

# Importância do Estudo das Microdeleções do Cromossoma Y na Infertilidade Masculina

.....

Cristina Ferrás, PhD student<sup>1</sup>, Paula Costa, MSc student<sup>1</sup>, Susana Fernandes, PhD<sup>1</sup>, Filipa Carvalho, PhD<sup>1</sup>, Joana Marques, PhD student<sup>1</sup>, Cláudia Alves, PhD student<sup>1</sup>, Maria João Pinho, PhD student<sup>1</sup>, Carolina Almeida, PhD student<sup>1</sup>, Joaquina Silva, MD<sup>1,2</sup>, Paulo Viana, BSc<sup>2</sup>, Sónia Sousa, BSc<sup>2</sup>, Ana Gonçalves, BSc<sup>2</sup>, Luis Ferrás, MD<sup>2,3</sup>, Mário Sousa, MD, PhD<sup>1,2,4</sup> e Alberto Barros, MD, PhD<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Departamento de Genética, Faculdade de Medicina;

<sup>2</sup>Centro de Genética da Reprodução Alberto Barros;

<sup>3</sup>Serviço de Urologia, Hospital de Gaia;

<sup>4</sup>Lab Biologia Celular, ICBAS; Universidade do Porto, Porto, Portugal

Correspondência para: Mário Sousa, MD, PhD – Lab Biologia Celular – ICBAS, Universidade do Porto

Lg. Prof. Abel Salazar 2 – 4099-003 PORTO

Tel: (351) 222 062 217 – Fax: (351) 222 062 232 – E-mail: msousa@icbas.up.pt

## Resumo

Estudou-se o cromossoma Y de 917 homens inférteis consecutivos e 114 homens férteis, todos sem anomalias de cariótipo. A distribuição das causas de infertilidade foi a seguinte: 628 (69%) com anomalias dos parâmetros seminais e 289 (32%) com azoospermia. Dos casos com alterações seminais, 65% deveu-se a oligozoospermia e 35% a distúrbios da mobilidade/morfologia dos espermatozóides. Na oligozoospermia, 48% eram severos ( $<1 \times 10^6/\text{ml}$ ), 24% moderados ( $1-5 \times 10^6/\text{ml}$ ), e 28% ligeiros ( $5-20 \times 10^6/\text{ml}$ ). Na azoospermia, 77% eram secretores e 23% obstrutivos. Na azoospermia secretora, a biópsia testicular de diagnóstico mostrou 41% (91/223) dos casos com síndrome de células de Sertoli, 35% (78/223) com hipoespermatogénese e 24% (54/223) com paragem da maturação em meiose. Encontraram-se microdeleções AZF na oligozoospermia severa (8/196, 4%) e na azoospermia secretora (26/223, 12%). Na biópsia testicular de tratamento, em 15/91 (17%) dos casos com síndrome de células de Sertoli, em 29/54 (53.7%) dos casos com paragem da maturação, e em 100% dos 78 casos com hipoespermatogénese foram encontrados espermátides/espermatozóides para tratamento por microinjecção. Com base nos dados da biópsia testicular de diagnóstico e nos dados moleculares do cromossoma Y, o prognóstico de recuperação de espermátides/espermatozóides na biópsia testicular de tratamento é o seguinte: (a) no síndrome de células de Sertoli, 17% em geral, 15% se sem microdeleções AZFc, e de 40% se com microdeleções AZFc; (b) na

paragem da maturação, 54% em geral, 44% se sem microdeleções AZFc, e de 82% se com microdeleções AZFc.

**Palavras-chave:** azoospermia não-obstrutiva / cromossoma Y / hipoespermatogénese / infertilidade masculina / microdeleções AZF / oligozoospermia / paragem da maturação / síndrome de células de Sertoli

## Abstract

We have studied the Y chromosome in 917 infertile and 114 fertile portuguese males, all with normal karyotypes. The causes of infertility were: 628 (69%) with seminal disorders, and 289 (32%) with azoospermia. Of the cases with seminal disorders, 65% presented with oligozoospermia, and 35% with astheno/teratozoospermia. In respect to the degree of severity in oligozoospermia, 48% were severe (<1x10<sup>6</sup>/ml), 24% moderate (1-5x10<sup>6</sup>/ml), and 28% slight (5-20x10<sup>6</sup>/ml). In respect to azoospermia, 77% were non-obstructive, and 23% obstructive. In secretory azoospermia, the histopathologic diagnostic testicle biopsy showed 41% (91/223) cases with Sertoli cell only syndrome, 35% (78/223) with hypospermatogenesis, and 24% (54/223) with maturation arrest at the primary spermatocyte stage in meiosis I. We found AZF microdeletions in severe oligozoospermia (8/196, 4%), and in secretory azoospermia (26/223, 12%). After treatment testicle biopsy, in 15/91 (17%) of the cases with Sertoli cell only syndrome, in 29/54 (53.7%) of the cases with maturation arrest, and in 100% of the 78 cases with hypospermatogenesis, we could retrieve spermatids/spermatozoa for microinjection treatment. Based on the histopathologic analysis and in molecular data, the prognosis that can be given to patients for a successful retrieval of spermatids/spermatozoa during the treatment testicle biopsy is: (a) in Sertoli cell only syndrome, 17% in general, 15% if without AZFc microdeletions, and 40% if with AZFc microdeletions; (b) in maturation arrest, 54% in general, 44% if without AZFc microdeletions, and 82% if with AZFc microdeletions.

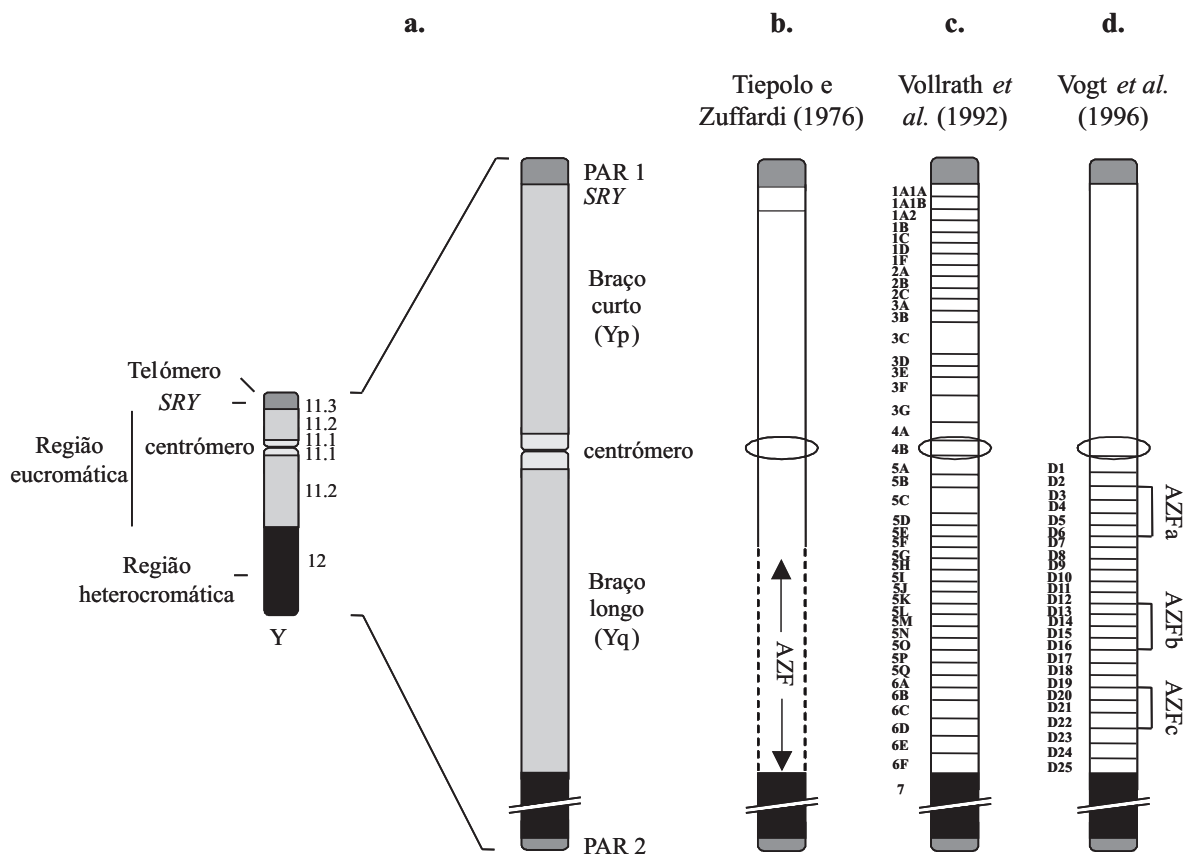
**Key-words:** AZF microdeletions / hypospermatogenesis / male infertility / maturation arrest / non-obstructive azoospermia / Oligozoospermia / Sertoli cell only syndrome / Y chromosome

## Introdução

A infertilidade define-se como a incapacidade de um casal alcançar espontaneamente uma gravidez viável ao fim de um ano de relações sexuais desprotegidas. Esta dificuldade de procriação e transmissão das características genéticas à descendência afecta cerca de 15-20% dos casais, sendo que o homem contribui com um factor de 50-70% (1,2). Etiologicamente, a infertilidade masculina apresenta causas genéticas e não genéticas. Destas últimas, consideram-se como principais factores os hábitos (sedentarismo, tabaco, álcool, drogas), os produtos químicos ambientais (hormonas alimentares, dioxinas,

metais pesados, calor), determinados medicamentos, distúrbios endócrinos, o varicocele, a criptorquidia e a orquite. De entre as causas genéticas, destacam-se as anomalias numéricas e estruturais dos cromossomas (3), as mutações CFTR e as microdeleções do cromossoma Y (4-7).

As primeiras evidências que permitiram postular a existência, no cromossoma Y, de factores genéticos associados à infertilidade masculina, surgiram na década de 70 com a análise dos cariótipos de 1171 homens azoospermicos (8). Nesses pacientes (Figura 1a,b), observaram-se 6 casos com perda da região eucromática distal do braço longo (Yq11) do cromossoma Y, o que permitiu propor a existência em Yq11.2



**Figura 1** (a) Esquema da estrutura do cromossoma Y. (b) Padrão de microdeleções em Yq11 terminal (a tracejado) segundo Tiepolo e Zuffardi (1976). (c) Mapa de 43 intervalos (1A1A-7) segundo Vollrath et al. (1992). (d) Mapa de microdeleções AZF (AZFa, AZFb, AZFc) segundo Vogt et al. (1996). *SRY*: gene determinante do sexo masculino; *PAR*: região pseudo autossômica do telómero (local de emparelhamento e de recombinação homóloga com o cromossoma X na meiose I).

de um locus responsável pela espermatogénese, designado AZF (Azoospermia Factor).

O locus AZF (Figura 1c) foi subdividido em 43 intervalos (9). Na região AZF, puderam-se então demonstrar a existência de genes cujos produtos são expressos no testículo e possuem a capacidade de regular a espermatogénese (10,11). O estudo molecular de pacientes masculinos inférteis levou então à observação de microdeleções intersticiais (submicroscópicas, não detectáveis no cariótipo) na região AZF, permitindo então perceber que aí residiam múltiplos genes responsáveis por etapas diferentes da espermatogénese. De acordo com as microdeleções encontradas nos pacientes masculinos inférteis, a região AZF foi redesenhada nos seus intervalos (Figura 1d) para nela se mapearem três grandes subregiões (10,12): AZFa na parte proximal (intervalo D3-D6), AZFb na porção mediana (D13-D16), e AZFc na zona distal (D20-D22). Assim, e apesar de ainda

não existir um acordo definitivo entre o tipo de microdeleção e a gravidade do defeito espermatogénico (13-18), a microdeleção de AZFa condiciona um síndrome de células de Sertoli (SO), a microdeleção de AZFb provoca paragem em meiose I (MA), e a microdeleção de AZFc condiciona hipoespermatogénese (HP), quer esta curse com oligozoospermia severa ou azoospermia secretora (5-7,11,19).

Mais recentemente, podemos demonstrar que as microdeleções de AZFc condicionam um quadro evolutivo, que se inicia com oligozoospermia (6,20,21), seguindo-se entrada em azoospermia secretora com quadro de HP. Este quadro continua a agravar-se no tempo e em sentido retrógrado sobre o ciclo da espermatogénese, podendo levar a situações de MA e SO (7). É esta situação evolutiva que permite, actualmente, explicar como é possível, em pacientes com microdeleções de AZFc, existir uma ampla variedade de quadros histopatológicos na biópsia testicu-

lar de diagnóstico (BTD), e como é possível, no mesmo paciente, co-existirem túbulos seminíferos com diferentes tipos de células germinais. Baseados nestas observações é pois possível oferecer aos pacientes um prognóstico de sucesso (obtenção de espermátides e/ou espermatozóides para microinjecção) antes da biópsia testicular de tratamento (BTT) (22).

Assim, a análise da maior série clínica (portuguesa) de 148 pacientes com azoospermia secretora demonstrou, na BTD, 38.5% SO, 31.8% MA e 29.7% HP. Uma análise muito detalhada de 100 túbulos seminíferos na BTD permitiu subdividir os quadros de MA e SO em síndromes completos e incompletos. Na MA, a célula mais madura foram espermátócitos primários (MA completa) em 32% dos casos, enquanto que em 68% dos pacientes pelo menos alguns túbulos seminíferos apresentaram espermátides (MA incompleta). Do mesmo modo, no SO, 61% foram SO completos e 39% SO incompletos. A correlação dos resultados obtidos na biópsia testicular de tratamento, múltipla e bilateral, dos 148 pacientes, com os resultados da BTD, permite actualmente definir um prognóstico de sucesso antes da BTT: 98% na HP, 61.7% na MA, 53% na MA completa, 66% na MA incompleta, 29.8% no SO, 3% no SO completo e 73% no SO incompleto (22).

As microdeleções do cromossoma Y têm sido descritas em mais de 5% dos pacientes com infertilidade idiopática. As microdeleções da região AZF são encontradas numa média de 13% dos pacientes com azoospermia por lesão severa da espermatogénese. A frequência de microdeleções das regiões AZFa e AZFb é, claramente, inferior à frequência de microdeleções da região AZFc (16,17,19,23).

Mais recentemente, descrevemos que os casos sem microdeleções em AZF, devem ser analisados para a perda da cópia DAZ1 em AZFc, pois esta parece ser a responsável pela síndrome atribuído à microdeleção de AZFc. Fruto deste trabalho, verificou-se que 8% dos casos de oligozoospermia severa apresentam microdeleções de AZFc/DAZ1 (6,20,21).

Na população portuguesa, determinamos na MA uma frequência de 23% de microdeleções AZF, das quais 15% AZFc/DAZ1 e 8% AZFb; na MA incompleta, 30% AZF, 23% AZFc/DAZ1 e 7% AZFb; e na MA completa 14% AZF, 5% AZFc/DAZ1 e 9% AZFb. O prognóstico que pode ser oferecido aos pacientes com MA antes da BTT é pois de 88% se apresentar microdeleção AZFc/DAZ1 e de 52% na ausência de

microdeleções (7). Do mesmo modo, no SO, encontramos uma frequência de 36% de microdeleções AZF, das quais 31% AZFc/DAZ1, 3% AZFa e 3% AZFb; no SO incompleto, 58% AZF, 58% AZFc/DAZ1, 0% AZFa e 0% AZFb; e no SO completo 26% AZF, 19% AZFc/DAZ1, 4% AZFa e 4% AZFb. O prognóstico que pode ser oferecido aos pacientes com SO antes da BTT é pois de 58% se apresentar microdeleção AZFc/DAZ1 e de 19% na ausência de microdeleções (7).

As microdeleções intersticiais resultam de processos de recombinação homóloga entre sequências de DNA repetitivas que ocorrem anormalmente dentro do mesmo braço longo do cromossoma Y. Estes processos decorrem na meiose paterna e constituem mutações de novo que podem ser transmitidas aos filhos durante o tratamento por microinjecção (6,7,13-21,23), pelo que só pode ser travada a sua transmissão pelo diagnóstico genético pré-implantação (2,4,24,25). A elevada frequência de microdeleções encontradas na região AZFc pode ser explicada pelo facto desta região distal do Yq11.2 ser rica em blocos de DNA repetitivo e flanqueada pela região Yq12 heterocromática, também altamente repetitiva (17,18,23).

No presente trabalho, efectuamos uma revisão dos resultados do estudo molecular do cromossoma Y em 917 pacientes inférteis consecutivos de modo a proporcionar aos clínicos da área uma ideia da importância das microdeleções AZF no diagnóstico e prognóstico daqueles doentes, bem como da sua frequência populacional em Portugal.

## Métodos

Sob consentimento informado, foram estudados 917 homens inférteis sem qualquer anomalia de cariótipo. A classificação destes pacientes (Tabela I) foi efectuada, de acordo com a clínica e o espermoograma, em azoospermia secretora (SAZ; n=223), azoospermia obstrutiva (OAZ; n=66), oligozoospermia severa (SOZ;  $<1 \times 10^6$  espermatozóides/ml; n=196), oligozoospermia moderada (MOZ;  $1-5 \times 10^6$  Sz/ml; n=100), oligozoospermia ligeira (LOZ;  $5-20 \times 10^6$  Sz/ml; n=113), e outras alterações do espermoograma (n=219). Todos os pacientes com azoospermia secretora foram submetidos a biópsia testicular múltipla e bilateral para tratamento da infertilidade com recurso a microinjecção (22).

**Tabela I. Frequência de microdeleções AZF (delAZF)**

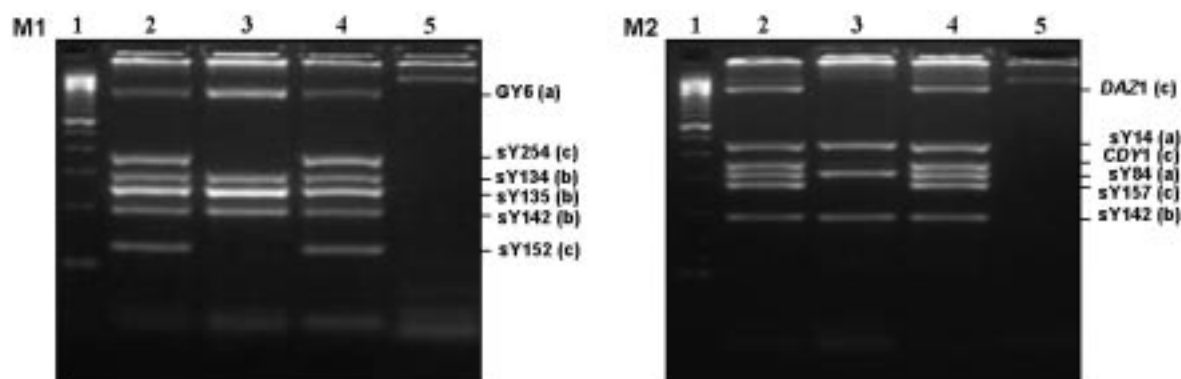
População portuguesa estudada			delAZF	
Classificação/Síndrome	N	%	N	%
Férteis	114		0	
Inférteis	917		34	3.7
Alterações dos parâmetros seminais	628	68.5	8	1.3
Outras alterações	219	23.9	0	
Oligozoospermia	409	44.6	8	2
Oligozoospermia ligeira	113	12.3	0	
Oligozoospermia moderada	100	10.9	0	
Oligozoospermia severa	196	21.4	8	4.1
Azoospermia	289	31.5	26	9
Azoospermia obstrutiva	66	7.2	0	
Azoospermia secretora	223	24.3	26	11.7

Foram recolhidas amostras de sangue periférico (cerca de 10 ml) de todos os pacientes, para isolar DNA genómico a partir dos linfócitos. O isolamento do DNA foi realizado usando o método salting-out. A pesquisa das microdeleções na região Yq11.2-AZF foi realizada por PCR-Multiplex (5-7,21), utilizando 13 site tagged sequences (STS) mapeados nas três subregiões AZF (Laboratorial licence from EQAS Y Chromosome, 2002): AZFa: sY84, USP9Y, GY6; AZFb: sY691, sY134, sY135, sY142; AZFc: sY152, sY157, BPY2, sY254, DAZ1, CDY1 (Tabela II). Os marcadores sY14 (SRY) e ZFX/ZFY em Yp foram utilizados como controlos positivos internos. O DNA genómico de um homem fértil e de uma mulher foram usados como controlos positivos e negativos, respectivamente, em cada reacção de PCR (Figura

2). A análise molecular do cromossoma Y foi adicionalmente realizada em 114 homens férteis seleccionados no momento da paternidade (Serviço de Obstetria, Hospital de S. João), após consentimento informado.

## Resultados

O estudo molecular do cromossoma Y nos 917 pacientes inférteis, com cariótipo normal, revelou 34/917 (3.7%) microdeleções na região Yq11.2-AZF (Tabelas I, III; Figura 2). As microdeleções foram detectadas nos casos de oligozoospermia severa (8/196, 4.1%) e azoospermia secretora (26/223, 11.7%). Das 26 microdeleções AZF detectadas na azoospermia secretora, 3 (1.3%) foram em AZFa, 3



**Figura 2. Electroforese em gel de agarose de reacções PCR-Multiplex (M1, M2). (1) padrões de tamanho molecular do DNA (100 em 100 bp). (2) paciente sem microdeleções AZF. (3) paciente com microdeleção AZFc. (4) controle homem fértil. (5) controle mulher.**

**Tabela II STS usados na análise molecular do cromossoma Y**

STS	Locus	Região	Tamanho (bp) do produto amplificado	Sequência 5'→3' dos primers: forward/reverse
sY14	SRY	Yp	472	GAATATTCCCGCTCTCCGGA GCTGGTGCTCCATTCTTGAG
ZFX/ZFY	ZFX/ZFY	Yp11.3 Xq34	495	ACCRCTGTA CTGACTGTGATTACAC GCACYCTTTTGGTATCYGAGAAAGT
sY84	DYS273	AZFa	326	AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT GCCTACTACCTGGAGGCTTC
USP9Y	USP9Y		941	CAGGGTTGGCTAGTGGATCTC CTGCCATTCGCTCAGCTGTC
GY6	DBY		1160	CGTAATCCCGCGATCTTATG GTAGCGCAATGCTGGATCTC
sY691	EIF1AY	AZFb	123	GATTTTGGCCATCATCAACC GGTAATTCAATGCCTCAGCTTTT
sY134	DYS224		301	GTCTGCCTCACCATAAAAACG ACCACTGCCAAAACCTTCAA
sY135	DYS225		253	CATTTCCACATTATGATAATTATGC ACCCAGAGAGTAGAAACAGTGC
sY142	DYS230		196	AGCTTCTATTGAGGGCTTC CTCTCTGCAATCCCTGACAT
sY152	DYF86S1	AZFc	125	AAGACAGTCTGCCATGTTTCA ACAGGAGGGTACTTAGCAGT
sY157	DYS240		285	CTTAGGAAAAAGTGAAGCCG CCTGCTGTCAGCAAGATACA
BPY2	BPY2		850	GTCCATAGTGGGCTTGCTGA GCTTGTTCACATATGGCACA
sY254	DAZ		350	GGGTGTTACCAGAAGGCAAA GAACCGTATCTACCAAAGCAGC
DAZ1	DAZ		1300	GGAAGCTGCTTTGGTAGATAC TAGGTTTCAGTGTGGATTCCG
CDY1	CDY		396	GGGCGAAAGCTGACACGAA GCTATGAAGATGGATTAGGGCA

STS: sequence tagged site (sequência conhecida do DNA); bp: pares de bases; R: A/G; Y: C/T

(1.3%) em AZFa+b, 1 (0.45%) em AZFb, 1 (0.45%) em AZFb+c e 18 (8.1%) em AZFc (19/223, 8.5% em AZFc). Todos os 8 casos de microdeleções na oligozoospermia severa foram em AZFc.

A biópsia testicular de diagnóstico dos 223 pacientes com azoospermia secretora revelou 91 (41%) casos com síndrome de células de Sertoli, 54 (24%) com paragem da maturação em meiose I, e 78 (35%)

com hipoespermatogénese.

Na biópsia testicular de tratamento dos pacientes, obtiveram-se espermatozóides ou espermátides alongados ou em alongamento (foco de espermiogénese) em 15/91 (16.5%) dos casos com síndrome de células de Sertoli, em 29/54 (53.7%) dos casos com paragem em meiose, e em 100% dos casos de hipoespermatogénese. Para o síndrome de

**Tabela III Tipo de microdeleções do cromossoma Y encontradas na população**

N	SAZ					SOZ		
	3	3	1	1	18	8		
STS	Locus	Região						
ZFX/ZFY	ZFX/ZFY	Yp	+	+	+	+	+	+
sY14	SRY		+	+	+	+	+	+
sY84	DYS273	AZFa	+	+	+	+	+	+
USP9Y	USP9Y		+	+	+	+	+	+
GY6	DBY		-	-	+	+	+	+
sY691	EIF1AY	AZFb	+	-	-	-	+	+
sY134	DYS224		+	+	+	-	+	+
sY135	DYS225		+	+	+	-	+	+
sY142	DYS230		+	+	+	-	+	+
sY152	DYF86S1	AZFc	+	+	+	-	-	-
sY157	DYS240		+	+	+	-	-	-
BPY2	BPY2		+	+	+	-	-	-
sY254	DAZ		+	+	+	-	-	-
DAZ1	DAZ		+	+	+	-	-	-
CDY1	CDY		+	+	+	-	-	-

SAZ: azoospermia secretora; SOZ: oligozoospermia severa

(+) sequência presente (intacta); (-) sequência ausente (microdeleção)

células de Sertoli e a paragem em meiose, estes quadros foram classificados como síndromes incompletos. Os restantes casos de síndrome de células de Sertoli em que se confirmou na biópsia testicular de tratamento a ausência total de células germinativas, e os casos com paragem em meiose em que se confirmou o bloqueio da espermatogénese no estadio de espermatócito primário (meiose I), foram designados de síndromes completos.

Dos pacientes com síndrome de células de Sertoli, 9/91 (9.9%) apresentaram microdeleções na região AZF, 1 (1.1%) AZFa, 1 (1.1%) AZFb, 1 (1.1%) AZFa+b, 5 (5.5%) AZFc, e 1 (1.1%) AZFb+c (6/91, 6.6% em AZFc). Dos 9 casos com microdeleções em AZF, 2 apresentaram um quadro incompleto de síndrome de células de Sertoli na biópsia testicular de tratamento, todos com microdeleções em AZFc.

Deste modo, o prognóstico que podia ser oferecido aos pacientes antes da biópsia testicular de tratamento seria: 16.5% (15/91) em geral, 15.1% (13/86) nos casos sem microdeleções em AZFc, e de 40% (2/5) nos casos com microdeleções em AZFc.

Dos pacientes com paragem da maturação em meiose I, 12/54 (22.2%) apresentaram microdeleções na região AZF, 11 (20.4%) em AZFc e 1 (1.9%) em AZFa+b. Dos 12 casos com microdeleções em AZF, 10 apresentaram um quadro incompleto de paragem em meiose na biópsia testicular de tratamento. Dos 10 casos com microdeleção em AZF e quadro de incompleto de paragem em meiose, 9 casos apresentaram microdeleções AZFc. Deste modo, o prognóstico que podia ser oferecido aos pacientes antes da biópsia testicular de tratamento seria: 53.7% (29/54) em geral, 44.2% (19/43) nos casos sem



microdeleções em AZFc, e de 81.8% (9/11) nos casos com microdeleções em AZFc.

Dos pacientes com hipoespermatoogénese, 5/78 (6.4%) apresentaram microdeleções na região AZF, 2 (2.6%) em AZFc, 2 (2.6%) em AZFa, e 1 (1.3%) em AZFa+b. Neste caso, como todos os pacientes tiveram uma biópsia testicular de tratamento com sucesso, os aspectos prognósticos associados às microdeleções da região AZFc perdem significado. Mesmo assim, o prognóstico que podia ser oferecido aos pacientes antes da biópsia testicular de tratamento seria: 100% (78/78) em geral, 97.4% (76/78) nos casos sem microdeleções em AZFc, e de 100% (2/2) nos casos com microdeleções em AZFc.

## Discussão

Neste trabalho original, apresentamos a distribuição e o tipo das microdeleções do cromossoma Y na população fértil (n=114) e infértil (n=917) portuguesa, avaliámos a importância das microdeleções do cromossoma Y no diagnóstico e prognóstico da infertilidade masculina, e estabelecemos uma relação entre o tipo de microdeleção e o respectivo quadro testicular para os casos da azoospermia secretora.

Desta grande amostragem da população infértil masculina portuguesa, pudemos verificar que 68.5% (628/917) se devem a causas que alteram a qualidade dos espermatozoides ejaculados, e 31.5% (289/917) se devem a azoospermia. Das alterações seminais, a maioria dos casos (65.1%, 409/628) deve-se a oligozoospermia, seguindo-se as alterações da mobilidade e da morfologia dos espermatozoides (34.9%, 219/628). Considerando apenas a oligozoospermia, a maioria dos casos apresentou a forma severa (47.9%, 196/409), seguindo-se as formas ligeira (27.6%, 113/409) e moderada (24.4%, 100/409). Já na azoospermia, a larga maioria dos casos foi de causa secretora (77.2%, 223/289) em relação às causas obstrutivas (22.8%, 66/289). Para distinguir a azoospermia obstrutiva da azoospermia secretora, o andrologista não deverá confiar nos dados da biópsia testicular nem nos dados moleculares. Este aspecto é crítico sobretudo para a azoospermia obstrutiva (26,27), sendo absolutamente indispensável recorrer ao espermograma (volume e pH diminuídos), ecografia renal (alterações congénitas), ecografia pélvica transrectal (anomalias dos

canais ejaculadores e das vesículas seminais), e ecografia escrotal (anomalias testiculares, dos epidídimos e dos canais deferentes).

As microdeleções do cromossoma Y representam uma das principais causas de origem genética para a interrupção da espermatogénese (2,6,7,20, 21), tendo sido descritas em mais de 5% dos pacientes com infertilidade idiopática (13-19). No entanto, esta frequência aumenta quando se restringe o estudo a populações inférteis seleccionadas, sendo em Portugal de 12% na azoospermia secretora e 4-8% na oligozoospermia severa (6,7). Se a selecção dos pacientes for ainda mais restrita, atingem-se números mais compatíveis com o que seria de esperar caso as microdeleções do cromossoma Y sejam de facto uma causa importante de infertilidade genética, 10-36% no síndrome de células de Sertoli (58% nas formas incompletas), 19-22% na paragem da maturação (30% nas formas incompletas), e 6-8% na hipoespermatoogénese e na oligozoospermia severa (25% se associarmos as microdeleções do DAZ1) (6,7,21). Mesmo assim, é evidente que, ao contrário do esperado, ainda permanecem por esclarecer as causas genéticas da maioria destes síndromes. Este facto sugere a presença na população portuguesa de outro tipo de mutações, presentemente sob investigação, para além do facto que em Portugal é excepcionalmente elevada a taxa de criptorquidia como causa associada da azoospermia secretora.

A localização das microdeleções na região AZF tem sido associada a diferentes histologias testiculares, sendo as microdeleções em AZFc as mais frequentes e as que se associam com um quadro testicular menos grave (13-19,23). Os nossos resultados confirmam esta observação, uma vez que a região AZFc foi a mais frequentemente deletada, encontrando-se maioritariamente associada com as formas menos graves (incompletas) do síndrome de células de Sertoli e da paragem da maturação, com a hipoespermatoogénese, e a oligozoospermia severa.

A análise das microdeleções foi também sugerida como um potencial factor de prognóstico na taxa de sucesso de recuperação de espermátides ou espermatozoides na biópsia testicular de tratamento (2,4,22). Apesar da histopatologia testicular ainda representar o principal factor predictivo (22), demonstramos com o presente trabalho que a probabilidade de recuperação de espermátides ou espermatozoides na biópsia testicular de tratamento



é significativamente melhorada com a informação adicional do estudo molecular do cromossoma Y, sendo de 100% na hipoespermatoogénese, 82% na paragem da maturação e de 40% no síndrome de células de Sertoli se o paciente apresentar em simultâneo uma microdeleção AZFc ou DAZ1. Do mesmo modo, na ausência de microdeleções AZFc ou DAZ1, o prognóstico piora substancialmente, sendo de 44% na paragem da maturação e de 15% no síndrome de células de Sertoli.

A explicação para este facto aparentemente contraditório, em que a presença de uma mutação melhora o prognóstico, é a seguinte. As microdeleções de toda a subregião AZFa causam um síndrome de células de Sertoli, ao impedirem a diferenciação das células germinais (5). As microdeleções extensas da subregião AZFb causam paragem da maturação em espermatócito primário (meiose I), por interferirem com a meiose (7). No entanto, as microdeleções da subregião AZFc ou do gene DAZ1 interferem apenas com a diferenciação dos espermatozóides, pelo que inicialmente apenas condicionam uma hipoprodução de gâmetas (6,20,21).

No entanto, na população infértil portuguesa observamos uma ausência flagrante de microdeleções extensas de AZFa e de AZFb, pelo que este resultado surpreendente está actualmente em estudo de modo a se caracterizar quais as causas genéticas responsáveis por estes síndromes em Portugal (para além da criptorquidia frequentemente associada à azoospermia secretora). Uma outra conclusão do presente trabalho é a de que muitos dos casos com síndrome de células de Sertoli e com paragem em meiose não correspondem às formas completas clássicas, mas derivam do agravamento progressivo de uma situação inicial mais benigna, a hipoespermatoogénese. Isto explica a grande prevalência das formas incompletas e as taxas elevadas de microdeleções AZFc ou DAZ1 encontradas naqueles casos. Esta observação obriga a decisões clínicas fundamentais: (a) todo o paciente com oligozoospermia severa deve rapidamente criopreservar 2 amostras seminais para protecção da fertilidade futura, uma vez que poderá evoluir para azoospermia; (b) a presença de um síndrome de células de Sertoli ou de uma paragem da maturação em meiose, não retira ao paciente a capacidade de conter um foco de espermátides/espermatozóides algures no testículo; (c) o andrologista deverá sempre efectuar uma biópsia testicular

bilateral de muito baixo volume para diagnóstico anatomopatológico e associadamente pedir o estudo molecular do cromossoma Y para a região AZF (sub-regiões AZFa, AZFb e AZFc) e para as cópias do gene DAZ (DAZ1, DAZ2, DAZ3 e DAZ4), sendo estas últimas apenas efectuadas na ausência de microdeleção AZFc; (d) com base na biópsia de diagnóstico e no estudo molecular do cromossoma Y, o andrologista poderá então fornecer ao paciente um prognóstico de sucesso na biópsia testicular, múltipla e bilateral, de tratamento, recorrendo às taxas apresentadas no presente trabalho.

## Agradecimentos

A presente investigação foi essencialmente realizada por Cristina Ferrás sob orientação de Susana Fernandes e Mário Sousa. Na ampla amostra de pacientes, participaram no trabalho molecular do cromossoma Y Paula Costa, Joana Marques e Filipa Carvalho, nos cariótipos Cláudia Alves, Maria João Pinho e Carolina Almeida, no estudo andrológico e na biópsia testicular Luís Ferrás, na preparação biológica das biópsias testiculares Joaquina Silva, Paulo Viana, Sónia Sousa e Ana Gonçalves, e no recrutamento e estudo dos pacientes Alberto Barros. Esta investigação foi parcialmente subsidiada pela FCT (36363/99, 43462/01; 35231/99, 42812/01, 48376/02; UMIB).

## Bibliografia

1. Bh asin S, de Kretser DM, Baker HWG. Clinical review. Pathophysiology and natural history of male infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1994; 78: 1525-1529.
2. Sousa M, Fernandes S, Barros A. Os genes e o homem infértil. In: Alexandre Moreira (ed). *Andrologia Clínica*. 1ª Edição. Porto: Sociedade Portuguesa de Andrologia; 2000, pp. 195-222.
3. Alves C, Carvalho F, Cremades N, Sousa M, Barros A. Unique (Y; 13) translocation in a male with oligozoospermia. *Cytogenetic and molecular studies*. *Eur J Hum Genet* 2002; 10: 467-474.
4. Sousa M, Fernandes S, Barros A. Prognostic factors for successful testicle spermatid retrieval. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 166: 37-43.
5. Kamp C, Huellen K, Fernandes S, Sousa M, Schlegel PN, Mielnik A, Kleiman S, Yavetz H, Krause W, Kupker W, Johannisson R, Schulze W, Weidner W, Barros A, Vogt PH. High deletion frequency of the complete AZFa sequence occurs only in men with Sertoli-cell-only-syndrome. *Mol Hum Reprod* 2001; 7: 987-994.

6. Fernandes S, Huellen K, Gonçalves J, Dukal H, Zeisler J, De Meyts ER, Skakkebaek NE, Habermann B, Krause W, Sousa M, Barros A, Vogt PH. High frequency of *DAZ1/DAZ2* gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Mol Hum Reprod* 2002; 8: 286-298.
7. Ferrás C, Fernandes S, Marques CJ, Carvalho F, Alves C, Silva J, Sousa M, Barros A. AZF and DAZ gene copy specific deletion analysis in maturation arrest and Sertoli cell only syndrome. *Mol Hum Reprod* 2004; 10: 755-761.
8. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976; 34: 119-124.
9. Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown LG, Beer-Romero P, Bogan JS, Page DC. The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 1992; 258: 52-59.
10. Vogt PH, Chandley AC, Hargreave TB, Keil R, Ma K, Sharkey A. Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum Genet* 1992; 89: 491-496.
11. Ma K, Inglis JD, Sharkey A, Bickmore WA, Hill RE, Prosser EJ, Speed RM, Thomson EJ, Jobling M, Taylor K, Wolfe J, Cooke H J, Hargreave TB, Chandley AC. A Y chromosome gene family with RNA-Binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell* 1993; 75: 1287-1295.
12. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Köhn FM, Schill WB, Farah S, Ramos C, Hartmann M, Hartschuh W, Meschede D, Behre HM, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Gröne H-J, Jung A, Engel W, Haidl G. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different sub-regions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 933-943.
13. Reijo R, Lee T-Y, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, Rozen S, Jaffe T, Straus D, Hovatta O, de la Chapelle A, Silber S, Page DC. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet* 1995; 10: 383-393.
14. Reijo R, Alagappan RK, Patrizio P, Page DC. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet* 347; 1996a: 1290-1293.
15. Grimaldi P, Scarponi C, Rossi P, March MR, Fabbri A, Isidori A, Spera G, Krausz C, Geremia R. Analysis of Yq microdeletions in infertile males by PCR and DNA hybridization techniques. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 1116-1121.
16. Ferlin A, Moro E, Garolla A, Foresta C. Human male infertility and Y chromosome deletions: role of the AZF-candidate genes DAZ, RBM and DFFRY. *Hum Reprod* 1999; 14: 1710-1716.
17. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome micro-deletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev* 2001; 22: 226-239.
18. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterston RH, Wilson RK, Silber S, Oates R, Rozen S, Page DC. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet* 2001; 29: 279-286.
19. Vogt PH. Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Mol Hum Reprod* 1998; 4: 739-744.
20. Vogt PH, Fernandes S. Polymorphic DAZ gene family in polymorphic structure of AZFc locus: artwork or functional for human spermatogenesis? *Acta Pathol Microbiol Immunol Scandinav, APMIS* 2003; 111: 115-127.
21. Fernandes S, Paracchini S, Meyer LH, Florida G, Tyler-Smith C, Vogt PH. A large AZFc deletion removes DAZ3/DAZ4 and nearby genes from men in Y haplogroup N. *Am J Hum Genet* 2004; 74: 180-187.
22. Sousa M, Cremades N, Silva J, Oliveira C, Teixeira da Silva J, Viana P, Ferrás L, Barros A. Predictive value of testicular histology in secretory azoospermic subgroups and clinical outcome after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatids. *Hum Reprod* 2002; 17: 1800-1810.
23. Edwards RG, Bishop CE. On the origin and frequency of Y chromosome deletions responsible for severe male infertility. *Mol Hum Reprod* 1997; 3: 549-554.
24. Carvalho F, Sousa M, Fernandes S, Silva J, Saraiva MJ, Barros A. Preimplantation genetic diagnosis for familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Prenatal Diagnosis* 2001; 21: 1093-1099.
25. Alves C, Sousa M, Silva J, Barros A. Preimplantation genetic diagnosis using FISH for carriers of robertsonian translocations: the portuguese experience. *Prenatal Diagnosis* 2002; 22: 1153-1162.
26. Grangeia A, Niel F, Ardalán A, Carvalho F, Fernandes S, Girodon E, Silva J, Sousa M, Barros A. Characterization of CFTR mutations and IVS8-T variants in Portuguese patients with CAVD. *Hum Reprod* 2004; 11: (in press).
27. Grangeia A, Carvalho F, Fernandes S, Silva J, Sousa M, Barros A. A novel missense mutation P1290S at exon 20 of the CFTR gene in a portuguese patient with congenital bilateral absence of the vas deferens. *Fertil Steril* 2005; 2: (in press).