das populações típicas europeias. Não obstante, este haplogrupo já sobressai em estudos de infertilidade anteriores pelo seu característico padrão DAZ 2\*4d (Fernandes et al., 2006), pelo que seria interessante averiguar este ligeiro predomínio de haplótipos I neste haplogrupo mitocondrial.

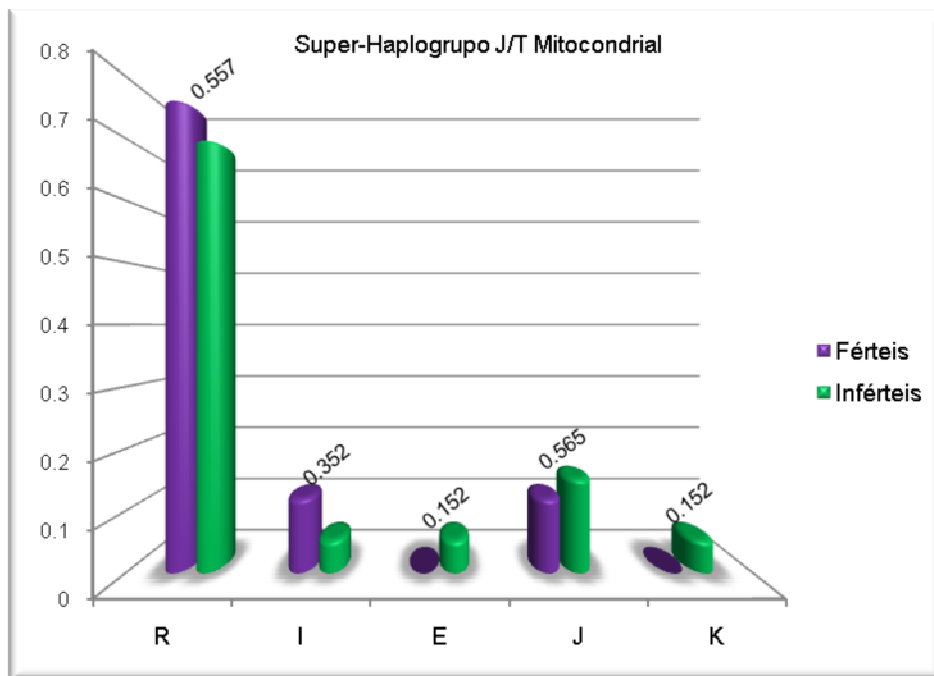


Figura 3. 11. Distribuição dos haplogrupos Y pelo super-haplogrupo J/T mitocondrial.

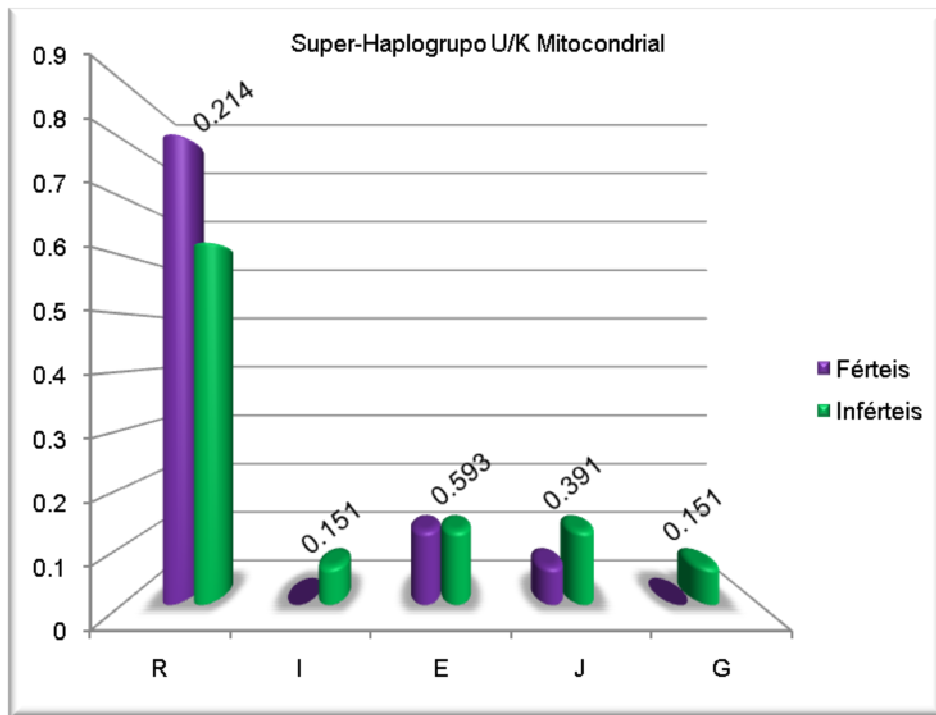


Figura 3. 12. Distribuição dos haplogrupos Y pelo super-haplogrupo U/K mitocondrial.

Refere-se que pelo motivo das baixas frequências de distribuição para determinados haplogrupos anteriormente discutido, não se apresentam aqui os resultados para a classe “Outros”, caracterizada pelos haplogrupos do ADNmt W, X, I, W, N e L. A ausência de indivíduos em determinadas classes não permitiu a correcta aplicação do teste estatístico, sendo por isso, irrelevante para este estudo.

Com o intuito de aprofundar a combinação do haplogrupo R do cromossoma Y e CRS do ADNmt com propensão para a fertilidade masculina, focou-se o estudo para o padrão de DAZ dos indivíduos, na procura de uma possível causa para a maior ocorrência de haplótipos R em indivíduos férteis, pertencentes ao haplogrupo CRS mitocondrial.

### 3.5. Associação do Padrão DAZ com a Infertilidade

Por ser a causa genética mais frequente na infertilidade severa, daí o seu atractivo em estudos associativos, as deleções na região AZFc foram aqui analisadas. Investigou-se uma

possível associação entre o padrão DAZ, com e sem deleção, e os haplogrupos do cromossoma Y e, conseqüentemente, com os haplogrupos do ADN mitocondrial. As figuras 3.13 e 3.14 exibem a distribuição das frequências do padrão de DAZ, em ambas as populações, pelos haplogrupos mitocondriais.

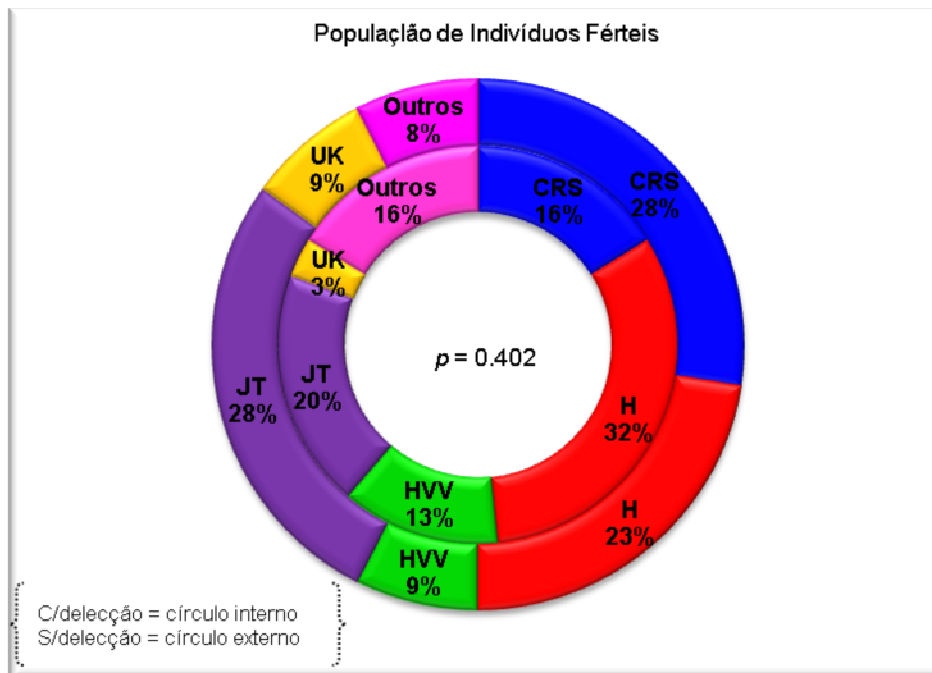


Figura 3. 13. Distribuição do padrão DAZ com e sem deleção na população de indivíduos férteis em relação aos haplogrupos mitocondriais.

Refere-se que a expressão “com e sem deleção” do padrão de DAZ utilizada no presente trabalho corresponde, na realidade, a “sem 4d e com 4d”, respectivamente, visto a condição sem deleção no haplogrupo R se tratar de uma duplicação do DAZ4 (Fernandes et al., 2006). Deu-se preferência à denominação que ainda prevalece na literatura de modo a facilitar a análise.

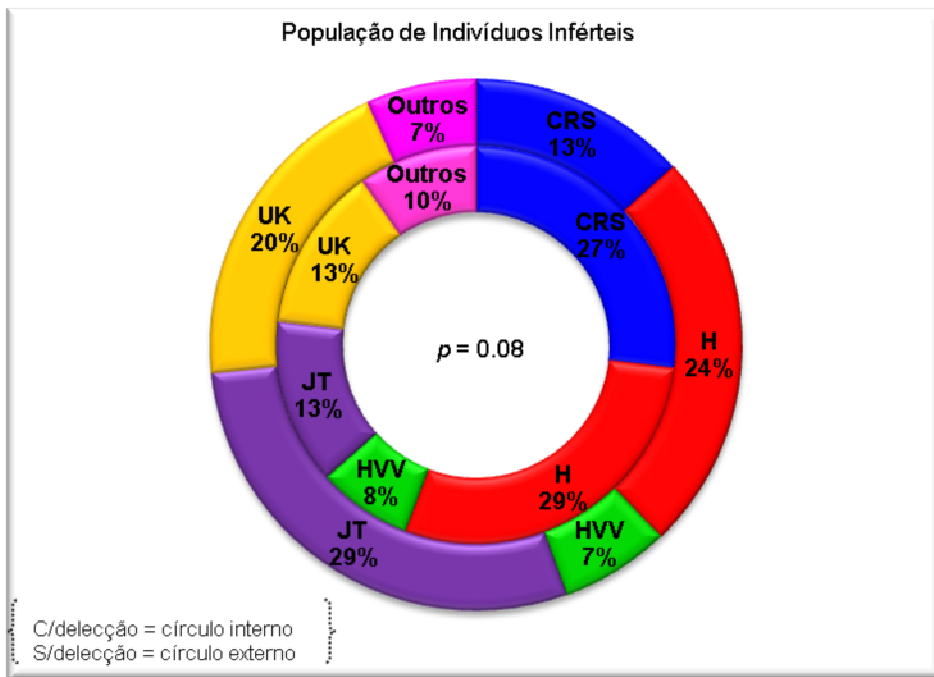


Figura 3. 14. Distribuição do padrão DAZ com e sem deleção na população de indivíduos inférteis em relação aos haplogrupos mitocondriais.

Focando a análise para o padrão de DAZ em ambas as populações de indivíduos férteis e inférteis, observou-se uma predominância de deleções na população caso (Figura 3.15). Este resultado está de acordo com estudos obtidos anteriormente, onde se evidencia a capacidade de certas deleções parciais provocarem a falência espermática (Moro et al., 2000; Bienvenu et al., 2001; Ferlin et al., 2002, 2004; Fernandes et al., 2002; de Vries et al., 2002). Foi já demonstrado que, para além de deleções completas de AZFc, certas deleções parciais representam um factor de risco para a infertilidade masculina (Ferlin et al., 2005).

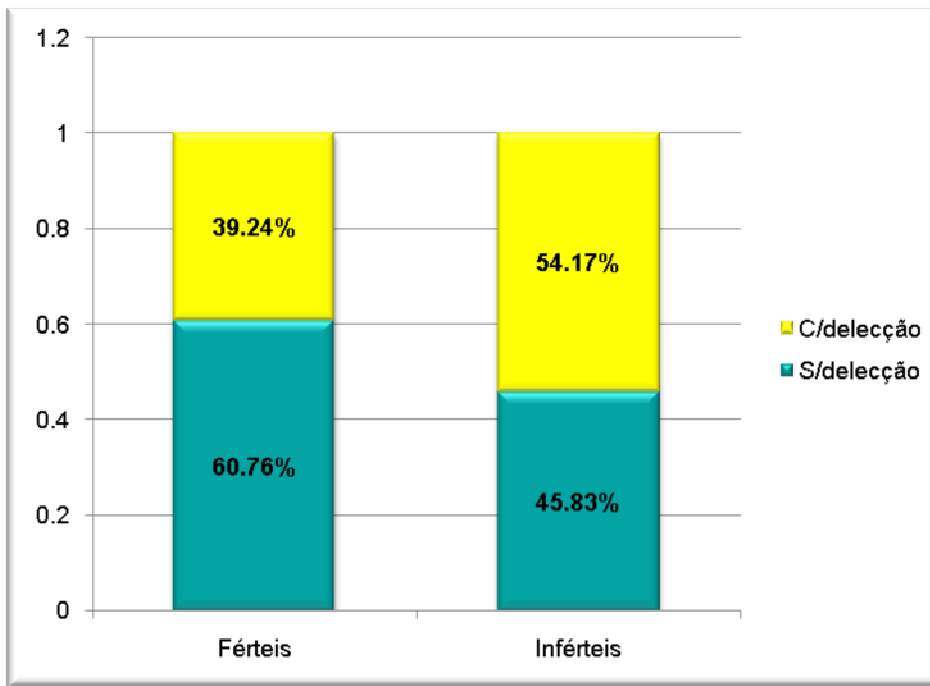


Figura 3. 15. Frequências do padrão de DAZ com e sem deleção pelas populações de indivíduos férteis e inférteis.

Em paralelo, examinou-se uma possível associação entre o haplogrupo R do cromossoma Y e a maior ou menor expressividade do padrão de DAZ com e sem deleção (Figura 3.16).

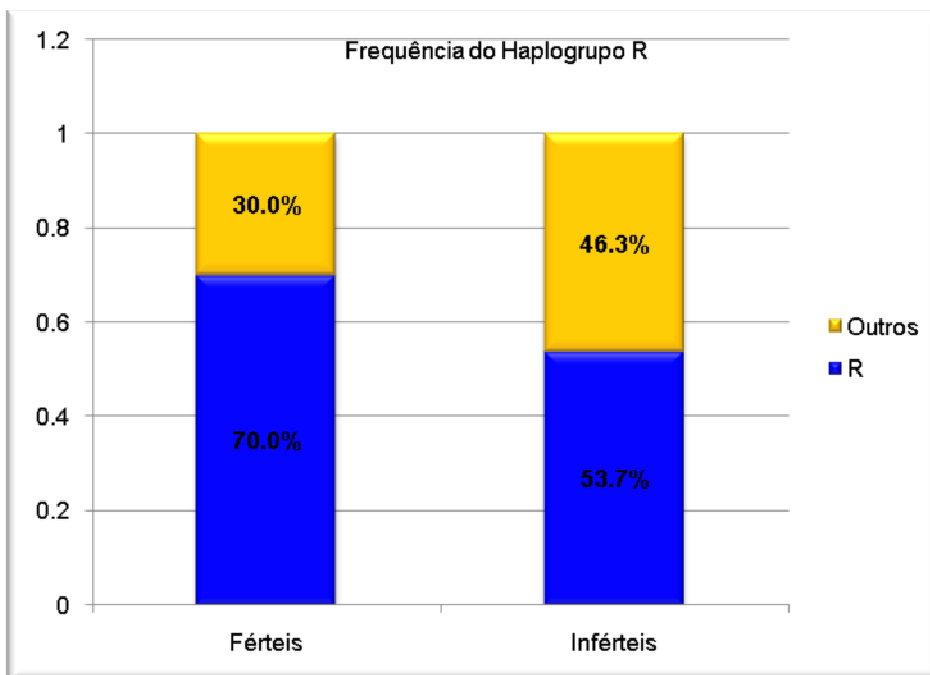


Figura 3. 16. Frequência do haplogrupo R pelas populações de indivíduos férteis e inférteis.

Efectivamente, a frequência com que o haplogrupo R ocorre na população controlo coaduna com a fracção maioritária do padrão de DAZ sem deleção, o contrário sendo verdadeiro para a população dos indivíduos inférteis. Adicionalmente, os resultados mostram o predomínio de indivíduos pertencentes ao haplogrupo R no grupo dos férteis, firmando a ideia que, por ser uma estrutura mais estável, será menos susceptível a deleções (Ferlin et al., 2003). Poder-se-ia daqui indagar sobre o papel do haplogrupo R e as deleções de DAZ, e conseqüentemente, sua influência na infertilidade masculina. Aparentemente, esta linhagem R do cromossoma Y poderá ser menos susceptível às deleções da região DAZ, protegendo os indivíduos do fenótipo da infertilidade quando associada ao haplogrupo CRS mitocondrial, embora não exista qualquer significância estatística apoiando esta suposição. De facto, e embora tendo concluído que a estrutura do cromossoma de indivíduos do haplogrupo R não proteja contra deleções, as suas sequências palindrómicas são mais estáveis (Kuroda-Kawaguchi et al., 2001; Fernandes et al., 2004).

Seguindo esta linha de pensamento, orientou-se a análise para a investigação de outros factores capazes de influenciar este padrão do haplogrupo R com a infertilidade masculina. Recorreu-se, novamente, ao cruzamento de dados do Y com a informação adquirida da análise mitocondrial. Da comparação do padrão de DAZ, com e sem deleção, e os haplogrupos mitocondriais não se obtiveram diferenças entre as populações caso e controlo em estudo (Tabela 3.10).

Tabela 3. 10. *Valores de Probabilidade para o Teste de  $X^2$  da comparação entre o Padrão DAZ com e sem deleção e os Haplogrupos Mitocondriais entre a População de Indivíduos Férteis e Inférteis*

S/del	CRS	H	H*	HV/V	J/T	U/K	Outros
<b>Fér vs Inf</b>	0.236	0.446	0.781	0.665	0.449	0.699	0.552
C/del	CRS	H	H*	HV/V	J/T	U/K	Outros
<b>Fér vs Inf</b>	0.288	0.758	0.41	0.319	0.397	0.74	0.542

A partir da análise dos grupos filogenéticos mitocondriais em separado para a sua associação com o padrão de DAZ com e sem deleção, surgiram, uma vez mais, diferenças significativas ( $\chi^2$  OR = 0.19, 95%CI = 0.05-0.81,  $p = 0.019$ ), entre os indivíduos com e sem deleção, para o haplogrupo CRS (Tabela 3.11). Focando no padrão de DAZ dentro de cada haplogrupo mitocondrial, verificou-se a existência de uma superioridade do padrão sem deleção no haplogrupo CRS, para os indivíduos férteis, com significância estatística. Para os restantes haplogrupos mitocondriais o mesmo não foi observado. Contrariamente, no grupo dos indivíduos inférteis presencia-se uma predominância de indivíduos albergando deleções no gene DAZ, podendo indicar, uma vez mais, que a maior ocorrência destas deleções parciais nos indivíduos favorece o fenótipo da infertilidade masculina. A Tabela 3.11 exhibe os valores de probabilidade para o teste  $\chi^2$  resultantes da comparação do padrão de DAZ com e sem deleção, entre a população de indivíduos férteis e inférteis.

Tabela 3. 11. *Resultados da Associação entre os Grupos Filogenéticos Mitocondriais e o Padrão de DAZ com e sem deleção no Risco para a Infertilidade*

Hg	Férteis		Inférteis		$\chi^2$	Valor P	OR[95%CI]
	C/del	S/del	C/del	S/del			
CRS	0.31	0.69	0.7	0.3	5.46	<b>0.019</b>	<b>0.19[0.05-0.81]</b>
H	0.5	0.5	0.58	0.42	0.34	0.558	
H*	0.41	0.59	0.63	0.37	3.8	0.051	
HV/V	0.25	0.75	0.57	0.43	1.49	0.222	
J/T	0.35	0.65	0.35	0.65	0.12	0.73	
U/K	0.27	0.73	0.44	0.56	1.13	0.287	
Outros	0.57	0.43	0.71	0.29	0.24	0.43	

H\* = H + CRS

Outros = W + X + I + N + L

De facto, estes resultados estão em conformidade com a associação obtida entre a combinação CRS/R previamente examinada. A frequência expressiva de linhagens R do

cromossoma Y associado ao haplogrupo CRS mitocondrial, indiciando uma combinação protectora, implicaria um decréscimo na ocorrência de deleções parciais no gene DAZ, uma vez que estas suscitam a falência espermática (Moro et al., 2000; Bienvenu et al., 2001; Ferlin et al., 2002, 2004; Fernandes et al., 2002; de Vries et al., 2002).

Do presente cruzamento de dados observou-se a predominância de indivíduos com estrutura do cromossoma Y típica do haplogrupo R no haplogrupo CRS mitocondrial dos indivíduos férteis, uma menor expressividade de deleções no mesmo haplogrupo R e a consequente associação da frequência de deleções e o haplogrupo CRS no risco para a infertilidade. A partir destes dados poder-se-ia inferir sobre a capacidade desta combinação CRS/R na protecção dos indivíduos contra o risco da infertilidade masculina. A Figura 3.17 ilustra a discrepância na distribuição dos indivíduos férteis e inférteis sem deleções pelos diversos haplogrupos do ADNmt e a Figura 3.18 relativa à distribuição com deleção.

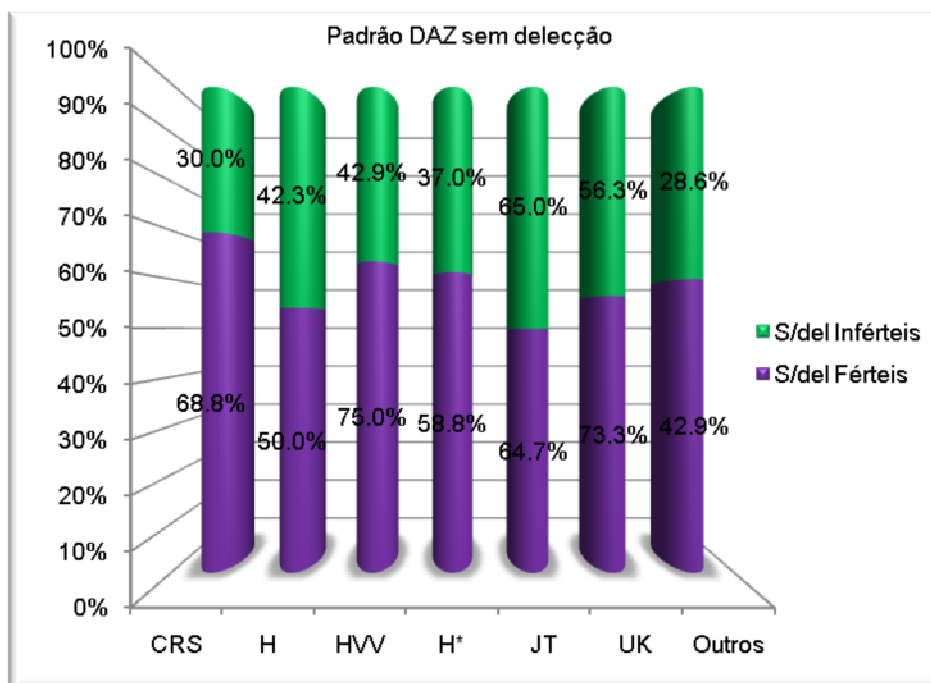


Figura 3. 17. Distribuição do padrão de DAZ sem deleção para cada haplogrupo mitocondrial individualmente.

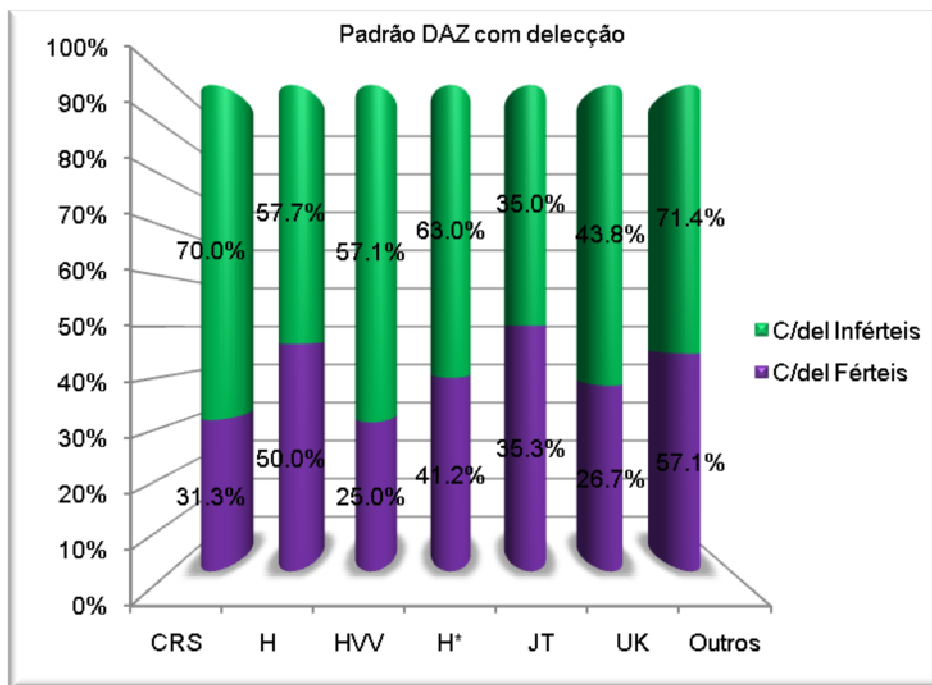


Figura 3. 18. Distribuição do padrão de DAZ com deleção para cada haplogrupo mitocondrial.

Examinando ambas as Figuras 3.17 e 3.18, denota-se o domínio dos indivíduos férteis sem deleções sobre os indivíduos inférteis também sem deleções, na maioria dos haplogrupos mitocondriais. Do mesmo modo, relativamente ao padrão de DAZ com deleção, os indivíduos inférteis são os maiores representantes pelos haplogrupos do ADNmt. Particular atenção deverá ser dada em relação ao super-haplogrupo J/T, que parece desviar-se do padrão corrente. Refira-se que o grupo considerado “Outros”, que igualmente demonstra irregularidades na tendência, não foi analisado em pormenor pois o número muito baixo de indivíduos pode estar na base de tal resultado.

É de notar nas Figuras 3.17 e 3.18 a ligeira superioridade na frequência do padrão de DAZ sem deleção em indivíduos inférteis no haplogrupo J/T mitocondrial e de indivíduos férteis com deleções no mesmo haplogrupo, contrariando a tendência observada. Temos aqui um haplogrupo mitocondrial onde os indivíduos inférteis, sem deleções, predominam. Para melhor examinar esta situação, restringiu-se a análise ao super-haplogrupo J/T mitocondrial na população dos indivíduos inférteis. Examinaram-se as diferenças entre as distribuições de indivíduos inférteis com e sem deleções pelos haplogrupos mitocondriais (Figura 3.19).

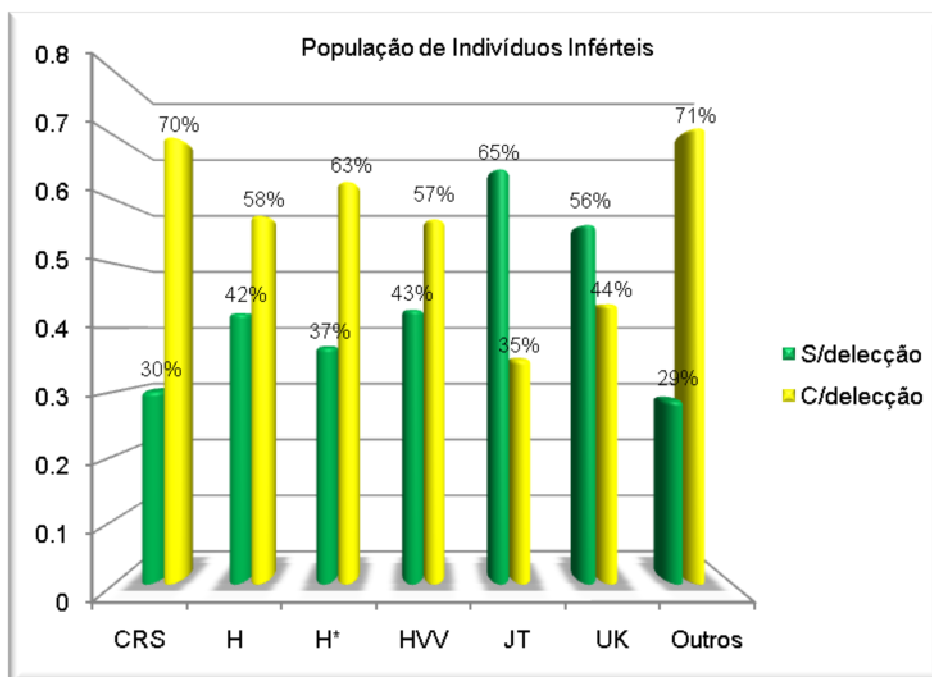


Figura 3. 19. Distribuição do padrão DAZ com e sem deleção dentro de cada haplogrupo mitocondrial na população de indivíduos inférteis

De facto, o super-haplogrupo J/T revela um predomínio dos indivíduos sem deleções sobre os indivíduos albergando deleções. Surpreendentemente, surgem resultados semelhantes para o super-haplogrupo U/K.

Ao comparar estatisticamente o padrão de DAZ para o haplogrupo J/T na população caso, obteve-se um valor que, embora não significativo ( $p=0.053$ ), merece especial atenção visto escapar à tendência normal observada (Tabela 3.12).

Tabela 3. 12. Valor de Probabilidade para o Teste de  $X^2$  entre o Padrão DAZ com e sem deleção na População de Inférteis

Inférteis	CRS	H	J/T	U/K	HV/V	Outros
CRS	0.103	-	-	-	-	-
H	-	0.625	-	-	-	-
J/T	-	-	<b>0.053</b>	-	-	-
U/K	-	-	-	0.346	-	-
HV/V	-	-	-	-	0.662	-
Outros	-	-	-	-	-	0.291

Tendo em conta a suspeita assente anteriormente sobre a ocorrência, em paralelo, de

linhagens R e indivíduos sem deleções, optou-se por investigar esta condição com a distribuição do haplogrupo R (Figura 3.20).

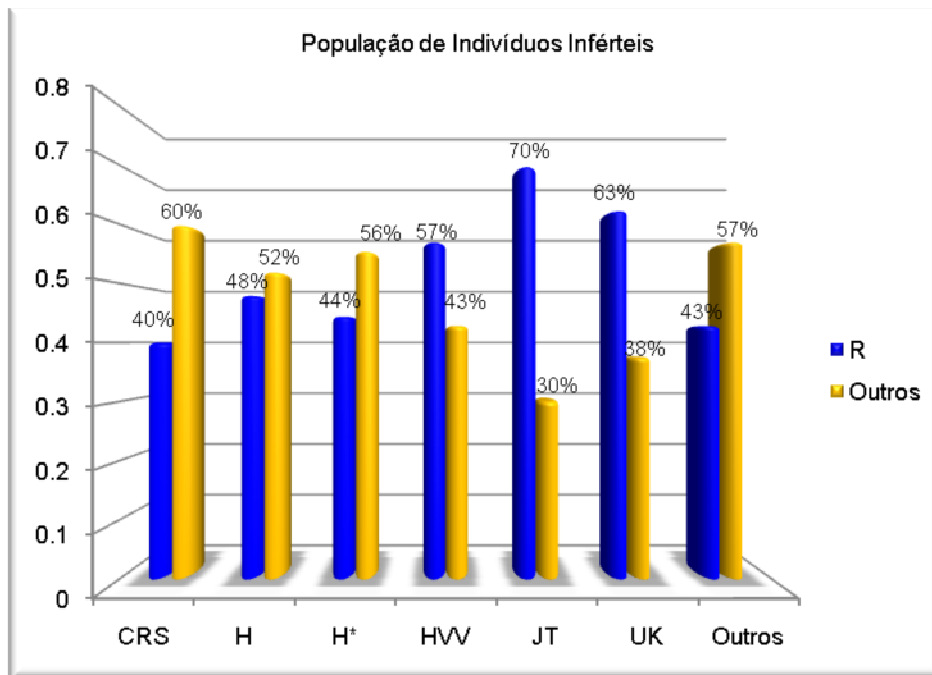


Figura 3. 20. Distribuição do haplogrupo R dentro de cada haplogrupo mitocondrial na população de inférteis.

De facto, observando a distribuição dos haplogrupos do cromossoma Y neste supergrupo mitocondrial, verifica-se uma predominância do haplogrupo R, sugerindo ser a causa para a reduzida ocorrência de indivíduos com deleções, no entanto, esta condição não é exclusiva para este haplogrupo mitocondrial verificando-se o mesmo para o superhaplogrupo U/K (Figura 3.20). Refira-se ainda que, pela ausência de significância estatística nos testes de associação, não se poderá fazer qualquer inferência sobre a condição observada, no entanto, a sua investigação seria conveniente e vantajosa.

Destas observações poder-se-ia auferir dois juízos. Primeiramente, notabiliza-se um padrão corrente reflectindo uma menor ocorrência de deleções, concomitantemente com uma maior frequência de linhagens R pelos vários haplogrupos mitocondriais, como se pode verificar nas Figuras 3.19 e 3.20. Existiria, então, uma linhagem R do cromossoma Y mais estável e menos susceptível a deleções, a influenciar, positivamente, o fenótipo da fertilidade masculina. Segundo, este haplogrupo R poderá influenciar, hipoteticamente, de maneira

oposta ao observado no haplogrupo CRS mitocondrial, quando associado a este super-haplogrupo J/T ou ao U/K. Assim, o haplogrupo R teria diferentes efeitos na condição de fertilidade consoante o fundo genético mitocondrial onde ocorre.

Com o intuito de averiguar a credibilidade desta teoria, estudou-se, de igual forma, a população de indivíduos férteis procurando replicar o mesmo padrão observado na população dos indivíduos inférteis. Da Figura 3.21 assinala-se a preponderância, já anteriormente observada, de indivíduos não apresentando deleções no gene DAZ em todos os haplogrupos mitocondriais, exceptuando-se o super-grupo “Outros” onde se inclui os haplogrupos W/X/I/N e L.

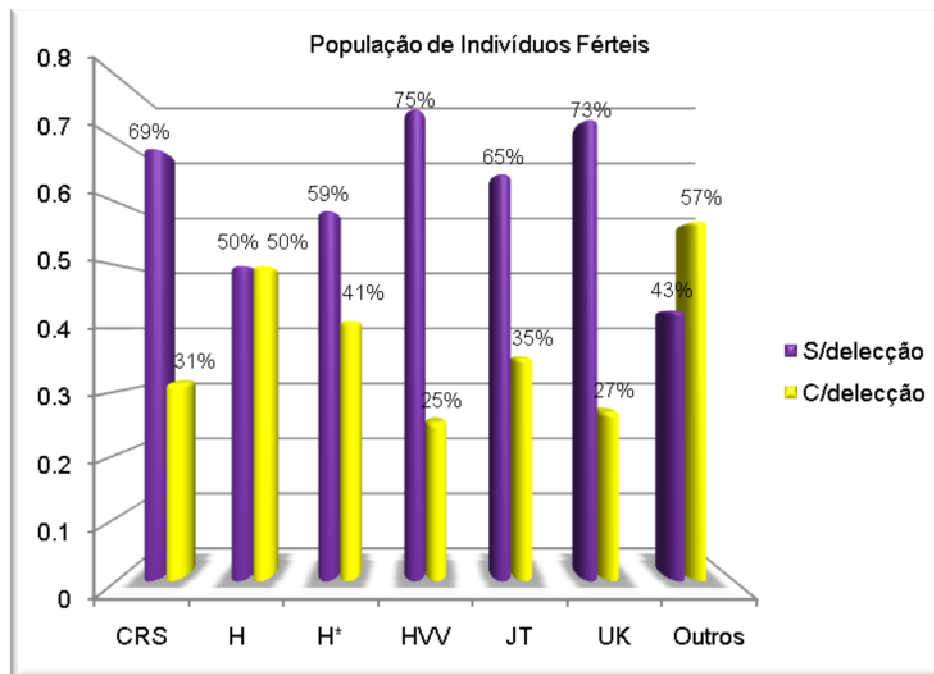


Figura 3. 21. Distribuição do padrão DAZ com e sem deleção dentro de cada haplogrupo mitocondrial na população de indivíduos férteis.

Seguindo o encadeamento do estudo, explorou-se a distribuição do haplogrupo R do cromossoma Y. Em concordância com o raciocínio anterior, os indivíduos pertencentes ao haplogrupo R predominam, concomitantemente, com o padrão de DAZ sem deleção pelos vários grupos mitocondriais, conferindo com o padrão observado na população de indivíduos inférteis (Figura 3.22). Todavia, nos super-haplogrupos J/T e U/K, não se observa qualquer irregularidade no padrão das deleções mantendo, assim, a predominância de indivíduos sem

delecções, e demonstrando a mesma tendência exibida na população de indivíduos inférteis. Denota-se, no entanto, uma diferença relevante entre as duas populações na ocorrência de linhagens R relativamente aos demais haplogrupos. Por exemplo, no super-haplogrupo U/K da população de férteis temos 81% de indivíduos R e 19% de indivíduos pertencentes a outros haplogrupos contra os 63% e 38%, respectivamente, na população de indivíduos inférteis. Tendo em conta a suspeição à volta dos haplogrupos T e U na infertilidade masculina, este haplogrupo R quando associado aos super-haplogrupos J/T ou ao U/K poderá contrabalançar o efeito provocado pelos mesmos. Deste modo, o haplogrupo R teria um efeito atenuador na condição de infertilidade masculina quando associado a haplogrupos prejudiciais. Neste caso, é provável que seja o tamanho da amostra o factor determinante para a falta de significância nos resultados.

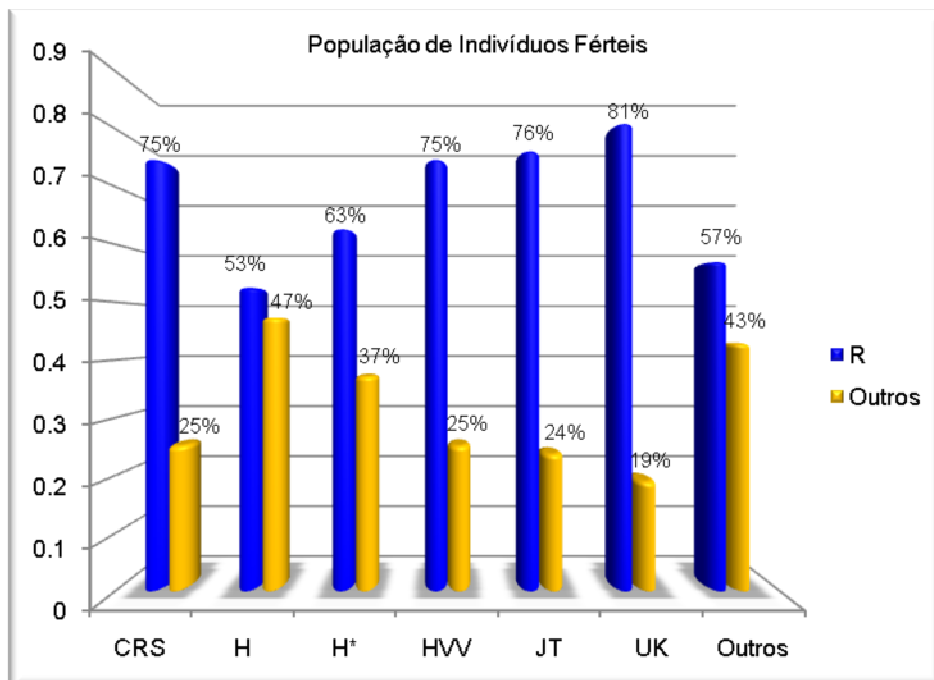


Figura 3. 22. Distribuição do haplogrupo R dentro de cada haplogrupo mitocondrial na população de inférteis.

Valida-se aqui a forte relação entre as linhagens R e o padrão sem delecção na ocorrência do fenótipo de fertilidade, embora, fique por esclarecer a sua influência nos grupos mitocondriais J/T e U/K na infertilidade masculina. Porventura, poderá estar subliminar ao estudo algum factor a nível do ADN mitocondrial, como possíveis mutações particulares destes

super-haplogrupos, que em conjunto com a linhagem R crie esta condição. O próprio padrão de DAZ, nas suas diversas variantes, poderá ter um papel preponderante no risco para a infertilidade masculina. Como já mencionado, estes dois haplogrupos, T e U, têm sido associados à infertilidade masculina em trabalhos anteriores, mas os seus resultados não têm sido reproduzidos. É possível que outros factores estejam a exercer influência, todavia, negligenciados ou postos de parte nos variados estudos, como seja o fundo genético mitocondrial ou padrões do gene DAZ. Obviamente, estes fundos mitocondriais poderão não representar o agente central na expressão de um determinado fenótipo, actuando apenas de modo sinérgico com outras mutações do ADN mitocondrial. Este trabalho de investigação não foi direccionado a nenhuma mutação em particular, mas perante os resultados, seria salutar a averiguação de tal possibilidade, particularmente nestes haplogrupos do ADN mitocondrial e do cromossoma Y que demonstraram relevância na associação com a fertilidade quando combinados.

Têm sido estabelecidas variadas associações entre haplogrupos e diversas doenças, incluindo a infertilidade masculina, porém, o problema da ausência de confirmação de tais resultados, em estudos utilizando diferentes populações ou até do surgimento de resultados conflituosos, ainda subsiste. É razoável afirmar que, e perante as limitações inerentes ao presente trabalho de investigação de seguida argumentadas, só se poderá concluir com certeza a veracidade das correntes observações, após o sucesso na replicação dos resultados e insucesso na identificação de novas fontes de erro/enviesamento por parte de grupos independentes.

O problema da ausência de resultados estatísticos com significância em determinadas aproximações poderá advir da pendência, já discutida, sobre a limitação das amostras. Presentemente, estipula-se que para obter 90% de poder estatístico na detecção de 10% de alterações entre casos e controlos na frequência do haplogrupo H típico europeu, seriam necessários, aproximadamente, 6.000 indivíduos para cada amostra (Samuels et al., 2006). Para análises com haplogrupos menos frequentes, como é o caso do haplogrupo T e U,

teríamos que ampliar, significativamente, o recrutamento de indivíduos ou então focar em alterações mais expressivas nas frequências haplotípicas. Seria interessante especular estes dois haplogrupos e sua associação com haplogrupo R do cromossoma Y com amostras mais abrangentes.

As vantagens sobrevindas dos clássicos estudos caso-controlo tornam-os na estratégia mais utilizada em estudos de associação (Cardon & Bell, 2001), envolvendo a caracterização do seu contributo genético nas variadas patologias. Além de permitirem uma rápida obtenção das amostras caso, estas podem ser facilmente caracterizadas geneticamente e comparadas com as amostras controlo. Contudo, este tipo de aproximação tem demonstrado maior susceptibilidade na identificação de variantes erroneamente associados às patologias. Regularmente, estas falsas associações são definidas pela incapacidade de replicação dos resultados originais em estudos subsequentes.

Uma dificuldade particular patente neste tipo de abordagem é a selecção dos controlos. Este passo é crucial visto qualquer diferença existente na frequência haplotípica entre casos e controlos poderá sugerir uma associação à patologia, mesmo se apenas reflectirem o resultado directo de migrações históricas, diferenças no género, práticas de cruzamento ou outros processos independentes (Cardon & Bell, 2001). A selecção da população controlo apropriada é essencial na correcta estruturação da estratégia em estudos caso-controlo. Idealmente, mas notoriamente difícil de conseguir, uma amostra controlo deverá reflectir a composição étnica e genética da amostra caso.

Os estudos prospectivos providenciam populações controlo robustas, mas substancialmente mais dispendiosos, daí a alternativa na selecção da população controlo passar pelo recrutamento de várias subpopulações, reflectindo as diversas subestruturas susceptíveis de existir na população caso, desde a etnia à idade e sexo. Este tipo de abordagem permitiria testar as frequências haplotípicas da população caso, contra um painel de controlos correctamente combinados, bem como avaliar frequências haplotípicas de

subpopulações com o poder para enviesar o resultado. Qualquer distorção na frequência haplotípica no grupo caso que esteja fora do alcance das frequências controlo, reflectiria efeitos aparentemente reais. A subestruturação é um problema real. A presença de múltiplos subgrupos apresentando diferentes frequências haplotípicas numa população poderá ser independente da doença dentro de cada grupo e podem levar a conclusões erróneas na relevância da doença.

É impreterível referir outro tipo de limitações que, embora os esforços para o evitar, representa sempre uma eventualidade subjacente neste tipo de estudos onde há produção de sequências. De entre os artefactos de sequenciação, os mais comuns resumem-se à contaminação ou mistura de amostras, induzindo normalmente a recombinantes artificiais (Bandelt et al., 2002, 2004) e erros na documentação, sobrevivendo do mau tratamento dos dados e documentação das sequências (Bandelt et al., 2001; Yao et al., 2003). Alguns autores (Coble et al., 2004), tomam já certas precauções a fim de evitar tais erros indutores de incorrecções na sequenciação, como sequenciar ambas as cadeias de ADNmt ou sequenciar somente uma cadeia pelo menos duas vezes, e a utilização concomitante de duas pessoas na observação e compilação dos polimorfismos detectados nas sequências, resultantes da comparação com a sequência rCRS. É imprescindível seguir um tipo de guia orientativo para a prevenção de erros quando produzindo sequências ADN mitocondrial (Salas et al., 2005), bem como disponibilizar instrumentos informáticos poderosos que permitam rápidas verificações de sequências completas ou parciais.

Outro aspecto problemático, referido várias vezes ao longo do trabalho, surge do limitado número de indivíduos representativos de cada amostra. Não sendo facilmente ultrapassado, visto a impossibilidade de elevados números de indivíduos para patologias raras e o dispêndio resultante do trabalho de laboratório procedente, seria vantajoso adoptar uma abordagem distinta na análise da variação haplotípica nos indivíduos com determinados fenótipos. A sequenciação da molécula mitocondrial no seu todo, mas em reduzido número de

amostras, permitiria uma visão filogenética completa dos dados e protecção acrescida dos falsos-positivos, advindos da fraca combinação entre casos e controlos (Bandelt et al., 2005b; Kong et al., 2006). Crê-se que os estudos com características associativas beneficiariam com a prática da sequenciação completa da molécula de ADNmt (Risch & Merikangas, 1996) ou, pelo menos, com a contínua identificação e actualização das variantes encontradas ao longo dos diversos estudos (Cardon & Watkins, 2000).

Por último, enfatiza-se o problema das filogenias actualmente disponíveis na literatura. A actualização da filogenia mundial do ADN mitocondrial, particularmente as filogenias dos diversos países, providenciaria maior resolução em estudos típicos como o presente, onde se combinam a genética populacional, evolução molecular e associação a patologias. Como observado, a estratificação populacional está subjacente a vários casos ilusórios de associação positiva, originando resultados incongruentes de estudo para estudo. Daí a necessidade de se estabelecer uma parceria resoluta não só entre a Genética Médica e a Genética Forense mas também com a Genética Populacional.







## **CAPÍTULO IV**

### **IV. CONCLUSÕES**

Na presente dissertação apresentam-se os resultados de um estudo que incidiu na possível, ou provável, influência da variabilidade da região hipervariável HVS-I do ADN mitocondrial na infertilidade masculina considerando outras variáveis até agora subliminares aos variados estudos efectuados no mesmo âmbito, como os haplogrupos do cromossoma Y.

A investigação efectuada teve por objectivo pesquisar um factor impulsionador para a fixação da infertilidade masculina, numa determinada combinação entre os haplogrupos mitocondriais e os haplogrupos do cromossoma Y.

Com efeito, foram analisadas 212 amostras de ADN de indivíduos originários do Norte de Portugal, 122 diagnosticados como inférteis e 90 indivíduos férteis, constituindo as duas populações, caso e controlo, alvo do presente estudo. De todos os indivíduos envolvidos no estudo foi obtido o consentimento informado para o tratamento dos dados na execução da investigação.

Os resultados obtidos permitem constituir as seguintes conclusões:

Da análise da associação dos haplogrupos mitocondrial com a infertilidade masculina os resultados não apontam diferenças significativas entre a população controlo e caso, reforçando as conclusões alcançadas em estudos antecedentes.

Neste estudo verificou-se que da comparação das populações de indivíduos férteis e inférteis com diferentes populações de referência oriundos da mesma região de Portugal resultam valores contraditórios. Usando a população do Norte de Portugal (González et al.,

2003), apenas surge diferença significativa em relação à população de férteis para o haplogrupo J ( $p=0.039$ ), contrariamente ao observado com a população de referência do Norte de Portugal\* (Pereira et al., 2000), que apresenta diferenças em relação à população de inférteis, para o haplogrupo U ( $p=0.035$ ). Este facto, aqui evidenciado, alude à frágil resolução das filogenias actualmente disponíveis na literatura, causada em parte pela complexa estratificação populacional, passíveis de criar incongruências nos diversos estudos onde são utilizadas. Reflecte-se a urgência de uma actualização das filogenias existentes, quer a nível geral, quer a um nível mais restrito, e execução de novas análises filogenéticas que venham enriquecer e apoiar os diversos estudos caso-controlo em ensaios associativos.

Da análise de uma possível relação entre os subgrupos da linhagem U e a infertilidade masculina não se obteve qualquer resultado estatisticamente significativo ( $p = 0.762$ ) entre as populações caso e controlo em estudo, contrariando resultados previamente atingidos por outros autores onde implicam os diversos sub-haplogrupos do haplogrupo U na mobilidade e viabilidade dos espermatozóides.

Do ponto de vista do cromossoma Y, a análise estatística revelou resultados com significância apenas para o haplogrupo R ( $X^2$  OR = 0.49, 95% CI = 0.27 – 0.93,  $p = 0.027$ ) aquando da comparação de ambas as populações caso e controlo. Os resultados sugerem um possível papel do haplogrupo R na patologia em estudo.

Do exame mais pormenorizado desta sugestão, os resultados revelaram uma prevalência da linhagem R do cromossoma Y associado ao haplogrupo CRS mitocondrial da população de indivíduos férteis, com resultados estatísticos significativos ( $X^2$  OR = 0.22, 95% CI = 0.05 – 0.94,  $p = 0.033$ ). A condição estável deste dois haplogrupos poderá influenciar positivamente a fertilidade quando associados, accionando um efeito protector contra a infertilidade

Outro resultado observado, embora sem significância estatística, foi a leve predominância do haplogrupo I com o padrão 2\*4d no haplogrupo H\* (CRS/H) dos indivíduos inférteis (figura 4.4). Provavelmente por não ser um dos haplogrupos do cromossoma Y mais frequente das populações típicas europeias impediu a obtenção de um resultado mais claro e significativo.

No âmbito do padrão de DAZ, as deleções surgem com maior frequência na população de indivíduos inférteis (54.17%) quando comparada com a população controlo (39.24%), anuindo com estudos anteriormente obtidos e com a teoria da capacidade de certas deleções parciais provocarem falência espermática (Moro et al., 2000; Bienvenu et al., 2001; Ferlin et al., 2002, 2004; Fernandes et al., 2002; De Vries et al., 2002).

Outra realidade observada foi a predominância do haplogrupo R do cromossoma Y na população controlo coadunando com a fracção maioritária do padrão de DAZ sem deleção (com 4d), o contrário sendo verdadeiro para a população dos indivíduos inférteis. Sobrevém destes resultados a existência de uma factível associação entre o haplogrupo R do cromossoma Y e a maior ou menor expressividade do padrão de DAZ com e sem deleção.

Legitimando esta condição surge a diferença estatística ( $X^2$  OR = 0.19, 95% CI = 0.05 – 0.81,  **$p = 0.019$** ) observada da comparação do padrão de DAZ entre as populações caso e controlo para o mesmo haplogrupo mitocondrial (Tabela 4.3). Notou-se uma proeminência do padrão sem deleção (com 4d) no haplogrupo CRS mitocondrial no grupo dos indivíduos férteis, o oposto sendo verdadeiro para a população de indivíduos inférteis, consolidando a suspeita de que a ocorrência destas deleções parciais nos indivíduos beneficia o fenótipo da infertilidade masculina.

Do prosseguimento do estudo demonstrou-se que concomitantemente à predominância do padrão DAZ sem deleção (com 4d) no haplogrupo CRS mitocondrial, sobrevém também, a

superioridade do haplótipo R do cromossoma Y, insinuando ser menos susceptível às deleções na região AZFc. De facto, a população de indivíduos inférteis demonstrou albergar menos indivíduos pertencentes ao haplogrupo R e, conseqüentemente, maior expressão de deleções no cromossoma Y.

Similarmente, mas já sem resultados estatísticos que o comprovem, verificou-se um desviar do padrão frequente das deleções pelos haplogrupos mitocondriais na população de inférteis, surgindo em menor número nos subgrupos J/T e U/K. Em contrapartida, e em concordância com a associação obtida entre o haplogrupo R e a ocorrência de deleções, a frequência de indivíduos R aumenta significativamente. Parece estar aqui envolvido, na população de indivíduos inférteis, um padrão corrente indiciando uma associação entre haplótipo R e a menor ou maior ocorrência de deleções.

Seguindo a mesma abordagem, mas direccionada para a população de indivíduos férteis, este padrão coincidiu com o anteriormente notado havendo uma predominância do padrão sem deleção em conjunto com a maior frequência de indivíduos pertencentes ao haplogrupo R, no entanto, isto reflecte-se por todos os haplogrupos mitocondriais, não surgindo qualquer alteração nos super-haplogrupos J/T e U/K.

Os resultados alcançados neste trabalho de investigação demonstram a complexidade envolvida no mecanismo de promoção e expressão de uma patologia. Da complexa sinergia entre o ADN mitocondrial e a fixação de uma patologia surge um espectro patogénico albergando um conjunto de situações diversas, influenciando a etiologia da mesma. Desde mutações patogénicas únicas com grande expressividade a circunstâncias mais complexas envolvendo mutações com menor expressão, actuam como factores de risco cujo efeito patogénico é influenciado por backgrounds genéticos e/ou factores ambientais e que poderão estar na base da etiologia.

Deste trabalho pode também inferir-se a urgência de uma actualização das filogenias existentes, quer a nível geral, quer a um nível mais restrito, e execução de novas que venham enriquecer e apoiar os diversos estudos caso-controlo em ensaios associativos. A frágil resolução das filogenias, causada em parte pela complexa estratificação populacional, actualmente disponíveis na literatura podem criar incongruências nos diversos estudos onde são utilizadas.

Pode-se, então, concluir que os haplogrupos do ADN mitocondrial dificilmente terão um papel primordial na etiologia genética da infertilidade masculina, todavia, não se pode excluir um possível efeito, benéfico ou prejudicial, através da interacção com variantes genéticas adicionais, como os haplogrupos do cromossoma Y, mutações ao longo da região codificante ou até mecanismos mediados pelo genoma nuclear.

## Referências Bibliográficas

---



## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Achilli, A., Rengo, C., Battaglia, V., Pala, M., Olivieri, A., Fornarino, S., Magri, C., Scozzari, R., Babudri, N., Santachiara-Benerecetti, A. S., Bandelt, H. J., Semino, O. & Torroni, A. (2005). Saami and Berbers: an unexpected Mitochondrial DNA Link. *American Journal of Human Genetics* 76, 883–886.
- Aitken, R. J. & Krausz, C. (2001). Oxidative Stress, DNA Damage and the Y Chromosome. *Reproduction* 122, 497-506.
- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (1994). Energy Conversion: Mitochondria and Chloroplasts. In: Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Watson, J. D. (eds) *Molecular Biology of The Cell*. *Garland Publishing Inc., New York*, pp 653-720.
- Allard, M. W., Miller, K., Wilson, M., Monson, K., & Budowle, B. (2002). Characterization of the Caucasian Haplogroups present in the SWGDAM Forensic mtDNA dataset for 1771 Human Control Region Sequences. Scientific Working Group on DNA Analysis Methods. *Journal of Forensic Sciences* 47, 1215-1223.
- Allard, M., Polansky, D., Miller, K., Wilson, M., Monson, K. & Budowle, B. (2005). Characterization of Human Control Region Sequences of the African American SWGDAM forensic mtDNA data set. *Forensic Science International, Volume 148, Issue 2 - 3*, Pages 169 – 179.
- Allen, J. F. (1996). Separate Sexes and the Mitochondrial Theory of Ageing. *Journal of Theoretical Biology* 180, 135-140.
- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., De Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R. & Young, I. G. (1981). Sequence and Organization of the Human Mitochondrial Genome. *Nature* 290, 457-465.
- Andersson, S. G. et al. (1998). The Genome Sequence of *Rickettsia prowazekii* and the Origin of Mitochondria. *Nature* 396 (6707), 133-140.
- Andersson, S. G. et al. (2003). On the Origin of Mitochondria: a Genomics Perspective. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, 358 (1429), 165-177.
- Andrews, R. M., Kubacka, I., Chinnery, P. F., Lightowlers, R. N., Turnbull, D. M. & Howell, N. (1999). Reanalysis and revision of the Cambridge reference sequence for human mitochondrial DNA. *Nature Genetics* 23,147
- Bailey, J. A., Gu, Z., Clark, R. A. et al. (2002). Recent Segmental Duplications in the Human Genome. *Science* 297, 1003-1007.
- Bandelt, H. J., Kong, Q. P., Parson, W. and Salas, A. (2005a). More Evidence for Non-Maternal Inheritance of Mitochondrial DNA? *Journal of Medical Genetics* 42, 957–960.
- Bandelt, H. J., Achilli, A., Kong, Q. P., Salas, A., Lutz-Bonengel, S., Sun, C., Zhang, Y. P., Torroni, A. & Yao, Y. G. (2005b). Low “Penetrance” of Phylogenetic knowledge in Mitochondrial Disease Studies. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333, 122–130.
- Bandelt, H. J., Salas, A. & Lutz-Bonenge, S. (2004). Artificial Recombination in Forensic mtDNA Population Databases. *International Journal of Legal Medicine* 118, 267–273.
- Bandelt, H. J., Quintana-Murci, L., Salas, A. & Macaulay, V. (2002). The Fingerprint of Phantom Mutations in Mitochondrial DNA Data. *American Journal of Human Genetics* 71, 1150–1160.
- Bandelt, H. J., Lahermo, P., Richards, M. & Macaulay, V. (2001). Detecting Errors in mtDNA Data by Phylogenetic

- Analysis. *International Journal of Legal Medicine* 115, 64–69.
- Bandelt, H. J. *et al.* (2006). Estimation of Mutation Rates and Coalescence Times: Some Caveats. In: Bandelt, H, J., Macaulay, V. & Richards, M. (eds) *Human Mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens*. Springer-Verlag: Berlin, Heidelberg, pp 149-179.
- Bandelt, H. J., Forster, P., Sykes, B. C. & Richards, M. B. (1995). Mitochondrial Portraits of Human Populations using Median Networks. *Genetics* 141, 743-753.
- Bar-Yosef O (2002) The Upper Paleolithic revolution. *Annu Rev Anthropol* 31:363-393.
- Bar-Yosef, O. *et al.* (1986). New Data on the Origin of Modern Man in the Levant. *Current Anthropology* 27, 63-64.
- Behar, D. M., Metspalu, E., Kivisild, T., *et al.* (20 co-authors) (2007). The Matrilineal Ancestry of Ashkenazi Jewry: Portrait of a Recent Founder Event. *American Journal of Human Genetics* 78, 487–497
- Bensasson, D., Feldman, M. W. & Petrov, D. A. (2003). Rates of DNA duplication and Mitochondrial DNA insertion in the Human Genome. *Journal of Molecular Evolution* 57 (3), 343-354.
- Bensasson, D., Zhang, D. X., Hartl, D. L. & Hewitt, G. M. (2001). Mitochondrial Pseudogenes: Evolution's Misplaced Witness. *Trends in Ecology & Evolution* 16, 314–21.
- Berg, O. G. & Kurland, C. G. (2000). Why Mitochondrial Genes are most often found in Nuclei. *Molecular Biology and Evolution* 17 (6), 951-961.
- Bienvu, T., Patrat, C., McElreavey, K., de Almeida, M. & Jouannet, P. (2001). Reduction in the DAZ Gene copy number in two Infertile Men with impaired Spermatogenesis. *Annual Review of Genetics* 44,125–128.
- Birky, C. W. *et al.* (1983). An Approach to Population and Evolutionary Genetic Theory for Genes in Mitochondria and Chloroplast and Some Results. *Genetics* 103, 513-527.
- Bogenhagen, D. F. (1999). Repair of mtDNA in Vertebrates. *American Journal of Human Genetics* 64 (5), 1276-1281.
- Bosch, E. *et al.* (2004). Dynamics of a Human interparalog Gene Conversion Hotspot. *Genome Research* 14 (5), 835-844.
- Bowler, J. M. *et al.* (2003). New Ages for Human Occupation and Climatic change at Lake Mungo, Australia. *Nature* 421 (6925), 837-84.
- Brandstatter, A., Niederstatter, H., & Parson, W. (2004). Monitoring the Inheritance of Heteroplasmy by Computer assisted detection of Mixed basecalls in the entire Human Mitochondrial DNA Control Region. *International Journal of Legal Medicine* 118 (1), 47- 54.
- Brandstatter, A., Parsons, T. J. & Parson, W. (2003). Rapid Screening of mtDNA Coding Region SNPs for the Identification of West European Caucasian Haplogroups. *International Journal of Legal Medicine* 117, 291–298.
- Brown, M. D., Voljavec, A. S., Lott, M. T., Torroni, A., Yang, C. C. & Wallace, D. C. (1992). Mitochondrial DNA Complex I and III Mutations Associated with a Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Genetics* 130, 163-173.
- Calafell, F. *et al.* (1998). Short Tandem Repeat Polymorphism Evolution in Humans. *European Journal of Human Genetics* 6 (1), 38-49.
- Cardon & Bell (2001). Association Study Designs for Complex Diseases. *Nature Reviews Genetics*, volume 2, 91-99.
- Cardon, L. R. & Watkins, H. (2000). Waiting for the Working Draft from the Human Genome Project: A huge Achievement, but not of Immediate Medical use. *British Medical Journal* 320, 1221–1222.

- Carra, E., Sangiorgi, D., Gattucio, F. & Rinaldi, A. M. (2004). Male Infertility and Mitochondrial DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 322, 333-339.
- Carrieri, G. et al. (2001). Mitochondrial DNA Haplogroups and APOE4 allele are non-independent Variables in Sporadic Alzheimer's Disease. *Human Genetics* 108, 194–198.
- Carvalho, C. M., Fujisawa, M., Shirakawa, T. et al. (2003). Lack of Association between Y Chromosome Haplogroups and Male Infertility in Japanese Men. *American Journal of Medical Genetics* 116, 152-158.
- Chan, D.C., 2006. Mitochondria: Dynamic Organelles in Disease, Aging, and Development. *Cell* 125(7),1241-1252.
- Chaubey, G. et al. (2007). Peopling of South Asia: Investigating the caste-tribe continuum in India. *Bioessays* 29 (1), 91-100.
- Chen, Y. S., Olckers, A., Schurr, T. G., Kogelnik, A. M., Huoponen, K. & Wallace, D. C. (2000). MtDNA Variation in the South African Kung and Khwe—and their Genetic Relationships to other African Populations. *American Journal of Human Genetics* 66,1362–1383
- Chen, Y. S., Torroni, A., Excoffier, L., Santachiara-Benere-Cetti, L. S. & Wallace, D. C. (1995b). Analysis of mtDNA Variation in African Populations Reveals the Most Ancient of All Human Continent-Specific Haplogroups. *American Journal of Human Genetics* 57, 133-149.
- Chen, X. et al. (1995a). Rearranged Mitochondrial Genomes are present in Human Oocytes. *American Journal of Human Genetics* 57 (2), 239- 247.
- Chinnery, P. F., (2006). Mitochondrial DNA in Homo sapiens. In: Bandelt, H. J., Macaulay, V. & Richards, M. (eds). Human Mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens. *Springer*: pp 3-15.
- Chinnery, P. F., Howell, N., Lightowers, R. N. & Turnbull, D. M. (1998). MELAS and MERRF. The Relationship between Maternal Mutation Load and the Frequency of Clinically Affected Offspring. *Brain* 121, 1889–94.
- Clark, K. M., Taylor, R. W., Johnson, M. A., Chinnery, P. F., Chrzanowska-Lightowers, Z. M., Andrews, R. M. et al. (1999). An MtDNA Mutation in the Initiation Codon of the Cytochrome C Oxidase Subunit II Gene Results in Lower Levels of the Protein and a Mitochondrial Encephalomyopathy. *American Journal of Human Genetics* 64, 1330-1339.
- Clayton, D. A., Doda, J. N. & Friedberg, E. C. (1974). The absence of a Pyrimidine Dimmer Repair Mechanism in Mammalian Mitochondria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 71, 2777-2781.
- Coble, M. D., Just, R. S., O'Callaghan, J. E., Letmanyi, I. H., Peterson, C. T., Irwin, J. A. & Parsons, T. J. (2004). Single Nucleotide Polymorphisms over the entire mtDNA Genome that Increase the power of Forensic testing in Caucasians. *International Journal of Legal Medicine* 118, 137–146.
- Cock, H. R., Cooper, J. & Schapira, A. (1995) Nuclear complementation in Leber's Hereditary Optic Neuropathy. *Neurology* 45, 294.
- Comas, D., Calafell, F., Mateu, E., Perez-Lezaun, A., Bosch, E. & Bertranpetit, (1997). Mitochondrial DNA variation and the Origin of the Europeans. *Human Genetics* 99, 443-449.
- Cooke, H. J., Brown, W. R., & Rappold, G. A. (1985). Hypervariable Telomeric Sequences from the Human Sex Chromosomes are Pseudoautosomal. *Nature* 317 (6039), 687-692.
- Coskun, P. E., Ruiz-Pesini, E. & Wallace, D. C. (2003). Control Region mtDNA Variants: Longevity, Climatic Adaptation, and a Forensic Conundrum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 2174–2176.
- Cummings, J. M., Jequier, A. M., Martin, R., Mehmet, D. & Goldblatt, J. (1998a). Semen Levels of Mitochondrial DNA Deletions in Men Attending an Infertility Clinic do not Correlate with Phenotype. *International Journal of Andrology* 21, 47-52.

- De Benedictis, G., Rose, G., Carrier, G., De Luca, M., Falcone, E., Passarino, G., Bonafe, M., Monti, D., Baggio, G., Bertolini, S., Mari, D., Mattace, R. & Franceschi, C. (1999). Mitochondrial DNA Inherited Variants are Associated with Successful Aging and Longevity in Humans. *Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology* 13, 1532–1536.
- de Llanos, L. M., Balleca, J., Gazquez, C., Margarit, E. & Oliva, R. (2005). High Frequency of gr/gr Chromosome Y Deletions in Consecutive Oligospermic ICSI Candidates. *Human Reproduction* 20, 216–220.
- de Vries J. W., Repping, S., van Daalen, S. K., Korver, C. M., Leschot, N. J. & van der Veen, F. (2002). Clinical Relevance of Partial AZFc Deletions. *Fertility and Sterility* 78, 1209–1214.
- Díez-Sánchez, C., Ruiz-Pesini, E., Lapenã, A. C., Montoya, J., Pérez-Martos, A., Enríquez, J. A. & López-Pérez, M. J. (2003). Mitochondrial DNA Content of Human Spermatozoa. *Biology of reproduction* 68, 180–185.
- DiMauro, S. & Bonilla, E. (1997). Mitochondrial Encephalomyopathies. In: Rosenberg, R. N., Prusiner, S. B., DiMauro, S., Barchi, R. L. (eds) *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease. Butterworth-Heinemann, Boston*, pp 201-235.
- DiMauro, S. (2004). Mitochondrial Diseases. *Biochimica et Biophysica Acta* 1658, 80– 88.
- Ellsworth, D. L. & Manolio, T. A. (1999). The Emerging importance of Genetics in Epidemiologic Research II: issues in Study Design and Gene Mapping. *Annals of epidemiology* 9, 75–90.
- Elson, J. L. et al. (2001). Analysis of European mtDNAs for Recombination. *American Journal of Human Genetics*. 68, 145-153.
- Ferlin, A., Moro, E., Rossi, A., Dallapiccola, B. & Foresta, C. (2003). The Human Y Chromosome's Azoospermia Factor b (AZFb) Region: Sequence, Structure and Deletion Analysis in Infertile Men. *Journal of Medical Genetics* 40, 18-24.
- Ferlin, A., Tessari, A., Ganz, F. et al. (2005). Association of Partial AZFc Region Deletions with Spermatogenic Impairment and Male Infertility. *Journal of Medical Genetics* 42, 209-213.
- Ferlin, A., Moro, E., Rossi, A. & Foresta, C. (2002). A Novel Approach for the Analysis of DAZ gene Copy Number in severely Idiopathic Infertile Men. *Journal of Endocrinological Investigation* 25, RC1–RC3.
- Ferlin, A., Bartoloni, L., Rizzo, G., Roverato, A., Garolla, A. & Foresta, C. (2004). Androgen Receptor Gene CAG and GGC repeat lengths in Idiopathic Male Infertility. *Molecular Human Reproduction* 10, 417–21.
- Fernandes, S., Huellen, K., Gonçalves, J., Dukal, H., Zeisler, J., Raspert De Meyts, E. et al. (2002). High Frequency of DAZ1/DAZ2 Gene Deletions in Patients with Severe Oligozoospermia. *Molecular Human Reproduction* 8, 286-298.
- Fernandes, S., Paracchini, S., Meyer, L. H., Floridia, G., Tyler-Smith, C. & Vogt, P. H. (2004). A Large AZFc Deletion removes DAZ3/DAZ4 and Nearby Genes from Men in Y Haplogroup N. *American Journal of Human Genetics* 74, 180-187.
- Fernandes, A. T., Fernandes, S., Gonçalves, R., Sá, R., Costa, P., Rosa, A., Ferrás, C., Sousa, M., Brehm, A. & Barros, A. (2006). DAZ gene copies: Evidence of Y chromosome Evolution. *Molecular Human Reproduction* 12, 519-523.
- Ferrás, C., Fernandes, S., Marques, C. J., Carvalho, F., Alves, C., Silva, J., Sousa, M. & Barros, A. (2004). AZF and DAZ Gene copy-specific Deletion Analysis in Maturation Arrest and Sertoli cell-only Syndrome. *Molecular Human Reproduction* 10, 755–761.
- Finnila, S. (2000). *Phylogenetic Analysis of Mitochondrial DAN: Detection of Mutations in Patients with Occipital Stroke*. Tese de Doutoramento inédita. University of Oulu, Faculty of Medicine.

- Finnila, S., Lehtonen, M.S., & Majamaa, K. (2001). Phylogenetic Network for European mtDNA. *American Journal of Human Genetics* 68, 1475-1484.
- Folgero, T., Bertheussen, K., Lindal, S., Torbergesen, T. & Oian, P. (1993). Mitochondrial Disease and Reduced Sperm Motility. *Human Reproduction* 8, 1863–1868.
- Foresta, C., Moro, E. & Ferlin, A. (2001). Prognostic Value of Deletion Analysis. *The Role of Current Methods in Human Reproduction* 16, 1543-1547.
- Forster, P. *et al.* (2001). Phylogenetic Star Contraction applied to Asian and Papuan mtDNA Evolution. *Molecular Biology and Evolution* 18 (10), 1864-1881.
- Forster, P. *et al.* (1996). Origin and Evolution of Native American mtDNA Variation: a reappraisal. *American Journal of Human Genetics* 59 (4), 935-945.
- Fowler, J., Cohen, L. & Jarvis, P. (1998). Practical Statistics for Field Biology. *Publication manual* (2<sup>ed</sup>)
- Frank, S. A. & Hurst, L. D. (1996). Mitochondria and Male Disease. *Nature* 383, 224.
- Freije, D. *et al.* (1992). Identification of a second Pseudoautosomal Region near the Xq and Yq Telomeres. *Science* 258 (5089), 1784-1787.
- Friedlaender, J. *et al.* (2005). Expanding Southwest Pacific Mitochondrial Haplogroups P and Q. *Molecular Biology and Evolution* 22 (6), 1506-1517.
- Friedlaender, J. *et al.* (2007). Melanesian mtDNA Complexity. *Public Library of Science* 2, e248.
- Fryer, A., Appleton, R., Sweeney, M. G., Rosenbloom, L. & Harding, A. E. (1994). Mitochondrial DNA 8993 (NARP) Mutation Presenting With a Heterogeneous Phenotype Including “Cerebral Paralysis”. *Archives of the Disabled Child* 71, 419-422.
- Fukunaga, M. & Yielding, K. (1979). Fate during Cell Growth of Yeast Mitochondrial and Nuclear DNA after Photolytic Attachment of the Monoazide Analog of Ethidium Bromide. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 90, 582-586.
- Giachini, C., Guarducci, E., Longepied, G., Degl’Innocenti, S., Becherini, L., Forti, G., Mitchell, M. J. & Krausz, C. (2005). The gr/gr Deletion(s): A New Genetic Test in Male Infertility? *Journal of Medical Genetics Epub doi: 10, 1136.*
- Gibson, B. W. (2005). The Human Mitochondrial Proteome: Oxidative Stress, Protein Modifications and Oxidative Phosphorylation. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*. 37, 927–934.
- Giles, R. E., Blanc, H., Cann, H. M., & Wallace, D. C. (1980). Maternal Inheritance of Human Mitochondrial DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 77, 6715-6719.
- Gill, P. *et al.* (2001). DNA Commission of the International Society of Forensic Genetics: recommendations on Forensic Analysis using Y-chromosome STRs. *Forensic Science International* 124 (1), 5-10.
- Gonçalves, R., Freitas, A., Branco, M., Rosa, R., Fernandes, A. T., Zhivotovsky, L., Underhill, P. A., Kivisild, T. & Brehm, A. (2005). Y-chromosome Lineages from Portugal, Madeira and Açores Record Elements of Sephardim and Berber Ancestry. *Annals of Human Genetics* 69 (4), 443–454
- González, A. M., Brehm, A., Pérez, J. A., Maca-Meyer, N., Flores, C. & Cabrera, V. M. (2003). Mitochondrial DNA Affinities at the Atlantic Fringe of Europe. *American Journal of Physical Anthropology* 120, 391–404.
- Graves, J. A. (2006). Sex Chromosome Specialization and Degeneration in Mammals. *Cell* 124, 901-914.
- Graves, J. A. (2004). The Degenerate Y Chromosome—can conversion save it? *Reproduction, Fertility and Development*. 16, 527—534.

- Hammer, M. F. & Horai, S. (1995). Y Chromosomal DNA Variation and the Peopling of Japan. *American Journal of Human Genetics* 56 (4), 951-962.
- Hammer, M.F., & Zegura, S.L. (1996). The Role of the Y chromosome in Human Evolutionary Studies. *Evolutionary Anthropology* 5, 116-134.
- Hammer, M. F., & Zegura, S. L. (2002). The Human Y Chromosome Haplogroup Tree: Nomenclature and Phylogeny of its major Divisions. *Annual Review of Anthropology* 3, 303-321.
- Hammer, M. F. (1995). A Recent Common Ancestry for Human Y Chromosomes. *Nature* 378, 376-378.
- Hammer, M. F, *et al.* (2001). Hierarchical Patterns of Global Human Y-chromosome Diversity. *Molecular Biology and Evolution* 18 (7), 1189- 1203.
- Hammer, M. F, *et al.* (1998). Out of Africa and Back Again: Nested Cladistic Analysis of Human Y chromosome Variation. *Molecular Biology and Evolution* 15 (4), 427-441.
- Hasegawa, M., Cao, Y., & Yang, Z. (1998). Preponderance of slightly deleterious Polymorphism in Mitochondrial DNA: Nonsynonymous/Synonymous Rate Ratio is much higher within Species than between Species. *Molecular Biology and Evolution* 15 (11),1499-1505.
- Hazkani-Covo, E. & Graur, D. (2007). A Comparative Analysis of Numt Evolution in Human and Chimpanzee. *Molecular Biology and Evolution* 24 (1), 13-18.
- Hedrick, P. W. (1970). Selection in Finite populations. I. The Probability of Fixation and Rate of Response Using Transition Matrix Iteration. *Genetics* 65, 157-173.
- Herrnstadt, C. & Howell, N. (2004). An Evolutionary Perspective on Pathogenic mtDNA Mutations: Haplogroup Associations of Clinical Disorders. *Mitochondrion* 4, 791–798.
- Herrnstadt, C., Elson, J. L., Fahy, E., Preston, G., Turnbull, D. M., Anderson, C., Ghosh, S. S., Olefsky, J. M., Beal, M. F., Davis, R. E., & Howell, N. (2002). Reduced-median-network Analysis of Complete Mitochondrial DNA Coding- Region Sequences for the major African, Asian, and European Haplogroups. *American Journal of Human Genetics* 70, 1152-1171.
- Hofhans, G. & Attardi, G. (1993). Lack of Assembly of the Mitochondrial DNA-Encoded Subunits of the Respiratory NADH Dehydrogenase and Loss of Enzyme Activity in Human Cell Mutant Lacking the Mitochondrial ND4 Gene Product. *EMBO Journal*. 12, 3040-3048.
- Hofmann, S., Jaksch M., Bezold, R., Mertens, S., Aholt, S., Paprotta, A. & Gerbitz, K. D. (1997). Population Genetics and Disease Susceptibility: Characterization of Central European Haplogroups by mtDNA Gene Mutations, correlation with D loop Variants and association with Disease. *Human Molecular Genetics* 6, 1835-1846.
- Holm, S. (1979). A Simple Sequentially Rejective Multiple Test Procedure. *Scandinavian Journal of Statistics* 6, 65-70.
- Holoyoake, A. J., McHugh, P., Wu, M., O'Carroll, S., Benny, P., Sin, I. L. & Sin, F. Y. (2001). High Incidence of Single Nucleotide Substitutions in the Mitochondrial Genome is Associated with Poor Semen Parameters in Men. *International Journal of Andrology* 24, 175-182.
- Holoyoake, A. J., Sin, I. L., Benny, P. & Sin, F. Y. (1999). Association of a Novel Human mtDNA ATPase 6 Mutation with Immature Sperm Cells. *Andrologia* 31, 339-345.
- Holt, I. J., Harding, A. E. & Morgan-Hughes, J. A. (1988). Deletions of Muscle Mitochondrial DNA in Patients with Mitochondrial Myopathies. *Nature* 331, 717–19.
- Hopkin, K. (1999). Death to Sperm Mitochondria. *Scientific American* 280 (3), 21.
- Howell, N., Herrnstadt, C., Shults, C. & Mackey, D. A. (2003). Low Penetrance of the 14484 LHON Mutation when

it arises in a Nonhaplogroup J mtDNA Background. *American Journal of Medical Genetics 119A*, 147–151.

Howell, N., Kubacka, I., Halvorson, S., Howell, B., McCullough, D. A. & Mackey, D. (1995). Phylogenetic Analysis of the Mitochondrial Genomes from Leber hereditary optic neuropathy pedigrees. *Genetics 140*, 285-302.

Hucklenbroich, K., Gromoll, J., Heinrich, M., Hohoff, C., Nieschlag, E. & Simoni, M. (2005). Partial Deletions in the AZFc Region of the Y Chromosome occur in Men with Impaired as well as Normal Spermatogenesis. *Human Reproduction 20*, 191–197.

Hudjashov, G. *et al.* (2007). Revealing the Prehistoric Settlement of Australia by Y chromosome and mtDNA Analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 104 (21)*, 8726-8730.

Hudson, G., Keers, S., Man, P.Y., Griffiths, P., Huoponen, K., Savontaus, M.L., Nikoskelainen, E., Zeviani, M., Carrara, F., Horvath, R., *et al.*, 2005. Identification of an X-chromosomal locus and Haplotype modulating the Phenotype of a Mitochondrial DNA Disorder. *American Journal of Human Genetics, 77(6)*, 1086-1091.

Ingman, M. *et al.* (2000). Mitochondrial Genome Variation and the Origin of Modern Humans. *Nature 408*, 708-713.

Ingman, M. & Gyllensten, U. (2001). Analysis of the Complete Human mtDNA Genome: Methodology and Inferences for Human Evolution. *The Journal of heredity 92 (6)*, 454-461.

Ingman, M. & Gyllensten, U. (2003). Mitochondrial Genome Variation and Evolutionary History of Australian and New Guinean Aborigines. *Genome Research 13*, 1600–1606.

Jennions, M. D. & Moller, A. P. (2003). A Survey of the Statistical Power of Research in Behavioral Ecology and Animal Behavior. *Behavior Ecology 14*, 438-445.

Jobling, M. A. & Tyler-Smith, C. (2003). The Human Y Chromosome: an Evolutionary Marker comes of Age. *Nature Reviews of Genetics 4*, 598–612.

Jorde, L. B. & Bamshad, M. (2000). Questioning Evidence for Recombination in Human Mitochondrial DNA. *Science 288*, 1931-1932.

Kao, S. H., Chao, H. T. & Wei, Y. H. (1995). Mitochondrial Deoxyribonucleic Acid 4977bp Deletion is Associated with Diminished Fertility and Motility of Human Sperm. *Biology of Reproduction 52*, 729-736.

Kao, S. H., Chao, H. T. & Wei, Y. H. (1998). Multiple Deletions of Mitochondrial DNA are Associated with the Decline of Motility and Fertility of Human Spermatozoa. *Molecular Human Reproduction 4*, 657-666.

Karafet, T. M., Mendez, F. L., Meilerman, M. B., Underhill, P. A., Zegura, S. L. & Hammer, M. F. (2008). New Binary Polymorphisms Reshape and Increase Resolution of Human Y Chromosomal Haplogroup Tree. *Genome Research 18*, 830-838.

Karlberg, O. *et al.* (2000). The Dual Origin of the Yeast Mitochondrial Proteome. *Yeast 17 (3)*, 170-187.

Kayser, M., Brauer, S., Willuweit, S., Schadlich, H., Batzer, M. A., Zawacki, J., Prinz, M., Roewer, L. & Stoneking, M. (2002). Online Y-chromosomal Short Tandem Repeat Haplotype Reference Database (YHRD) for U.S. Populations. *The Journal of Forensic Sciences 47*, 513–519.

Ke, Y. *et al.* (2001). African Origin of Modern Humans in East Asia: a tale of 12,000 Y chromosomes. *Science 292 (5519)*, 1151-1153.

Kivisild, T. *et al.* (1999a). Deep Common Ancestry of Indian and western-Eurasian Mitochondrial DNA Lineages. *Current Biology 9 (22)*, 1331-1334.

Kivisild, T. *et al.* (1999b). The Place of the Indian Mitochondrial DNA Variants in the Global Network of Maternal Lineages and the Peopling of the Old World. In: Papiha, S. S., Deka, R., Chakraborty, R. (eds) *Genomic*

diversity. *Kluwer Academic/Plenum Publishers*, pp 135-152.

Kivisild, T. & Villems, R. (2000). Questioning Evidence for Recombination in Human Mitochondrial DNA. *Science* 288, 1931.

Kivisild, T., Tolk, H. V., Parik, J., Wang, Y., Papiha, S. S., Bandelt, H. J. & Villems, R. (2002). The Emerging Limbs and Twigs of the East Asian mtDNA Tree. *Molecular Biology and Evolution* 19, 1737–1751.

Kivisild, T. *et al.* (2003). The genetic heritage of the earliest settlers persists both in Indian tribal and caste populations. *American Journal of Human Genetics* 72, 313-332.

Kivisild, T., Reidla, M., Metspalu, E., Rosa, A., Brehm, A., Pennarun, E., Parik, J., Geberhiwot, T., Usanga, E., Villems, R. (2004). Ethiopian Mitochondrial DNA Heritage: Tracking Gene Flow across and around the Gate of Tears. *American Journal of Human Genetics* 75 (5), 752-770

Kivisild, T. *et al.* (2006) The Role of Selection in the Evolution of Human Mitochondrial Genomes. *Genetics* 172 (1), 373- 387.

Kobayashi, Y., Momoi, M. Y., Tominaga, K., Momoi, T., Nihei, K., Yanagisawa, M., Kagawa, Y. & Ohta, S. (1990). A Point Mutation in the Mitochondrial tRNA (Leu) (UUR) Gene in MELAS (Mitochondrial Miopatia, Encephalopathy, Lactic Acidosis and Stroke-Like Episodes). *Biochemical and Biophysical Research Communications* 173, 816-822.

Kong, Q. P. *et al.* (2003). Phylogeny of East Asian Mitochondrial DNA Lineages Inferred from Complete Sequences. *American Journal of Human Genetics* 73 (3), 671-676.

Kong, Q. P., Bandelt, H. J., Sun, C., Yao, Y. G., Salas, A., Achilli, A., Wang, C. Y., Zhong, L., Zhu, C. L., Wu, S. F., Torroni, A. & Zhang, Y. P. (2006). Updating the East Asian mtDNA Phylogeny: a Prerequisite for the Identification of Pathogenic Mutations. *Human Molecular Genetics* 15, 2076–2086.

Krausz, C., Bussani-Mastellone, C., Granchi, S., McElreavey, K., Scarselli, G. & Forti, G. (1999). Screening for Microdeletions of Y Chromosome Genes in Patients undergoing Intracytoplasmic Sperm Injection. *Human Reproduction* 14, 1717–1721.

Krausz, C., Quintana-Murci, L., Rajpert-De Meyts, E., Jorgensen, N., Jobling, M. A., Rosser, Z. H., Skakkebaek, N. E. & McElreavey, K. (2001). Identification of a Y Chromosome Haplogroup Associated with Reduced Sperm Counts. *Human Molecular Genetics* 10, 1873–1877.

Kumar, S. *et al.* (2000). Questioning Evidence for Recombination in Human Mitochondrial DNA. *Science* 288, 1932-1933.

Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Brown, L. G., *et al.* (2001). The AZFc Region of the Y Chromosome Features Massive Palindromes and Uniform Recurrent Deletions in Infertile Men. *Nature Genetics* 29, 279-286.

Kuroki, Y., Iwamoto, T., Lee, J. *et al.* (1999). Spermatogenic Ability is Different among Males in Different Y Chromosome Lineage. *Journal of Human Genetics* 44, 289-292.

Lahn, B. T. & Page, D. C. (1999). Four Evolutionary Strata on the Human X Chromosome. *Science*, 286, 964-967.

Lahn, B. T., Pearson, N. M. & Jegalian, K. (2001). The Human Y chromosome, in the light of Evolution. *Nature Reviews Genetics* 2 (3), 207-216.

Lahr, M. M. & Foley, R. A. (1994). Multiple Dispersals and Modern Human Origins. *Evolutionary Anthropology* 3, 48-60.

Leonard, J. V. & Schapira, A. H. V. (2000). Mitochondrial Respiratory Chain Disorders I: Mitochondrial DNA Defects. *Lancet* 355, 299–304.

Li, W. (1997). *Molecular Evolution. Sinauer Associates, Inc.: Sunderland.*

Li, L. & Hamer, D. H. (1995). Recombination and Allelic Association in the Xq/Xq Homology Region. *Human*

*Molecular Genetics* 4 (11), 2013-2016.

Liang, M.H., Wong, L.J. (1998). Yield of mtDNA Mutation Analysis in 2000 Patients. *American Journal of Medical Genetics* 77(5), 395-400.

Lien, S. *et al.* (2000). Evidence for Heterogeneity in Recombination in the Human Pseudoautosomal Region: High Resolution Analysis by Sperm Typing and Radiation-hybrid Mapping. *American Journal of Human Genetics* 66 (2), 557-566.

Lin, Y. W., Thi, D. A. D., Kuo, P. L., Hsu, C. C., Huang, B. D., Yu, Y. H., Vogt, P. H., Krause, W., Ferlin, A., Foresta, C. *et al.* (2005). Polymorphisms Associated with the DAZ Genes on the Human Y Chromosome. *Genomics* 86 ,431–438.

Luoma, P., Melberg, A., Rinne, J.O., Kaukonen, J.A., Nuoponen, N.N., Chalmers, R.M., Oldfors, A., Rautakorpi, I., Peltonen, L., Majamaa, K., *et al.*, (2004). Parkinsonism, premature menopause, and Mitochondrial DNA Polymerase gamma Mutations: Clinical and Molecular Genetic Study. *Lancet* 364(9437), 875-882.

Lynch, M. & Blanchard, J. L. (1998). Deleterious Mutations Accumulation in Organelle Genomes. *Genetics* 103, 29-39.

Macaulay, V., Richards, M., Hickey, E., Vega, E., Cruciani, F., Guida, V., Scozzari, R., Bonne-Tamir, B., Sykes, B. & Torroni, A. (1999). The emergencing Tree of West Eurasian mtDNAs: a Synthesis of Control Region Sequences and RFLPs. *American Journal of Human Genetics* 64, 232-249.

Macaulay, V.A. *et al.* (1997). mtDNA Mutation Rates--no need to panic. *American Journal of Human Genetics* 61 (4), 983-990.

Macaulay, V. A. *et al.* (2005). Single, rapid Coastal Settlement of Asia revealed by Analysis of Complete Mitochondrial Genomes. *Science* 308 (5724), 1034-1036.

Machev, N., Saut, N., Longepied, G., Terriou, P., Navarro, A., Levy, N., Guichaoua, M., Metzler-Guillemain, C., Collignon, P., Frances, A. M. *et al.* (2004). Sequence Family Variant Loss from the AZFc interval of the Human Y chromosome, but not Gene Copy Loss, is Strongly Associated with Male Infertility. *Journal of Medical Genetics* 41, 814–825.

MacLeod, J. (1943). The Role of Oxygen in the Metabolism and Motility of Human Spermatozoa. *American Journal of Physiology* 138, 512-518.

Mancuso, M., Filosto, M., Bellan, M., *et al.* (2004). POLG Mutations causing Ophthalmoplegia, Sensorimotor Polyneuropathy, Ataxia, and Deafness. *Neurology* 62, 316 18.

Margullis, L. (1975). Symbiotic Theory of the Origin of Eukaryotic Organelles; Criteria for Proof. *Symp Soc Exp Biol* 29, 21-38.

Mathias, N., Bayes, M., & Tyler-Smith, C. (1994). Highly Informative Compound Haplotypes for the Human Y chromosome. *Human Molecular Genetics* 3 (1), 115-123.

Melov, S., Shoffner, J. M., Kaufman, A. & Wallace, D. C. (1995). Marked Increase in the Number and Variety of Mitochondrial DNA Rearrangements in Aging Human Skeletal Muscle. *Nucleic Acids Research* 23, 4122-4126.

Merriwether, D. A., Clark, A. G., Ballinger, S. W., Schurr, T. G., Soodyall, H., Jenkins, T., Sherry, S. T., *et al.* (1991). The Structure of Human Mitochondrial DNA Variation. *Journal of Molecular Evolution* 33, 543–555.

Merriwether, D. A. *et al.* (2005). Ancient Mitochondrial M Haplogroups Identified in the Southwest Pacific. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (37), 13034-13039.

Metspalu, M. *et al.* (2004). Most of the Extant mtDNA Boundaries in South and Southwest Asia were likely shaped during the Initial Settlement of Eurasia by Anatomically Modern Humans. *BMC Genetics* 5 (1), 26.

Metspalu, M., Kivisild, T., Bandelt, H. J., Richards, M. & Villems, R. (2006). The Pioneer Settlement of Modern

- Humans in Asia. In: Bandelt, H. J., Macaulay, V., Richards, M. (eds) Human Mitochondrial DNA and the Evolution of Homo sapiens. *Springer-Verlag: Berlin Heidelberg*.
- Meyer, S., Weiss, G., & von Haeseler, A. (1999). Pattern of Nucleotide Substitution and Rate Heterogeneity in the Hypervariable Regions I and II of Human mtDNA. *Genetics* 152, 1103-1110.
- Michaels, G.S., Hauswirth, W.W., & Laipis, P.J. (1982). Mitochondrial DNA Copy Number in Bovine Oocytes and Somatic Cells. *Developmental Biology (Orlando)* 94, 246-251.
- Miller, R. G. (1981). *Simultaneous Statistical Inference*. McGraw Hill.
- Miller, S.A., Dykes, D.D. & Polesky, H.F., 1988. A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res.* 16, 1215.
- Mishmar, D. *et al.* (2004). Mitochondrial DNA-like Sequences in the Nucleus (NUMTs): Insights into our African Origins and the Mechanism of Foreign DNA Integration. *Human gene mutation database* 23 (2), 125-133.
- Mishmar, D., Ruiz-Pesini, E., Golik, P., Macaulay, V., Clark, A.G., Hosseini, S., Brandon, M., Easley, K., Chen, E., Brown, M.D., Sukernik, R.I., Olckers, A., and Wallace, D.C. (2003) Natural Selection Shaped Regional mtDNA Variation in Humans. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100, 171-176.
- Mitchell, A. L., Elson, J. L., Howell, N., Taylor, R. W. & Turnbull, D. M. (2006). Genes: Mutation or Polymorphism? Sequence Variation in Mitochondrial Complex I. *Journal of Medical Genetics* 43, 175–9.
- Mitchell, P. (1976). Vectorial Chemistry and the Molecular Mechanics of Chemiosmotic Coupling: Power Transmission by Proticity. *Biochemical Society Transactions* 4, 399–430.
- MITOMAP: A Human Mitochondrial Genome Database, 2005. <http://www.mitomap.org/>.
- Montiel-Sosa, F., Ruiz-Pesini, E., Enriquez, J. A., Marcuello, A., Diez- Sanchez, C., Montoya, J., Wallace, D. C. & Lopez-Perez, M. J. (2006). Differences of Sperm Motility in Mitochondrial DNA Haplogroup U Sublineages. *Gene* 368, 21–27.
- Moran, M. D. (2003). Arguments for Rejecting the Sequential Bonferroni in Ecological Studies. *Oikos* 100, 403-405.
- Moro, E., Ferlin, A., Yen, P. H., Franchi, P. G., Palka, G. & Foresta, C. (2000). Male Infertility caused by a de novo Partial Deletion of the DAZ cluster on the Y chromosome. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 85, 4069–4073.
- Nakada, K., Sato, A. Yoshida, K., Morita, T., Tanaka, H., Inoue, S-I., Yoonekawa, H. & Hayashi, J-I. (2006). Mitochondria-Related Male Infertility. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 103, n° 41.
- Nakagawa, S. (2004). A Farewell to Bonferroni: the Problems of Low Statistical Power and Publication Bias. *Behavioral Ecology* 15, 1044-1045.
- Niemi, A. K., Hervonen, A., Hurme, M., Karhunen, P. J., Jylha, M. & Majamaa, K. (2003). Mitochondrial DNA Polymorphisms associated with Longevity in a Finnish Population. *Human Genetics* 112, 29-33.
- Oates, R. D., Silber, S., Brown, L. G. & Page, D. C. (2002). Clinical Characterization of 42 Oligospermic and Azoospermic Men with Microdeletions of the AZFc Region of the Y Chromosome and of 18 Children Conceived Via ICSI. *Human Reproduction* 17, 2813-2824.
- Olivo, P.D., Van De Walle, M.J., Laipis, P.J. *et al.* (1983). Nucleotide Sequence Evidence for rapid Genotypic Shifts in the Bovine Mitochondrial DNA D-loop. *Nature* 306, 400-402.
- Olson, L. E. & Yoder, A. D. (2002). Using Secondary Structure to Identify Ribosomal numts: Cautionary Examples from the Human Genome. *Molecular Biology and Evolution* 19 (1), 93-100.
- Ozawa, T. (1995). Mechanism of Somatic Mitochondrial DNA Mutations Associated with Age and Diseases.

*Biochimica et Biophysica Acta* 1271, 177-189.

Ozawa, T. (1997). Genetics and Functional Changes in Mitochondria Associated with Aging. *Physiological Reviews* 77, 425-456.

Palanichamy, M. G. *et al.* (2004). Phylogeny of Mitochondrial DNA Macrohaplogroup N in India, based on Complete Sequencing: Implications for the Peopling of South Asia. *American Journal of Human Genetics* 75 (6), 966-978.

Pakendorf, B. & Stoneking, M. (2005). Mitochondrial DNA and Human Evolution. *Annual review of genomics and human genetics* 6, 165-83.

Paracchini, S., Stuppia, L., Gatta, V. *et al.* (2000). Y chromosome DNA Haplotypes in Infertile European Males Carrying Y-microdeletions. *Journal of Endocrinological Investigation* 23, 671-676.

Parsons, T. J. & Irwin, J. A. (2000). Questioning Evidence for Recombination in Human Mitochondrial DNA. *Science* 288 (5473), 1931.

Passarino, G., Semino, O., Quintana-Murci, L., Excoffier, L., Hammer, M. & Santachiara-Benerecetti, A. S. (1998), Different Genetic Components in the Ethiopian Population, Identified by mtDNA and Ychromosome Polymorphisms. *American Journal of Human Genetics* 62, 420-434.

Pereira, L., Goncalves, J., Goios, A., Rocha, T. & Amorim, A. (2005). Human mtDNA Haplogroups and Reduced Male Fertility: Real Association or Hidden Population Substructuring. *International Journal of Andrology* 28, 241-247.

Pereira, L., Gonçaalves, J., Franco-Duarte, R., Silva, J., Rocha, T., Arnold, C., Richards, M. & Macaulay, V. (2007). No Evidence for an mtDNA Role in Sperm Motility: Data from Complete Sequencing of Asthenozoospermic Males. *Molecular Biology and Evolution* 24(3), 868-874.

Pereira, L., Gonçalves, J. & Bandelt, H. J. (2008). Mutation C11994T in the Mitochondrial ND4 Gene is not a cause of Low Sperm Motility in Portugal. *Fertility and Sterility* 89, 738-41.

Pereira, L., Prata, M. J. & Amorim, A. (2000). Diversity of mtDNA Lineages in Portugal: Not a Genetic edge of European Variation. *The Annals of Human Genetics* 64, 491-506.

Perneger, T. V. (1998). What's Wrong with Bonferroni Adjustments. *British Medical Journal* 316, 1236-1238.

Pesole, G. *et al.* (1999). Nucleotide Substitution Rate of Mammalian Mitochondrial Genomes. *Journal of Molecular Evolution* 48 (4), 427-434.

Petruzzella, V., Moraes, C. T., Sano, M. C., Bonilla, E., DiMauro, S. & Schon, E. A. (1994). Extremely High Levels of Mutant mtDNAs co-localize with Cytochrome c Oxidase-negative ragged-red fibers in Patients harboring a Point Mutation at nt 3243. *Human Molecular Genetics* 3, 449-454.

Piganeau, G. & Eyre-Walker, A. (2004). A Reanalysis of the Indirect Evidence for Recombination in Human Mitochondrial DNA. *Heredity* 92 (4), 282-288.

Poulton, J., Macaulay, V. & Marchington, D. R. (1998). Is the Bottleneck Cracked? *American Journal of Human Genetics* 62, 752-757.

Previdere, C., Stuppia, L., Gatta, V., Fattorini, P., Palka, G. & Tyler-Smith, C. (1999). Y Chromosomal DNA Haplotype Differences in Control and Infertile Italian Subpopulations. *European Journal of Human Genetics* 7, 733-736.

Kong, Q. P., Bandelt, H. J., Sun, C., Yao, Y. G., Salas, A., Achilli, A., Wang, C.Y., Zhong, L., Zhu, C. L., Wu, S. F., Torroni, A. & Zhang, Y. P. (2006). Updating the East Asian mtDNA Phylogeny: a Prerequisite for the Identification of Pathogenic Mutations. *Human Molecular Genetics* 15 (13) 2076-2086.

Quintana-Murci, L., Veitia, R., Fellous, M. *et al.* (2003). Genetic Structure of Mediterranean Populations revealed

- by Y-chromosome Haplotype Analysis. *American Journal of Physical Anthropology* 121, 157-171.
- Quintana-Murci, L., Semino, O., Bandelt, H. J., Passarino, G., McElreavey, K. & Santachiara-Benerecetti, A. S. (1999). Genetic Evidence of an Early exit of *Homo sapiens sapiens* from Africa through eastern Africa. *Nature Genetics* 23, 437-441.
- Quintana-Murci, L., Krausz, C., Heyer, E. et al. (2001). The Relationship between Y chromosome DNA Haplotypes and Y Chromosome Deletions Leading to Male Infertility. *Human Genetics* 108, 55-58.
- Quintana-Murci L et al (2004) Where West meets East: The complex mtDNA landscape of the Southwest and Central Asian corridor. *Am J Hum Genet* 74:827-845.
- Rand, D. M. (2001). The Units of Selection on Mitochondrial DNA. *Annual Review of Ecology and Systematics* 32, 415-449.
- Reijo, R., Lee, T. Y., Salo, P. et al. (1995). Diverse Spermatogenic Defects in Humans Caused by Y Chromosome Deletions Encompassing a Novel RNA-Binding Protein Gene. *Nature Genetics* 10, 383-393.
- Repping, S., Skaletsky, H., Brown, L. et al. (2003). Polymorphism for a 1.6-Mb Deletion of the Human Y Chromosome Persists Through Balance between Y Chromosome Recurrent Mutation and Haploid Selection. *Nature Genetics* 35, 247-251.
- Repping, S., Skaletsky, H., Lange, J. et al. (2002). Recombination Between Palindromes P5 and P1 on the Human Y chromosome Causes Massive Deletions and Spermatogenic Failure. *American Journal of Human Genetics* 71, 906-922.
- Repping, S., Van Daalen, S. K. M., Korver, C. M. et al. (2004). A Family of Human Y Chromosome has Dispersed throughout Northern Eurasia Despite a 1.8 Mb Deletion in the Azoospermia Factor c Region. *Genomics* 83, 1046-1052.
- Reynier, P. et al. (2001). Mitochondrial DNA Content affects the Fertilizability of Human Oocytes. *Molecular Human Reproduction* 7 (5), 425-429.
- Ricchetti, M., Tekaia, F., & Dujon, B. (2004). Continued Colonization of the Human Genome by Mitochondrial DNA. *PLoS Biology* 2 (9), 1313-1324.
- Rice, W. R. (1989). Analyzing Tables of Statistical Tests. *Evolution* 43, 223-225.
- Richards, M., Corte-Real, H., Forster, P. et al. (1996). Paleolithic and Neolithic Lineages in the European Mitochondrial Gene Pool. *American Journal of Human Genetics* 59, 185-203.
- Richards, M. & Macaulay, V. (2001). The Mitochondrial Gene Tree Comes of Age. *American Journal of Human Genetics* 68, 1315-1320.
- Richards, M. et al. (2000). Tracing European Founder Lineages in the Near Eastern mtDNA pool. *American Journal of Human Genetics* 67 (5), 1251-1276.
- Richards, M. et al. (2003). Extensive Female-mediated Gene Flow from sub-Saharan Africa into near eastern Arab Populations. *American Journal of Human Genetics* 72 (4), 1058-1064.
- Richards, M. et al. (2002). In search of Geographical Patterns in European Mitochondrial DNA. *American Journal of Human Genetics* 71 (5), 1168-1174.
- Richards, M. B., Macaulay, V. A., Bandelt, H. J. & Sykes, B. C. (1998). Phylogeography of Mitochondrial DNA in Western Europe. *Annals of Human Genetics* 62, 241-260.
- Risch, N. & Merikangas, K. (1996). The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273, 1516-1517

- Roewer, L., Krawczak, M., Willuweit, S., Nagy, M., Alves, C., Amorim, A., Anslinger, K. *et al.* (2001). Online Reference Database of European Y-chromosomal Short Tandem Repeat (STR) Haplotypes. *Forensic Science International* 118,106–113.
- Rosa, A. *et al.* (2007), Y-chromosomal Diversity in the Population of Guinea-Bissau: A Multiethnic Perspective. *BMC Evolutionary Biology* 7, 124.
- Rosser, Z. H. *et al.* (2000). Y-chromosomal Diversity in Europe is Clinal and Influenced primarily by Geography, rather than by Language. *American Journal of Human Genetic* 67 (6), 1526-1543.
- Rothman, K. J. (1990). No Adjustments are needed for Multiple Comparisons. *Epidemiology* 1, 43-46.
- Rozen, S., Skaletsky, H., Marszalek, J. D., Minx, P. J., Cordum, H. S., Waterston, R. H., Wilson, R. K. & Page, D. C. (2003). Abundant Gene Conversion between Arms of Palindromes in Human and Ape Y chromosomes. *Nature* 423, 873–876.
- Rubicz, R. *et al.* (2003). Mitochondrial DNA Variation and the Origins of the Aleuts. *Human Biology* 75 (6), 809-835.
- Ruiz-Pesini E, Mishmar D, Brandon M, Procaccio V,Wallace DC. 2004. Effects of purifying and adaptive selection on regional variation in human mtDNA. *Science* 303:223–26
- Ruiz-Pesini, E., Diez, C., Lapena, A. C., Perez-Martos, A., Montoya, J., Alvarez, E. *et al.* (1998). Correlation of Sperm Motility with Mitochondrial Enzymatic Activities. *Clinical Chemistry*. 44, 1616-1620.
- Ruiz-Pesini, E., *et al.* (2000). Human mtDNA Haplogroups Associated with High or Reduced Spermatozoa Motility. *American Journal of Human Genetics* 67, 682–696.
- Ryan, M. T. & Hoogenraad, N. J., (2007). Mitochondrial-nuclear Communications. *Annual review of biochemistry* 76(1), 701-722.
- Saillard, J., Magalhaes, P. J., Schwartz, M., Rosenberg, T. & Norby, S. (2000). Mitochondrial DNA Variant 11719G is a Marker for the mtDNA Haplogroup Cluster HV. *Human Biology* 72, 1065-1068.
- Salas, A., Richards, M., De la Fe, T., Lareu, M. V., Sobrino, B., *et al.* (2002). The Making of the African mtDNA Landscape. *American Journal of Human Genetics* 71, 1082–111.
- Salas, A., Richards, M., Lareu, M. V., Scozzari, R., Coppa, A., *et al.* (2004). The African Diaspora: Mitochondrial DNA and the Atlantic Slave Trade. *American Journal of Human Genetics* 74, 454– 65.
- Salas, A., Carracedo, V., Macaulay, M., Richards, Bandelt, H. J. (2005). A practical Guide to Mitochondrial DNA Error Prevention in Clinical, Forensic, and Population Genetics. *Biochemical and biophysical research communications* 335, 891–899.
- Samuels, D., Carothers, A., Horton, R. & Chinnery, F. (2006). The Power to Detect Disease Associations with Mitochondrial DNA Haplogroups. *The American Journal of Human Genetics*, 78, 713-720.
- Sant’Ana, A. & Alves, A. (2005). DNA Mitochondrial. Departamento de Patologia, UFP.
- Santos, T. A. & St. John, J. C. (2006). Mitochondrial Content Reflects Oocyte Variability and Fertilization Outcome. *Fertility and Sterility* 85 (3), 584-591.
- Sato, A., Kono, T., Nakada, K., Ishikawa, K., Inoue, S. I., Yonekawa, H. & Hayashi, J. I. (2005). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102, 16765–16770.
- Saut, N., Terriou, P., Navarro, A., Levy, N. & Mitchell, M. J. (2000). The human Y chromosome Genes BPY2, CDY1 and DAZ are not Essential for Sustained Fertility. *Molecular Human Reproduction* 6, 789–793.
- Saxena, R. *et al.* (2000). Four DAZ Genes in Two Clusters found in AZFc Region of Human Y Chromosome. *Genomics* 67, 256–267.

- Saxena, R., de Bakker, P. I., Singer, K., Mootha, V., Burt, N., Hirschhorn, J. N., Gaudet, D., Isomaa, B., Daly, M. J., Groop, L., Ardlie, K. G. & Altshuler, D. (2006). Comprehensive Association Testing of Common Mitochondrial DNA Variation in Metabolic Disease. *American Journal of Human Genetics* 79 (1), 54-61.
- Schon, E. A., Bonilla, E. & DiMauro, S. (1997). Mitochondrial DNA Mutations and Pathogenesis. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 29, 131-149.
- Schon, E. A., Rizzuto, R., Moraes, C. T., Nakase, H., Zeviani, M. & DiMauro, S. (1989). A Direct Repeat is a HotSpot for Large-Scale Deletion of Human Mitochondrial DNA. *Science* 244, 346-349.
- Schriner, S. E., Linford, N. J., Martin, G. M. et al. (2005). Extension of Murine Life Span by Overexpression of Catalase Targeted to Mitochondria. *Science* 308, 1909-1911.
- Schurr, T. G., Ballinger, S. W., Gan, Y. Y., Hodge, J. A., Merriwether, D. A., Lawrence, D. N., Knowler, W. C., Weiss, K. M., & Wallace, D. C. (1990). Amerindian Mitochondrial DNAs have rare Asian Mutations at High Frequencies, Suggesting they Derived from Four Primary Maternal Lineages. *American Journal of Human Genetics* 46, 613-623.
- Schwartz, M. & Vissing, J. (2002). Paternal Inheritance of Mitochondrial DNA. *The New England Journal of Medicine*. 347, 576–80.
- Schwartz, A. et al. (1998). Reconstructing Hominid Y Evolution: X-Homologous Block, created by X-Y Transposition, was Disrupted by Yp Inversion through LINE-LINE Recombination. *Human Molecular Genetics* 7 (1), 1-11.
- Selvi Rani, D., Vanniarajan, A., Gupta, N. J., Chakravarty, B., Singh, L. & Thangaraj, K. (2006). A Novel Missense Mutation C11994T in the Mitochondrial ND4 Gene as a cause of Low Sperm Motility in the Indian Subcontinent. *Fertility and Sterility* 86, 1783–5.
- Semino, O. et al. (2000). The Genetic Legacy of Paleolithic Homo sapiens sapiens in Extant Europeans: a Y Chromosome Perspective. *Science* 290 (5494), 1155-1159.
- Semino, O. et al (2002). Ethiopians and Khoisan share the Deepest Clades of the Human Y-Chromosome Phylogeny. *American Journal of Human Genetics* 70 (1), 265-268.
- Servidei, S. (2004). Mitochondrial Encephalomyopathies: Gene Mutation. *Neuromuscular Disorders* 14, 107–16.
- Shadel, G. S. & Clayton, D. A. (1997). Mitochondrial DNA Maintenance in Vertebrates. *Annual Review of Biochemistry* 66, 409-35.
- Shen, P. et al. (2000). Population Genetic Implications from Sequence Variation in four Y Chromosome Genes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97, 7354–7359.
- Shoubridge, E. A. (2001). Nuclear Genetic Defects of Oxidative Phosphorylation. *Human Molecular Genetics* 10, 2277-2284.
- Silva, W. A., Jr., Bonatto, S. L., Holanda, A. J., Ribeiro-Dos-Santos, A. K., Paixao, B. M., Goldman, G. H., Abe-Sandes, K., Rodriguez-Delfin, L., Barbosa, M., Paco-Larson, M. L., Petzl-Erler, M. L., Valente, V., Santos, S. E. & Zago, M. A. (2002). Mitochondrial Genome Diversity of Native Americans supports a Single Early entry of Founder Populations into America. Major data corrections in *American Journal of Human Genetics* 72 (5),1341-1346; author reply 1346-1349. *American Journal of Human Genetics* 71 (1), 187-192.
- Simonetti, S., Chen, X., DiMauro, S. & Schon, E. A. (1992). Accumulation of Deletions in Human Mitochondrial DNA during Normal Aging: Analysis by Quantitative PCR. *Biochimica et Biophysica Acta* 1180, 113-122.
- Smith, D. G. et al. (1999). Distribution of mtDNA Haplogroup X Among Native North Americans. *American Journal Physical Anthropology* 110 (3), 271-284.
- Skaletsky, H., Kurada-Kawaguchi, T., Minx, P. J., Cordum, H. S., Hillier, L., Brown, L. G. et al. (2003). The Male-Specific Region of the Human Y Chromosome: A Mosaic of Discrete Sequence Classes. *Nature* 423, 825-

- Spiropoulos, J., Thurnbull, D. M. & Chinnery, P. F. (2002). Can Mitochondrial DNA Mutations Cause Sperm Dysfunction? *Molecular Human Reproduction* 8, 719-721.
- St. John, J. C., Jokhi, R. P. & Barratt, C. L. (2001). Men with Oligoasthenoteratozoospermia Harbour Higher Numbers of Multiple Mitochondrial DNA Deletions in their Spermatozoa, but Individuals Deletions are not Indicative of Overall Aetiology. *Molecular Human Reproduction* 7, 103-111.
- St. John, J. C., Cooke, I. D. & Barratt, C. L. (1997). Mitochondrial Mutations and Male Infertility. *Nature Medicine* 3, 124-125.
- St. John, J. C., Schatten, G. (2004). Paternal Mitochondrial DNA Transmission During Nonhuman Primate Nuclear Transfer. *Genetics* 167: 897-905.
- Steuerwald, N. *et al.* (2000). Quantification of mtDNA in Single Oocytes, Polar Bodies and Subcellular Components by Real Time Rapid Cycle Fluorescence monitored PCR. *Zygote* 8 (3), 209-215.
- Stoneking M and Soodyall H (1996) Human evolution and the mitochondrial genome. *Curr Opin Genet Dev* 6 (6):731- 736.
- Stoneking, M. (1994). Mitochondrial DNA and Human Evolution. *Journal of Bioenergetics and Biomembranes* 26 (3), 251-259.
- Stringer, C. (2000). Coasting out of Africa. *Nature* 405 (6782), 24-25.
- Stringer, C. (2003). Human Evolution: Out of Ethiopia. *Nature* 423 (6941), 692-693.
- Stuppia, L., Gatta, V., Fogh, I., *et al.* (2001). Genome Organization, Physical Mapping and Involvement in Yq Microdeletions of the UCY2 (BPY2) Gene. *Genomics* 72, 153-157.
- Sun, C., Skaletsky, H., Rozen, S., Gromoll, J., Nieschlag, E., Oates, R. & Page, D. C. (2000). Deletion of Azoospermia Factor a (AZFa) Region of Human Y Chromosome Caused by Recombination between HERV15 Proviruses. *Human Molecular Genetics* 9, 2291–2296.
- Sun, C. *et al.* (2006). The Dazzling Array of Basal Branches in the mtDNA Macrohaplogroup M from India as Inferred from Complete Genomes. *Molecular Biology and Evolution* 23 (3), 683-690.
- Sutovsky, P., Van Leyen, K., McCauley, T., Day, B. N. & Sutovsky, M. (2004). Degradation of Paternal Mitochondria after Fertilization: Implications for Heteroplasmy, Assisted Reproductive Technologies and mtDNA Inheritance. *Reproductive BioMedicine Online* 8, 24–33.
- Thomson, R., Prichard, J. K., Shen, P., Oefner, P. J. & Feldman, M. W. (2000). Recent Common Ancestry of Human Y Chromosomes: Evidence from DNA Sequence Data. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 97, 7360-7365.
- Thyagarajan, B., Padua, R. A. & Campbell, C. (1996). Mammalian Mitochondria Possess Homologous DNA Recombination Activity. *Journal of Biological Chemistry* 271 (44), 27536-27543.
- Tiepolo, L. & Zuffardi, O. (1976). Localization of Factors Controlling Spermatogenesis in the Nonfluorescent Portion of the Human Y Chromosome Long Arm. *Human Genetics* 34, 119-124.
- Tilford, C. A. *et al.* (2001). A Physical Map of the Human Y Chromosome. *Nature* 409 (6822), 943-945.
- Torrioni, A., Huoponen, K., Francalacci, P., Petrozzi, M., Morelli, L., Scozzari, R., Obinu, D., Savontaus, M. L. & Wallace, D. C. (1996). Classification of European mtDNAs from an Analysis of three European Populations. *Genetics* 144, 1835-1850.
- Torrioni, A., Lott, M. T., Cabell, M. F., Chen, Y-S., Lavergue, L. *et al.* (1994a). Mt DNA and the Origin of

- Caucasians. Identification of Ancient Caucasian-Specific Haplogroups, one of which is prone to a Recurrent Somatic Duplication in the D-Loop Region. *American Journal of Human Genetics* 55, 760-776.
- Torrioni, A., Miller, J. A., Moore, L. G., Zamudio, S., Zhuang, J. et al. (1994b). Mitochondrial DNA Analysis in Tibet. Implications for the Origin of the Tibetan Population and its Adaptation to High Altitude. *American Journal of Human Genetics* 93, 189-199.
- Torrioni, A., Neel, J. V., Barrantes, R., Schurr, T. G. & Wallace, D. C. (1994c). A Mitochondrial "Clock" for the Amerinds and its Implications for Timing Their Entry into North America. *Proceedings of the National Academy of Science USA* 91, 1158-1162.
- Torrioni, A. & Wallace, D. C. (1994). Mitochondrial DNA Variation in Human Populations and Implications for Detection of Mitochondrial DNA Mutations of Pathological Significance. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 26, 261-271.
- Torrioni, A., Schurr, T. G., Cabell, M. F., Brown, M. D., Neel, J. V. et al. (1993). Asian Affinities and Continental Radiation of the Four Founding Native American mtDNAs. *American Journal of Human Genetics* 53, 563-590.
- Torrioni, A. et al. (2006). Harvesting the Fruit of the Human mtDNA Tree. *Trends in Genetics* 22 (6), 339-345.
- Torrioni, A. et al. (1997). Haplotype and Phylogenetic Analyses Suggest that one European-specific mtDNA Background Plays a Role in the Expression of Leber Hereditary Optic Neuropathy by Increasing the Penetrance of the Primary Mutations 11778 and 14484. *American Journal of Human Genetics* 60 (5), 1107-1121.
- Torrioni, A., Schurr, T. G., Yang, C. C., Szathmary, E. J. E., Williams, R. C., Schanfield, M. S., Troup, G. A., Knowler, W. C., Lawrence, D. N., Weiss, K. M. & Wallace, D. C. (1992). Native American Mitochondrial DNA Analysis Indicates that the Amerind and the Nadene Populations were Founded by two Independent Migrations. *Genetics* 130, 153-162.
- Torrioni, A., Campos, Y., Rengo, C., Sellitto, D., Achilli, A., Magri, C., Semino, O., García, A., Jara, P., Arenas, J. & Scozzari, R. (2003). Mitochondrial DNA Haplogroups Do Not Play a Role in the Variable Phenotypic Presentation of the A3243G Mutation. *American Journal of Human Genetics* 72, 1005-1012, 2003.
- Tourmen, Y. et al. (2002). Structure and Chromosomal Distribution of Human Mitochondrial Pseudogenes. *Genomics* 80, 71-77.
- Trifunovic, A., Wredendeg, A., Falkenberg, M. et al. (2004). Premature Ageing in Mice Expressing Defective Mitochondrial DNA Polymerase. *Nature* 429, 417-423.
- Trounce, I., Byrne, E. & Marzuki, S. (1989). Decline in Skeletal Muscle Mitochondrial Respiratory Chain Function: Possible Factor in Ageing. *Lancet* 1(8639), 637-639.
- Tyler-Smith, C. et al. (1993). Localization of DNA Sequences Required for Human Centromere Function through an Analysis of Rearranged Y Chromosomes. *Nature Genetics* 5, 368-375.
- Underhill, P. A., Jin, L., Lin, A. A., Mehdi, S. Q., Jenkins, T., Vollrath, D., Davis, R. W., Cavalli-Sforza, L. L. & Oefner, P. J. (1997). Detection of Numerous Y Chromosome Biallelic Polymorphisms by Denaturing High-performance Liquid Chromatography. *Genome Research* 7, 996-1005
- Underhill, P. A., Shen, P., Lin, A. A., Jin, L., Passarino, G., Yang, W. H., Kauffman, E., Bonne-Tamir, B., Bertranpetit, J., Francalacci, P. et al. (2000). Y Chromosome Sequence Variation and the History of Human Populations. *Nature Genetics* 26, 358-361.
- Underhill, P. A., Passarino, G., Lin, A. A. et al. (2001). The Phylogeography of Y Chromosome Binary Haplotypes and the Origins of Modern Human Populations. *Annals of Human Genetics* 65, 43-62.
- Underhill, P. A. & Kivisild, T. (2007). Use of Y Chromosome and Mitochondrial DNA Population Structure in Tracing

Human Migrations. *Annual Review of Genetics* 41.

Underhill, P. A. (2003). Inferring Human History: Clues from Y-Chromosome Haplotypes. Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*: pp 487-493.

van der Walt, J. M. *et al.* (2004). Analysis of European Mitochondrial Haplogroups with Alzheimer Disease Risk. *Neuroscience Letters*, 365:28–32.

Vogt, P. H. (1998). Human Chromosome Deletions in Yq11, AZF Candidate Genes and Male Infertility: History and Update. *Molecular Human Reproduction* 4, 739–744.

Vogt, P. H. (2004). Genomic Heterogeneity and Instability of the AZF Locus on the Human Y Chromosome. *Molecular and Cellular Endocrinology* 224, 1–9.

Vogt, P. H. (2005). Azoospermia Factor (AZF) in Yq11: towards a Molecular Understanding of its Function for Human Male Fertility and Spermatogenesis. *Reproductive BioMedicine Online* 10, 81–93.

Vogt, P. H. & Fernandes, S. (2003). Polymorphic DAZ Gene Family in Polymorphic Structure of AZFc Locus: Artwork or Functional for Human Spermatogenesis? *Acta Pathologica, Microbiologica et Immunologica* 111,115–127.

Vogt, P. H., Edelman, A., Kirsch, S., *et al.* (1996). Human Y Chromosome Azoospermia Factors (AZF) Mapped to Different Subregions in Yq 11. *Human Molecular Genetics* 5, 933-943.

Vogt, P. H., Edelmann, A., Hirschmann, P. & Kohler, M. R. (1995). The Azoospermia Factor (AZF) of the Human Y chromosome in Yq11: Function and Analysis in Spermatogenesis. *Reproduction, Fertility and Development* 7: 685-693.

Wakeley, J. (1994). Substitution-rate Variation Among Sites and the Estimation of Transition Bias. *Molecular Biology and Evolution* 11 (3), 436- 442.

Wallace, D. C. (1995). Mitochondrial DNA Variation in Human Evolution and Disease. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91, 8739-8746.

Wallace, D. C. (1997). Mitochondrial DNA Mutations and Bioenergetic Defects in Aging and Degenerative Diseases. In: Rosenberg, R. N., Prusiner, S. B., DiMauro, S., Barchi, R. L. (eds) *The Molecular and Genetic Basis of Neurological Disease. Butterworth-Heinemann, Boston*, pp 237-269.

Wallace, D. C., Brown, M. D. & Lott, M. T. (1997). Mitochondrial Genetics. In: Rimoin, D. L., Connor, J. M., Pyeritz, R. E., Emery, A. E. H. (eds) *Emory and Rimoin's Principles and practice of medical genetics. Churchill Livingstone, London*, pp 277-332.

Wallace, D. C. (1992). Disease of the Mitochondrial DNA. *Annual Review os Biochemistry*. 61, 1175-1212.

Wallace, D. C. (1999). Mitochondrial Diseases in Man and Mouse. *Science* 283, 1482-1488.

Wallace, D. C., Brown, M. D. & Lott, M. T. (1999). Mitochondrial DNA Variation in Human Evolution and Disease. *Gene* 238 (1), 211-230.

Wallace, D.C., (2005). A Mitochondrial Paradigm of Metabolic and Degenerative Diseases, Aging, and Cancer: a Dawn for Evolutionary Medicine. *Annual Reviews of Genetics* 39, 359–407.

Wallace, D.C., 2007. Why do We Still Have a Maternally Inherited Mitochondrial DNA? Insights from Evolutionary Medicine. *Annual Review of Biochemistry* 76(1), 781-821.

Wallis, G. P. (2000). Mitochondrial Recombination or Coevolution of Sites? *Trends in Ecology & Evolution* 15, 470-471.

Wells, R. S. *et al.* (2001). The Eurasian Heartland: A Continental Perspective on Y-chromosome Diversity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (18), 10244-10249.

- Wilkinson-Herbots, H. M., Richards, M. B., Forster, P. & Sykes, B. C. (1996). Site 73 in Hypervariable Region II of the Human Mitochondrial Genome and the Origin of European Populations. *Annals of Human Genetics* 60, 499-508.
- Wood, E. T. *et al.* (2005). Contrasting Patterns of Y Chromosome and mtDNA Variation in Africa: Evidence for Sex-biased Demographic Processes. *European Journal of Human Genetics* 13 (7), 867-876.
- Whitfield, L. S., Sulston, J. E. & Goodfellow, P. N. (1995). Sequence Variation of the Human Y Chromosome. *Nature* 378 (6555), 379-380.
- Xia, C., Meng, Q., Liu, L. Z., Rojanasakul, Y., Wang, X. R. & Jiang, B. H., (2007). Reactive Oxygen Species Regulate Angiogenesis and Tumor Growth through Vascular Endothelial Growth Factor. *Cancer Research* 67(22), 10823-10830.
- YCC, Y-Chromosome-Consortium (2002). A Nomenclature System for the Tree of Human Y-chromosomal Binary Haplogroups. *Genome Research* 12, 339-48.
- Yao, Y. G., Macaulay, V., Kivisild, T., Zhang, Y. P. & Bandelt, H. J. (2003). To Trust or Not to Trust an Idiosyncratic Mitochondrial Data Set. *American Journal of Human Genetics* 72, 1341-1346, author reply 1346-1349.
- Yu, M. *et al.* (2002). A New Haplogroup Pattern Displayed in Fujian Han in China. *Journal of Human Genetics* 47, 95-98.
- Zaykin, D. V., Zhivotovsky, L. A., Westfall, P. H. & Weir, B. S. (2002). Truncated Product Method for combining p-values. *Genetic Epidemiology* 22, 170-185.
- Zeviani, M. & Carelli, V. (2007). Mitochondrial Disorders. *Current Opinion in Neurology* 20(5), 564-571.