



**CAROLINA
REIS
DE SENA
GONÇALVES**

**Microdeleções no cromossoma Y em azoospermia
não obstrutiva e oligozoospermia severa**

DECLARAÇÃO

Declaro que este relatório é integralmente da minha autoria, estando devidamente referenciadas as fontes e obras consultadas, bem como identificadas de modo claro as citações dessas obras. Não contém, por isso, qualquer tipo de plágio quer de textos publicados, qualquer que seja o meio dessa publicação, incluindo meios eletrônicos, quer de trabalhos acadêmicos.



**CAROLINA
REIS
DE SENA
GONÇALVES**

**Microdeleções no cromossoma Y em azoospermia
não obstrutiva e oligozoospermia severa**

Dissertação apresentada à Universidade de Aveiro para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do grau de Mestre em Biologia Molecular e Celular, realizada sob a orientação científica do Doutor Mário Manuel da Silva Leite de Sousa, Médico, sub-especialidade em Medicina da Reprodução laboratorial, Senior Clinical Embryologist – ESHRE, Professor Catedrático de Biologia Celular no Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto e sob a co-orientação da Doutora Maria de Lourdes Gomes Pereira, Professora associada com agregação do departamento de Biologia na Universidade de Aveiro.

o júri

presidente

Prof. Doutor António Carlos Matias Correia
Professor Catedrático do departamento de Biologia, Laboratório de Microbiologia,
Universidade de Aveiro

Prof. Doutor Mário da Silva Leite de Sousa
Professor Catedrático do departamento de Microscopia, Laboratório de Biologia Celular,
ICBAS-UP

Prof.Doutor Ricardo Jorge Pereira Córdova Marcos
Professor auxiliar, Laboratório de Histologia e Embriologia,
ICBAS-UP

Agradecimentos

Esta área é dedicada àqueles que, de uma forma ou de outra, direta ou indiretamente contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível. Não sendo viável nomeá-los a todos, há no entanto alguns a quem não posso deixar de manifestar o meu apreço e agradecimento sincero.

Os meus mais sinceros agradecimentos ao meu orientador Prof. Mário Sousa, por quem tenho uma grande admiração na qualidade excelente professor e ser humano que é. Agradeço pelo apoio incondicional, compreensão e receptividade, pelos bons conselhos e orientações, pela motivação que me incutiu e pelo crescimento que me proporcionou durante este período.

À minha coorientadora, Prof^a. Maria de Lourdes, pela disponibilidade em ajudar e interesse em acompanhar e participar em todo este trabalho.

Ao Prof. Alberto Barros pela cordialidade e disponibilidade com que me recebeu no Centro de genética da reprodução Prof. Alberto Barros, bem como a toda a prestável equipa, que apesar do pouco tempo que tinham, sempre se mostraram disponíveis para me ajudar no desenvolvimento deste trabalho.

Ao Prof. Eduardo Rocha pela paciência e pelos ensinamentos práticos e conselhos sábios que me deu para o futuro.

Quero deixar uma palavra de reconhecimento à minha família, em especial ao meu pai, a pessoa a quem agradeço simplesmente por tudo o que sou hoje, e que me deu boas ferramentas e me ensinou a lutar para alcançar os meus objetivos, para poder chegar até aqui. Pelo amor incondicional e por me incentivar, não me deixando desanimar nos piores momentos, reconhecendo como ninguém os meus anseios e medos, sempre me fez ver que com esforço e trabalho tudo se consegue. À Carla, uma pessoa muito especial, a quem devo muito, por sempre me motivar perante os desafios, pela força, pelo amor e bons conselhos e pela forma como ao longo de todos estes anos, tão bem, soube ajudar-me e educar-me.

À minha irmã Jéssica, que apesar de ainda ser pequenina é o meu grande pilar, essencial na minha vida, pelo amor e pela confiança que sempre depositou em mim quando me disse tantas vezes “Tu consegues”! Ao Rui por todo o apoio, pela paciência e compreensão durante esta etapa. Aos meus amigos e à equipa do laboratório de Biologia celular, departamento de microscopia do ICBAS pela ajuda e motivação.

palavras-chave

Injeção intracitoplasmática de espermatozoides, resultados de recém-nascidos, azoospermia não-obstrutiva, oligozoospermia severa, extração testicular de espermatozoides, microdeleções no cromossoma Y

resumo

O objetivo do presente trabalho é apresentar os resultados clínicos e embriológicos de pacientes com microdeleções no cromossoma Y, tratados por injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), através do uso de espermatozoides testiculares a fresco (TESE) ou criopreservados e descongelados (TESE-C), e através do uso de espermatozoides do ejaculado (EJAC). A originalidade deste trabalho reside nas comparações efetuadas entre os diferentes tipos de microdeleções no cromossoma Y (AZFa, AZFb e AZFc) e os tratamentos efetuados, com os detalhes dos resultados demográficos, de estimulação, embriológicos, clínicos e dos recém-nascidos (NB). Dos 128 pacientes com microdeleções no cromossoma Y, 18 realizaram ICSI com espermatozoides do ejaculado e 65 realizaram TESE. Houve 51 ciclos de tratamentos TESE e 43 ciclos de tratamento TESE-C, com nascimento de 19 NB (2 em AZFa/TESE-C; 12 em AZFc/TESE; 5 em AZFc/TESE-C). Dos 29 ciclos EJAC houve nascimento de 8 NB (em AZFc). Nos ciclos TESE e EJAC não houve diferenças significativas nos parâmetros clínicos e embriológicos. Nos ciclos TESE-C, houve uma taxa de maturação de ovócitos, taxa de clivagem embrionária e média do número de embriões transferidos significativamente mais baixa em AZFb, uma média do número de ovócitos mais alta e uma taxa de fertilização mais baixa em AZFc. Em conclusão, embora os pacientes com microdeleção AZFc apresentem uma alta taxa de recuperação de espermatozoides e resultados clínicos aceitáveis, casos com microdeleções AZFa e AZFb apresentaram um prognóstico pobre. Devido à hereditariedade das microdeleções relatada, os pacientes devem ser informados acerca das consequências da infertilidade no recém-nascido e da possibilidade de utilizarem o diagnóstico genético de pré-implantação para a seleção do sexo feminino.

keywords

Intracytoplasmic sperm injection, newborn outcomes, non-obstructive azoospermia, severe oligozoospermia, testicular sperm extraction, Y chromosome microdeletions

abstract

The aim of the present work was to present the outcomes of patients with Y-chromosome microdeletions treated by intracytoplasmic sperm injection (ICSI), either using fresh (TESE) or frozen-thawed (TESE-C) testicular sperm, and ejaculated sperm (EJAC). The originality of this work resides in the comparisons between the different types of Y-microdeletions (AZFa, AZFb, AZFc) and treatments, with detailed demographic, stimulation, embryological, clinical and newborn (NB) outcomes. Of 128 patients with Y-microdeletions, 18 performed ICSI with ejaculated sperm and 65 went for TESE. There were 51 TESE treatment cycles and 43 TESE-C treatment cycles, with birth of 19 NB (2 in AZFa/TESE-C; 12 in AZFc/TESE; 5 in AZFc/TESE-C). Of the 29 EJAC cycles there was birth of 8 NB (in AZFc). In TESE and EJAC cycles there were no significant differences in embryological and clinical parameters. In TESE-C cycles, there was a significant lower oocyte maturity rate, embryo cleavage rate and mean number of embryos transferred in AZFb, and a higher mean number of oocytes and lower fertilization rate in AZFc. In conclusion, although patients with AZFc microdeletions presented a high testicular sperm recovery rate and acceptable clinical outcomes, cases with AZFa and AZFb microdeletions presented a poor prognosis. Due to the reported heredity of microdeletions, patients should be informed about the infertile consequences on the newborn and the possibility of using preimplantation genetic diagnosis for female sex selection.

Índice:

1.Introdução	1
1.1 Espermatogénese.....	3
1.2 O espermatozoide.....	8
1.3 Infertilidade.....	10
1.3.1 Definição.....	10
1.3.2 Causas de infertilidade masculina.....	11
1.3.3 Tratamentos de infertilidade masculina.....	11
A. Inseminação intra-uterina (IIU).....	12
B. Fertilização <i>in vitro</i> (FIV).....	12
C. Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).....	13
D. Recuperação de espermatozoides.....	15
E. Diagnóstico genético pré implantação (DGPI).....	16
F. Criopreservação de tecidos germinais, gâmetas e embriões.....	17
1.4 Cromossoma Y.....	18
1.4.1 Anomalias do cromossoma Y.....	22
1.4.1.1. AZFa.....	25
1.4.1.2 AZFb.....	27
1.4.1.3 AZFc.....	33
a) Os genes DAZ.....	35
2.Objectivo	39
3.Materiais e métodos	43
3.1 Considerações éticas.....	45
3.2 Seleção de pacientes.....	45
3.3 Protocolos de estimulação.....	46
3.4 Colheita de espermatozoides a partir do ejaculado.....	46
3.5 Biopsia testicular.....	47
3.6 Preparação dos espermatozoides provenientes do ejaculado.....	48
3.7 Criopreservação de espermatozoides testiculares.....	48
3.8 Manipulação de gâmetas e embriões.....	48
3.9 Suplementação lútea.....	49
3.10 <i>Screening</i> do cromossoma Y.....	50
3.11 Análise estatística.....	51
4.Resultados	53

4.1 Cariótipos anormais.....	55
4.2 Casos específicos de microdeleções no cromossoma Y.....	56
4.3 Características hormonais dos pacientes que realizaram TESE.....	58
4.4 Relações entre SOZ/SAZ e o tipo de microdeleção no cromossoma Y.....	61
4.5 Relações entre o fenótipo testicular e o tipo de microdeleção no cromossoma Y.....	62
4.6 Características de estimulação de pacientes que fizeram tratamento.....	62
4.7 Resultados clínicos.....	65
4.7.1 Resultados clínicos com espermatozoides testiculares a fresco (TESE).....	67
4.7.2 Resultados clínicos com espermatozoides testiculares criopreservados descongelados (TESE-C).....	69
4.7.3 Resultados clínicos com espermatozoides do ejaculado (EJAC).....	73
5. Discussão.....	77
5.1 Microdeleções AZFa.....	79
5.2 Microdeleções AZFb.....	80
5.3 Microdeleções AZFc.....	82
5.4 Em relação as características hormonais de pacientes.....	82
5.5 Em relação aos parâmetros de estimulação.....	83
5.6 Em relação aos resultados clínicos.....	83
6. Conclusões.....	85
6.1 Originalidade do trabalho.....	87
6.2 Principais elações.....	87
6.3 Implicações clínicas.....	87
7. Bibliografia.....	89
8. Anexos.....	107

Lista de Ilustrações:

Figura 1: Regulação endócrina na espermatogênese.....	4
Figura 2: Ciclo espermatogênico dividido em 3 fases (espermatocitogênese, maturação de espermatócitos e espermiogênese), SGAd (Espermatogônia do tipo A denso), SGAp (Espermatogônia do tipo A pálido), SGB (Espermatogônia do tipo B), SC1 (Espermatócito primário), SC2 (Espermatócito secundário), Sa (Espermatídeo redondo) a (acrossoma), n (núcleo), Sd (Espermatídeo alongado), Sz (espermatozoide).....	6
Figura 3: Estrutura do espermatozoide, Cabeça: membrana citoplasmática (c), vesícula acrosômica (VA), região pós-acrosômica (PAR) e anel posterior (PR). Peça intermediária (PI): centríolo proximal (PC), colunas estriadas (SC) fibras densas externas (ODF), axonema (Ax) e bainha mitocondrial (M). Peça principal proximal (PPP): inicia-se após o annulus (An) e contém o Ax, as ODF e os anéis da bainha fibrosa (FS). Peça principal distal (PPD): só se observa o Ax e a FS. Peça terminal (PT): apenas contém o Ax.....	10
Figura 4: Microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides, 4A- Ovócito com células do cumulus, 4B- ovócito após desnudação sem, células do cúmulo, apenas com zona pelúcida e 1º glóbulo polar, 4C- imobilização do espermatozoide, 4D, 4E e 4F- Microinjeção do espermatozoide no citoplasma do ovócito, 4G e 4H- ovócito microinjetado com espermatozoide, 4I- formação de 2 pronúcleos e do 2º glóbulo polar, 4J- divisão em 4 blastômeros. (Retirado de Sá <i>et al.</i> , 2007).....	15
Figura 5: Biópsia embrionária para DGPI. (Retirado Sá <i>et al.</i> , 2007).....	17
Figura 6: Porção de MSY que se estende desde o limite proximal de Yp até ao limite proximal de Yq (incluindo a região heterocromática). Representação das 3 classes de sequências eucromáticas (X-transposto, X-degenerado e X-amplicónico). (Modificado de Skaletsky <i>et al.</i> , 2003).....	20
Figura 7: Desenho esquemático do cromossoma Y, incluindo os 7 intervalos em que está subdividido, regiões pseudoautosômicas, centrômero, braço longo (Yq), braço curto (Yp), regiões não recombinantes (NRY), heterocromatina e eucromatina.....	21
Figura 8: Desenho esquemático do cromossoma Y segundo diferentes autores em diferentes datas, inicialmente (em 1976) Tiepolo & Zuffardi caracterizam o cromossoma Y e identificam a região do braço longo (Yq11.2) como tendo fatores que controlam a espermatogênese. Mais tarde (1996) Vogt distinguiu esse fator como fator de azoospermia (AZF) repartido por AZFa, AZFb e AZFc. Recentemente está caracterizado todo o cromossoma Y e estão identificados os genes pertencentes às diferentes regiões tanto no braço curto (Yp) como no braço longo (Yq).....	23
Figura 9: Diferentes deleções na região AZF do cromossoma Y.....	24
Figura 10: Região AZFa composta por 2 blocos de sequências retrovirais (HERV15yq1 e HERV15yq2).....	25
Figura 11: Região AZFb composta pelos palíndromos P5 e P1 proximal, deleção AZFbc constituída pelos palíndromos P5 e P1 distal ou pelos palíndromos P4 e P1 distal.....	28

Figura 12: Região AZFc constituída pelos palíndromos P1, P2 e P3 distal, mais especificamente deleções em AZFc são denominadas por deleções b2/b4 pois abrangem o espaço ocupado entre estes dois amplicões. E deleções gr/gr abrangem os amplicões g1/r1/r2 e g2/r3/r4.....	33
Figura 13: Distribuição de deleções na região AZF na amostra de pacientes deste estudo. As deleções AZFab e AZFabc e AZFa foram classificadas como AZFa. Tendo em conta que deleções AZFa= AZFa+ AZFab+ AZFabc; deleções AZFb= AZFb+ AZFbc; e deleções AZFc=AZFc. No total 13.3% dos pacientes tinham deleções na região AZFa, 20.3% tinham deleções na região AZFb e os restantes 66.4% apresentavam deleções na região AZF.....	55
Figura 14: Estrutura palindrômica das regiões AZFb e AZFc.....	58
Figura 15: Esquema representativo da seleção e do plano de tratamento dos pacientes e os resultados obtidos. SAZ-azoospermia secretora; SOZ-oligozoospermia severa; TESE-biopsia testicular; Sz- espermatozoides; +Sz- com recuperação de espermatozoides; ICSI- microrinjeção intracitoplasmática de espermatozoides; CP- gravidez clínica.....	65

Lista de Gráficos:

- Gráfico 1:** Patologias dos pacientes (Oligozoospermia severa (SOZ) ou Azoospermia secretora (SAZ)) com microdeleção na região AZFa, AZFb e AZFc.....61
- Gráfico 2:** Fenótipo testicular (Síndrome de células de Sertoli (SCOS), Paragem de maturação (MA), Hipoespermatogénese (HP)) dos pacientes com microdeleção na região AZFa, AZFb e AZFc.....62
- Gráfico 3:** Resultado do teste estatístico “ANOVA de uma via” para a Dose total de Gonadotrofina administrada a mulheres, dos 3 grupos de microdeleções, cujos parceiros realizaram tratamento com TESE.....63
- Gráfico 4:** Resultado do teste estatístico “ANOVA de uma via” para os dias de estimulação aos quais foram sujeitas as mulheres, dos 3 grupos de microdeleções, cujos parceiros realizaram tratamento com TESE.....63
- Gráfico 5:** Resultado do teste estatístico “ANOVA de uma via” para a Idade das mulheres, dos 3 grupos de microdeleções, cujos parceiros realizaram tratamento com TESE-C.....64
- Gráfico 6:** Resultado do teste estatístico “ANOVA de uma via” para Quantidade de Estradiol administrado mulheres, dos 3 grupos de microdeleções, cujos parceiros realizaram tratamento com TESE-C. Foi efetuada a transformação para o logaritmo dos valores para termos uma análise mais precisa.....64
- Gráfico 7:** Resultado do teste estatístico “ANOVA de uma via” para a Quantidade de HCG administrado mulheres, dos 3 grupos de microdeleções, cujos parceiros realizaram tratamento com TESE-C. Foi efetuada a transformação para o logaritmo dos valores para termos uma análise mais precisa.....65
- Gráfico 8:** Resultados clínicos (número de recém-nascidos (NB), numero de pacientes que efetuaram biopsia e posterior congelação dos espermatozoides (TESE-C), numero de pacientes que efetuaram biopsia (TESE), numero de ciclos aos quais foram submetidos os pacientes e o numero de pacientes no total) de pacientes com microdeleção no cromossoma Y.....66

Lista de tabelas:

- Tabela 1:** Painel de microdeleções no cromossoma Y que foi avaliado. Casos de microdeleções AZFa e AZFb com recuperação de espermatozoides testiculares ou espermatozoides do ejaculado. ND- não disponível na época; EJAC- espermatozoides do ejaculado; HP- azoospermia secretora devido a hipoespermatogénese; PM- azoospermia secretora devido à paragem de maturação.....57
- Tabela 2:** Casos específicos de microdeleções na região AZFa do cromossoma Y e com recuperação de espermatozoides.....58
- Tabela 3:** Casos específicos de microdeleções na região AZFb do cromossoma Y e com recuperação de espermatozoides.....58
- Tabela 4:** Dados clínicos de pacientes com microdeleção no cromossoma Y e submetidos a TESE (Testicular Sperm Extraction). Os valores são representados da seguinte forma: média ± desvio padrão (mínimo-máximo). O intervalo normal dos valores de **FSH** é de: 0.7-11.1 IU/L; O intervalo normal dos valores de **LH** é: 0.8-7.6 IU/L; O intervalo normal dos valores de **Testosterona** é de: 2.45-16 ng/ml. ^aDiferenças Significativas ($p < 0.05$). sz- Espermatozoides.....60
- Tabela 5:** Resultados clínicos e embriológicos de pacientes com microdeleção no cromossoma Y e que foram submetidos a TESE. Comparações: a, AZFa vs AZFb; b, AZFa vs AZFc; c, AZFb vs AZFc. Valores em :n, taxa, média ± desvio padrão, min-máx. ^aDiferenças significativas ($p < 0.05$); NS, não significativo.....68
- Tabela 6:** Resultados de recém-nascidos de pacientes com microdeleção no cromossoma Y e que foram submetidos a TESE. Termo- $\geq 37 - \leq 42$ (semanas); Pré-Termo- $< 37 - \geq 32$; Muito Pré-Termo- $< 32 - \geq 28$; Extremamente Pré-Termo- < 28 ; Peso Normal- $\geq 2500 - \leq 4000$ (gramas); Baixo peso- $< 2500 - \geq 1500$; Muito baixo peso- $< 1500 - \geq 1000$; Extremamente baixo peso- < 1000 . Comparações: a, AZFa vs AZFb; b, AZFa vs AZFc; c, AZFb vs AZFc. Valores em: n, taxa, média ± desvio padrão, min-máx. ^aDiferenças significativas ($p < 0.05$); NS, não significativo.....69
- Tabela 7:** Resultados clínicos e embriológicos de pacientes com microdeleção no cromossoma Y e que foram submetidos a TESE e posterior congelamento e descongelamento dos espermatozoides (TESE-C). Comparações: a, AZFa vs AZFb; b, AZFa vs AZFc; c, AZFb vs AZFc. Valores em :n, taxa, média ± desvio padrão, min-máx.^aDiferenças significativas ($p < 0.05$); NS, não significativo.....71
- Tabela 8:** Resultados de recém-nascidos de pacientes com microdeleção no cromossoma Y e que foram submetidos a TESE e posterior congelamento e descongelamento dos espermatozoides (TESE-C). Termo- $\geq 37 - \leq 42$ (semanas); Pré-Termo- $< 37 - \geq 32$; Muito Pré-Termo- $< 32 - \geq 28$; Extremamente Pré-Termo- < 28 ; Peso Normal- $\geq 2500 - \leq 4000$ (gramas); Baixo peso- $< 2500 - \geq 1500$; Muito baixo peso- $< 1500 - \geq 1000$; Extremamente baixo peso- < 1000 . Comparações: a, AZFa vs AZFb; b, AZFa vs AZFc; c, AZFb vs AZFc. Valores em: n, taxa, média ± desvio padrão, min-máx. ^aDiferenças significativas ($p < 0.05$); NS, não significativo.....72
- Tabela 9:** Resultados clínicos e embriológicos de pacientes com microdeleção no cromossoma Y e que obtiveram espermatozoides do ejaculado. Comparações: a, AZFa vs AZFb; b, AZFa vs AZFc; c, AZFb vs AZFc. Valores em :n, taxa, média ± desvio padrão, min-máx.

^aDiferenças significativas ($p < 0.05$); NS, não significativo.....74

Tabela 10: Resultados de recém-nascidos de pacientes com microdeleção no cromossoma Y e que obtiveram espermatozoides do ejaculado. Termo- ≥ 37 - ≤ 42 (semanas); Pré-Termo- < 37 - ≥ 32 ; Muito Pré-Termo- < 32 - ≥ 28 ; Extremamente Pré-Termo- < 28 ; Peso Normal- ≥ 2500 - ≤ 4000 (gramas); Baixo peso- < 2500 - ≥ 1500 ; Muito baixo peso- < 1500 - ≥ 1000 ; Extremamente baixo peso- < 1000 . Comparações: a, AZFa vs AZFb; b, AZFa vs AZFc; c, AZFb vs AZFc. Valores em: n, taxa, média \pm desvio padrão, min-máx.

^aDiferenças significativas ($p < 0.05$); NS, não significativo.....75

Lista de abreviaturas:

ABP - Proteína ligadora de androgénios
AMP - Adenosina Monofosfato
AZF – Fator de azoospermia
BLR – Taxa de blastocistos
cAMP - Adenosina Monofosfato cíclico
COC – Complexo *Cumulus-oocito*
CP- Gravidez clínica
CS - Células de Sertoli
Cys – Cisteína
DGPI – Diagnostico genético pré implantação
DNP – Diagnóstico pré-natal
E2- Estradiol
ECR – Taxa de clivagem embrionária
EJAC – Espermatozoides do ejaculado
ETC – Ciclo de transferência de embriões
FISH – Hibridização *in situ* Fluorescente
FIV – Fertilização *in vitro*
FR – Taxa de fertilização
FS – Bainha fibrosa
FSH - Hormona folículo-estimulante
GnRH - Hormona libertadora de gonadotrofinas
H/A – Hipotrófico/ Normal
H/H – Hipotrófico/ Hipotrófico
HCG – Gonadotrofina coriônica humana
His – Histidina
HP – Hipoespermatogénese
ICM – Massa celular interna
ICSI – Injeção intracitoplasmática de espermatozoides
IIU – Inseminação intra-uterina
IR – Taxa de implantação
LBDR – Taxa de nados vivos
LH - Hormona Luteinizante
MESA - micro-aspiração de espermatozoides do epidídimo

MII – Oócitos microinjetados
MSY – Região específica masculina
N/A – Normal/Atrófico
N/H – Normal/ Hipotrófico
N/N – Normal/Normal
NAHR – Recombinação homóloga não alélica
NB – Recém- nascido
NRY – Regiões não recombinantes
OAZ – azoospermia obstrutiva
ODF - Fibras densas externas
OP - Gravidez evolutiva
PAR – região pseudoautossômica
PCR – Reação em cadeia da polimerase
PESA - aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo
PI – Peça intermédia
PM ou MA – Paragem de maturação
PP – Peça principal
PPP – Peça principal proximal
PT – Peça terminal
RBM – zonas de ligação ao ARN
rFSH - Hormona folículo-estimulante recombinante
RMA – Reprodução medicamente assistida
Sa - Espermatídeo redondo
SAZ – Azoospermia secretora (não obstrutiva)
SC1 - Espermatócito primário
SC2 - Espermatócito secundário
SCOS – Síndrome de células de Sertoli
Sd - Espermatídeo alongado
SGAd - Espermatogónia do tipo A denso
SGAp - Espermatogónia do tipo A pálido
SGB - Espermatogónia do tipo B
SHO – síndrome de hiperestimulação ovárica
SOZ – Oligozoospermia severa
STS – Locais de sequência marcados
Sz - Espermatozoide

TEFNA - aspiração testicular de espermatozoides por agulha fina

TESA - aspiração testicular de espermatozoides

TESE – Extração de espermatozoides testiculares

TESE-C – Extração e posterior criopreservação de espermatozoides testiculares

TS - Túbulos seminíferos

VA - Vesícula Acrossômica

Yp – Braço curto do cromossoma Y

Yq – Braço longo do cromossoma Y

ZP – Zona pelúcida

1.Introdução

1.1 Espermatogénese

A espermatogénese humana é um processo biológico dinâmico que ocorre no interior dos túbulos seminíferos (TS), sendo responsável pela diferenciação das espermatogónias (células germinais progenitoras) em espermatozoides maduros (Amann *et al.*, 2008). Este processo ocorre continuamente a partir do momento da puberdade e prossegue durante a maior parte da vida, diminuindo com o envelhecimento. Cada ciclo do epitélio germinativo decorre ao longo de aproximadamente 64 a 74 dias (Heller & Clermont, 1963, 1964; Clermont, 1966).

O epitélio seminífero é composto por dois tipos celulares, as células de Sertoli (CS) e as células germinais. As CS, somáticas, estão aderentes à lâmina basal pela sua região basal, enquanto a extremidade apical se encontra voltada para o lúmen dos TS. Ocupam cerca de 35-40% do volume do epitélio germinal e funcionam como suporte das células germinais (ligadas por junções ocludentes em reentrâncias das CS) (Junqueira & Carneiro, 2004; Weinbauer *et al.*, 2010).

A espermatogénese ocorre nos TS. O ciclo espermatogénico envolve uma complexa interação entre as células dos TS e as do sistema endócrino (Figura 1). Os testículos produzem espermatozoides e segregam a testosterona necessária para o desenvolvimento dos caracteres sexuais primários e secundários. Estas funções estão associadas à estimulação pela hormona luteinizante (LH) e hormona folículo-estimulante (FSH), que têm um papel crucial na diferenciação e proliferação de espermatogónias, desenvolvimento dos espermatócitos na meiose, diferenciação de espermatídeos redondos em espermatídeos alongados e na libertação dos espermatozoides. A secreção da FSH e LH pela hipófise é estimulada pela hormona libertadora das gonadotrofinas (GnRH) sintetizada e segregada pelo hipotálamo. As células mais importantes do compartimento intersticial são as células de Leydig. O testículo humano contém aproximadamente 200×10^6 células de Leydig. A testosterona é secretada pelas células de Leydig sob estimulação da LH (McLachlan, 2000; Weinbauer *et al.*, 2010).

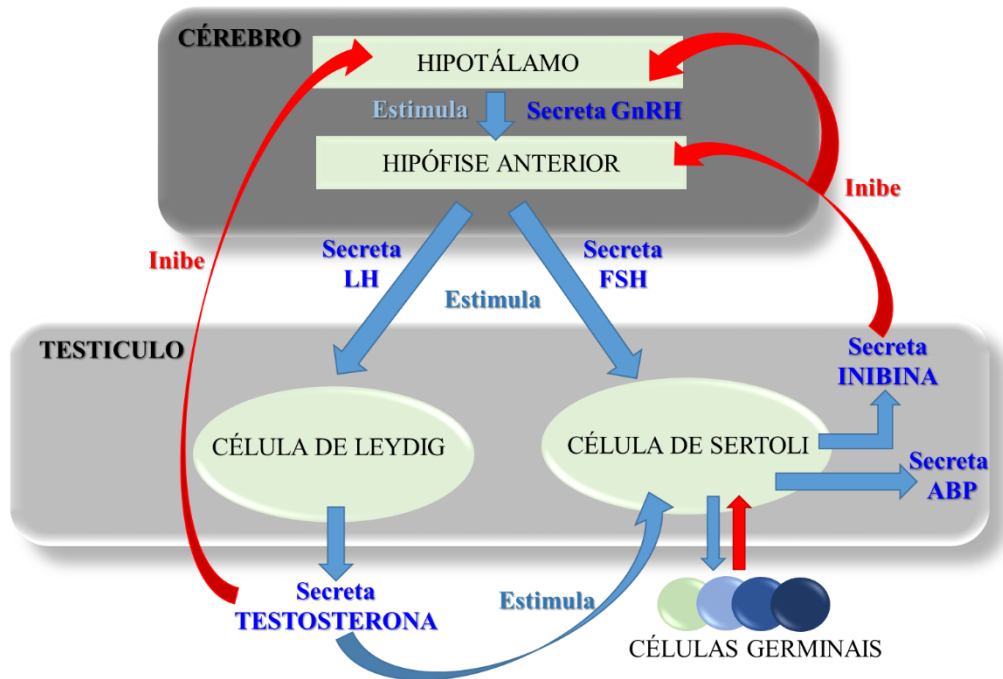


Figura 1: Regulação endócrina na espermatogénese.

A testosterona difunde-se para o interior dos TS, ligando-se às CS (Walker, 2010). Para que a testosterona possa atuar nas células germinais, as CS produzem a proteína ligadora de androgénios (ABP). Os níveis de testosterona intratesticular são 10x mais elevados do que no plasma. Esta hormona inibe a secreção de LH pela hipófise anterior ao agir sobre o hipotálamo diminuindo a secreção de GnRH. Consequentemente à diminuição de secreção de FSH e LH observa-se uma redução da secreção de testosterona pelo testículo (Guyton e Hall, 2002; Weinbauer *et al.*, 2010; Escott *et al.*, 2011). Por outro lado a FSH também está envolvida ativamente nesta regulação. Esta hormona atua nas CS, provocando a estimulação da adenilciclase (AMP) e aumentando a concentração de cAMP, deste modo promovendo a síntese e secreção da proteína ABP. Assim sendo, o efeito da testosterona é também reforçado pela FSH (Junqueira & Carneiro, 2004). Nas CS a testosterona é metabolizada em dihidrotestosterona (DHT) pela actividade da 5 α -redutase testicular e em estradiol por atividade da aromatase testicular. As CS secretam inúmeras outras substâncias de ação local para estimularem, nutrirem e protegerem as células germinativas em desenvolvimento (Junqueira & Carneiro, 2004; Weinbauer *et al.*, 2010). Todo este mecanismo é minuciosamente regulado e conduzido por um mecanismo de feedback negativo para manter o equilíbrio hormonal. Quando não há produção de espermatozoides

pelos TS, a secreção de FSH pela hipófise anterior aumenta. Por outro lado, quando a espermatogênese ocorre a um ritmo excessivamente rápido, a secreção hipofisária de FSH diminui. A causa-efeito deste mecanismo de feedback é uma hormona denominada inibina, uma glicoproteína com um potente efeito inibitório, produzida pelas células de Sertoli. Este efeito proporciona um controle da espermatogênese e simultaneamente atua no controle da secreção de testosterona (Guyton & Hall, 2002). Há uma interação entre as células de Sertoli e células germinativas para manter a produção de inibina B nos testículos. As concentrações de Inibina B em associação com as concentrações de FSH mostram que, em casos de falha espermatogénica mais grave os níveis de Inibina B são mais reduzidos e os valores de FSH são superiores (Frydelund-Larsen *et al.*, 2002).

A espermatogênese pode ser dividida em três fases (Figura 2). Na primeira fase as espermatogónias proliferam e dão origem a espermatócitos e simultaneamente mantêm o seu poder de renovação (espermatocitogénese). A segunda fase envolve os espermatócitos primários e secundários, sujeitos a divisões meióticas que reduzem o número de cromossomas e levam à formação de espermatídeos haploides (meiose). A terceira fase é caracterizada pela complexa citodiferenciação (espermiogénese) de espermatídeos que culmina na formação de espermatozoides maduros que irão ser lançados do epitélio germinativo para o lúmen tubular (espermiacção) (Heller & Clermont, 1964; Clermont 1972; Holstein & Davidoff, 2003; Weinbauer *et al.*, 2010).

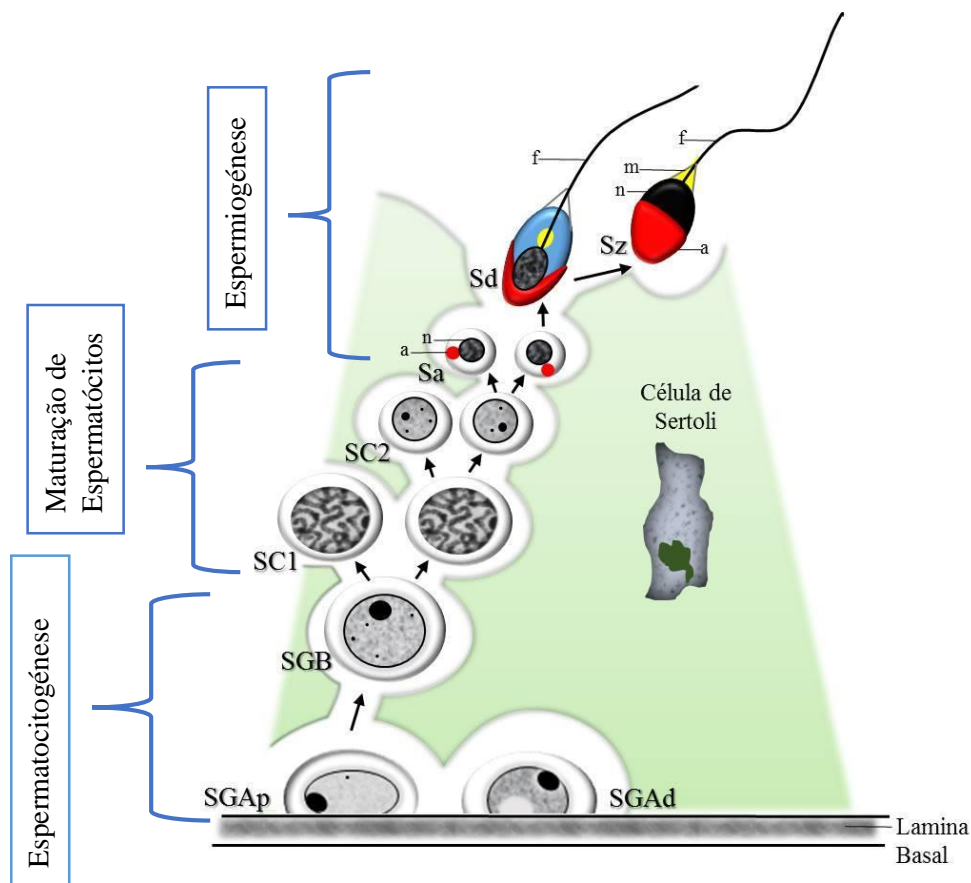


Figura 2: Ciclo espermático dividido em 3 fases (espermocitogênese, maturação de espermatócitos e espermio gênese), SGAd (Espermatogônia do tipo A denso), SGAp (Espermatogônia do tipo A pálido), SGB (Espermatogônia do tipo B), SC1 (Espermatócito primário), SC2 (Espermatócito secundário), Sa (Espermatídeo redondo) a (acrossoma), n (núcleo), Sd (Espermatídeo alongado), Sz (espermatozoide).

O primeiro estágio deste ciclo contempla as espermatogônias encontram-se aderentes à lâmina basal dos TS (O'Donnell *et al.*, 2001). As espermatogônias são classificadas em três categorias, espermatogônias do tipo A denso (SGAd), tipo A pálido (SGAp) e espermatogônias do tipo B (SGB). As espermatogônias SGAd representam as células estaminais testiculares, apresentando uma baixa taxa de proliferação. Possuem um núcleo esférico ou oval com uma massa densa e homogênea de cromatina com uma região pálida no seu centro (Clermont 1963, Clermont 1966). Por mitose, cada SGAd auto-renova-se e origina uma SGAp (Clermont, 1963; Amann, 2008). As espermatogônias SGAp são caracterizadas por um núcleo discóide ou oval contendo cromatina finamente granulada e um ou mais nucléolos anexados ao invólucro nuclear (Clermont, 1966). Depois de sucessivas divisões, quando este tipo celular entra em profase é difícil diferenciá-lo do próximo tipo

celular do ciclo, as SGB (Clermont, 1963). As SGB mantêm um contacto íntimo com a lâmina basal através de um fino prolongamento citoplasmático, apresentam núcleo esférico contendo cromatina granulada, com alguns destes agregados de cromatina densa ligados ao invólucro nuclear (Clermont, 1963; Clermont, 1966). As SGB dividem-se por mitoses sucessivas dando origem a uma nova geração de células designadas espermatócitos primários (SC1). Estes são caracterizados por um núcleo esférico que contém cromatina de textura filamentosa uniformemente distribuída pelo núcleo.

Os SC1 podem ser definidos como células germinativas tetraplóides (46,XY cada cromossoma com 2 cromátídeos: 4N, 2C), resultantes da última cariocinese das espermatogónias, que após a interfase segue os seguintes passos: preleptóteno, leptóteno, zigóteno, paquíteno e diplóteno, metafase-I, anafase-I e telofase-I (Clermont, 1963; Heller & Clermont 1964; Weinbauer *et al.*, 2010). O primeiro passo designado por preleptóteno é caracterizado pela profase da meiose. Os espermatócitos na fase de leptóteno apresentam núcleos com cromossomas evidentes, finamente filamentosos e frisados. Na fase de zigóteno há emparelhamento dos cromossomas homólogos, os núcleos apresentam cromossomas emparelhados e enovelados que se acumulam dos dois lados do núcleo. Seguidamente, na fase de paquíteno, ocorre recombinação homóloga (crossing-over) entre os cromátídeos, há um aumento progressivo do volume nuclear, os cromossomas tornam-se espessos e mais curtos, e torna-se visível um grande nucléolo esférico. Após a fase de diplóteno, os SC1 completam a primeira divisão da meiose para originar espermatócitos secundários (SC2: 2N, 2C) (Heller & Clermont, 1964; De Robertis & De Robertis, 1987). Os SC2 têm núcleos esféricos, cromatina fina e algumas massas densas de cromatina. Depois de uma interfase curta os SC2 sofrem a segunda divisão da meiose, resultando na formação de 2 espermatídeos redondos haplóides (Sa: 1N, 1C) (Clermont, 1972; Holstein & Davidoff, 2003).

A fase que se segue é caracterizada por uma citodiferenciação que consiste em mudanças morfológicas e moleculares acentuadas. Nos espermatídeos recém-formados, que contêm um núcleo esférico localizado centralmente, o núcleo alonga-se e condensa-se formando o espermatídeo alongado (Sd) (as histonas são na sua maioria substituídas por proteínas de transição e finalmente por protaminas, as quais possibilitam uma compactação da cromatina, tendo assim um papel importante na proteção do ADN contra insultos externos, na redução do volume da célula e nas propriedades aerodinâmicas do

espermatozoide), o complexo de Golgi origina a vesícula acrossômica (VA) que adere aos 2/3 apicais do núcleo alongando-se com este, o centríolo proximal adere à base do núcleo, o centríolo distal origina o axonema (e depois desintegra-se), as mitocôndrias migram caudalmente e formam uma hélice em torno do axonema, e formam-se as fibras acessórias do flagelo, as fibras densas externas (ODF), que se colocam ao lado do axonema por dentro das mitocôndrias, e a bainha fibrosa (FS) que se coloca por fora das ODF (Clermont, 1966; Ramalho Santos, 2012). Culminando na formação do espermatozoide (Sz).

1.2 O espermatozoide

O gâmeta masculino, ou espermatozoide, é a célula reprodutora produzida no testículo com capacidade de transmitir a informação genética de origem paterna (Ramalho Santos, 2012).

O espermatozoide (55-66 μm) pode ser dividido em dois compartimentos, cabeça (3.4-4.6 x 1.5-2.8 μm) e flagelo (51.5 μm) (Figura 3). A cabeça é composta por um núcleo denso e alongado e os seus 2/3 anteriores são revestidos pela VA (Ramalho Santos *et al.*, 2007; Sousa, 2012). O citoplasma da cabeça do espermatozoide (teca perinuclear) é caracterizado como sendo uma concha rígida composta por ligações dissulfeto, que confere proteção ao núcleo (Sutovsky & Manandhar, 2006). Esta estrutura pode ser subdividida em três segmentos: a camada subacrossômica situa-se entre a VA e o núcleo (região do núcleo rico em genes de transcrição imediata após a fecundação) e tem função de ancoragem (Sutovsky & Manandhar, 2006); o segmento equatorial é a região entre a porção final da VA e o núcleo (corresponde a uma área do núcleo contendo cromatina muito densa e à região da VA que contém a pro-acrosina); a bainha pós-acrossômica é a região de citoplasma que se segue ao final da VA. A sua membrana possui o recetor da membrana do ovócito enquanto no seu espaço se encontram as moléculas ativadoras do ovócito (Sutovsky & Manandhar, 2006; Sousa 2012).

O flagelo pode ser subdividido em três regiões, peça intermédia (PI: 3.5-5 μm), peça principal (PP: 44-50 x 0.4-0.5 μm) e peça terminal (PT: 4-6 x 0.2 μm) (Figura 3). A PI inicia-se na base do núcleo e é caracterizada pela presença de uma hélice de 50-70 mitocôndrias. Após a fusão entre os gâmetas as mitocôndrias do espermatozoide são degradadas (estavam marcadas por ubiquitina desde a espermiogénese). Estes organelos fornecem o ATP necessário para os processos de maturação e capacitação. Na PI observam-se também o

centríolo proximal (originará os centríolos do ovócito fecundado necessários para as divisões mitóticas embrionárias uma vez que o ovócito não possui centríolos), o axonema e as ODF. A hélice mitocondrial termina num anel fibrilar denominado annulus. A partir desse ponto a porção do flagelo denomina-se de PP, subdividida em PPP (Peça Principal Proximal) e PPD (Peça Principal Distal). Na PP o axonema está rodeado pelas ODF e por colunas e anéis transversais da FS. A FS possui um sistema enzimático responsável pela glicólise que liberta o ATP necessário para a motilidade do espermatozoide. O axonema é composto por um arranjo microtubular de nove pares de microtúbulos periféricos, dispostos em círculo à volta de um par central (padrão 9d+2s). A PT só possui os microtúbulos do axonema, que se vão desagregando progressivamente (Heller & Clermont, 1964; Clermont, 1966; Holstein & Davidoff, 2003; Jonge & Barrat, 2006; Sutovsky & Manandhar, 2006; Ramalho Santos *et al.*, 2007; Piomboni *et al.*, 2012; Sousa, 2012).

Depois de libertados das CS, os espermatozoides migram pela rede testicular até serem armazenados no epidídimo. Neste local os espermatozoides são sujeitos a alterações bioquímicas e moleculares (maturação) adquirindo propriedades móveis e capacidade fertilizadora. Durante a ejaculação os espermatozoides são expelidos do epidídimo para o canal deferente antes da abertura da uretra (O'Donnell *et al.*, 2001). Uma vez na cavidade uterina os espermatozoides sofrem alterações sequenciais metabólicas, bioquímicas, membranares e iónicas (capacitação) que irão promover a hipermotilidade durante o trajeto uterino até à penetração das células foliculares (cumulus oophorus e zona radiata) que rodeiam o ovócito ovulado. Para atravessar as células foliculares o espermatozoide faz uso da sua hipermotilidade e de uma enzima de superfície, a hialuronidase de superfície. Após este trajeto encontra a zona pelúcida (ZP). Esta é uma camada de 4 glicoproteínas que reveste o ovócito. A ZP1 interliga as outras, enquanto a ZP4 possui o recetor do espermatozoide. Uma vez estabelecida a ligação entre a ZP4 e a membrana apical do espermatozoide, a ZP4 e a ZP3 induzem a exocitose da VA (reação acrossómica). Após exposto o conteúdo da VA (enzimas hidrolíticas), a ZP2 interage com uma pro-protease da mesma (região posterior) e activa-a em acrosina. Após digerir a ZP, o espermatozoide liga-se a um recetor da membrana do ovócito. Após a fusão entre as membranas o conteúdo do espermatozoide é incorporado no ovócito e ativa o metabolismo deste (com conclusão da meiose II com extrusão do segundo glóbulo polar e formação dos pro-núcleos) (Conner *et al.* 2005; Redlara, 2006; Chiu *et al.*, 2008; Ganguly *et al.*, 2010; Sousa, 2012; Anifandis *et al.*, 2014). Durante o

desenvolvimento pré-implantação a ZP garante a integridade dos embriões enquanto transitam pelo trato reprodutor feminino (Wassarman, 2008).

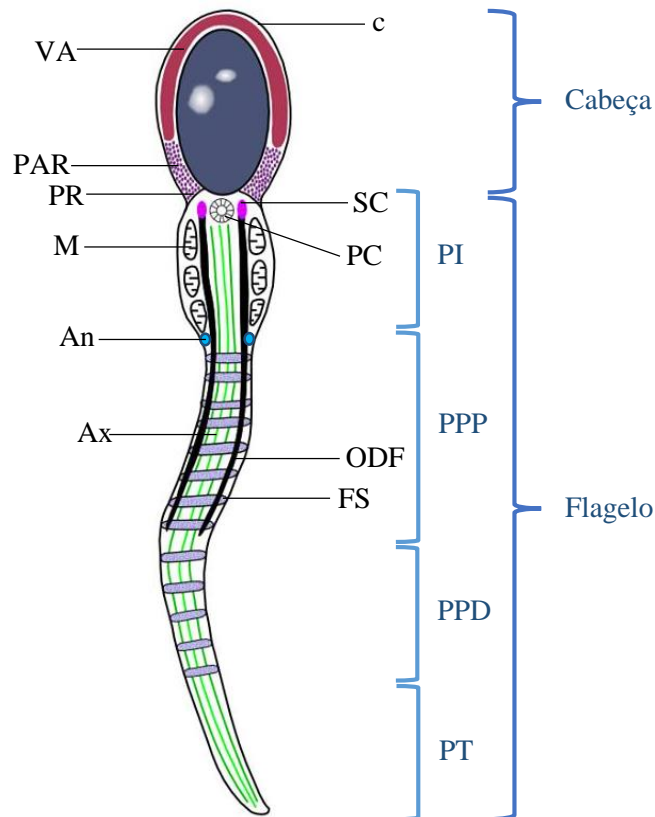


Figura 3: Estrutura do espermatozoide, Cabeça: membrana citoplasmática (c), vesícula acrosômica (VA), região pós-acrosômica (PAR) e anel posterior (PR). Peça intermediária (PI): centríolo proximal (PC), colunas estriadas (SC) fibras densas externas (ODF), axonema (Ax) e bainha mitocondrial (M). Peça principal proximal (PPP): inicia-se após o annulus (An) e contém o Ax, as ODF e os anéis da bainha fibrosa (FS). Peça principal distal (PPD): só se observa o Ax e a FS. Peça terminal (PT): apenas contém o Ax.

1.3 Infertilidade

1.3.1 Definição

A infertilidade é uma doença do sistema reprodutivo. Um casal é considerado infértil se não conseguir alcançar uma gravidez de termo após 12 meses ou mais de relações sexuais regulares e sem recorrer a métodos contraceptivos (WHO, 2010). A infertilidade pode ser considerada de causa primária, quando nunca ocorreu gravidez, ou secundária, quando houve uma gravidez prévia de termo ou inconsequente (Poongothai *et al*, 2009). A infertilidade conjugal resulta num sofrimento considerável para os casais afetados (Irvine,

1998). Deriva de um conjunto de diferentes condições que exibem uma variedade de etiologias e exigem um espectro multifatorial de diagnóstico (Poongothai *et al.*, 2009).

A infertilidade apresenta taxas elevadas de prevalência nos países desenvolvidos devido ao adiamento da idade de conceber, aliado a vidas profissionais stressantes e ao aumento da dificuldade em alcançar uma “estabilidade económica”. A existência de mais do que um parceiro sexual, as rotinas sedentárias e o consumo alimentar inadequado, como dietas incluindo excesso de gorduras e alimentos contendo grande quantidade de químicos, também afetam influenciam a taxa de infertilidade. O tabaco, álcool e drogas também afetam severamente os casais. De um modo geral, o predomínio da infertilidade em casais é de cerca de 15-20% na população em idade reprodutiva. As taxas de infertilidade masculina, feminina e mistas são similares (Sá *et al.*, 2006).

1.3.2 Causas de infertilidade masculina

Na infertilidade de causa masculina, pode-se observar-se azoospermia (sémén sem espermatozoides) ou alterações dos parâmetros seminais (Sen *et al.*, 2013).

A infertilidade masculina pode ser causada pelos mais variados fatores sendo definida como uma doença multifatorial (Sá *et al.*, 2006). Em termos de prevalência, as microdeleções no braço longo do cromossoma Y surgem como um dos principais fatores genéticos que contribuem para a infertilidade masculina. O diagnóstico destas microdeleções é considerado clinicamente relevante para o aconselhamento e gestão adequada da infertilidade masculina e é altamente indicado para os casos que realizam microinjeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), uma vez que por esta técnica existe a possibilidade de transmissão do defeito genético para a prole masculina de pais que contêm as microdeleções (Sen *et al.*, 2013). As causas da infertilidade masculina estão descritas no Anexo 1.

1.3.3 Tratamentos de infertilidade masculina

A infertilidade é um problema de saúde pública com impacto social, psicológico e económico significativo, daí a necessidade urgente de se procurar solucionar este problema com o auxílio de técnicas de reprodução medicamente assistida (RMA) (Suganthi *et al.*, 2014).

A. Inseminação intra-uterina (IIU): Consiste na introdução de espermatozoides, previamente capacitados, na cavidade uterina, havendo a hipótese de esta estar sob estimulação ovárica ou não.

Pode ser aplicada em situações com indicações femininas, tais como perturbações psicológicas, muco cervical incompetente e disfunção ovulatória ligeira. No entanto trompas de Falópio permeáveis e sémen de boa qualidade têm que ser fatores obrigatoriamente presentes para aplicação desta técnica. Por outro lado, também há indicações masculinas que justificam o uso desta técnica como as perturbações psicológicas e em casos de azoospermia em que o testículo não produz espermatozoides. Neste caso a IIU é efetuada com recurso a dador de espermatozoides (Sá *et al.*, 2007).

A IIU é uma técnica relativamente simples, não invasiva e barata, que deve ser utilizada como tratamento de primeira linha se o diagnóstico de infertilidade assim o permitir (Ombelet *et al.*, 2008).

Pode envolver a inseminação de espermatozoides no útero, cronometrado em ciclos naturais (não estimulados) ou após estimulação ovárica, utilizando anti-estrogénios ou gonadotrofinas orais (Clinical Guideline, 2004). Os espermatozoides purificados são colocados na cavidade uterina (acima do colo uterino) até 36h após a indução da ovulação, sob controlo ecográfico (Sá *et al.*, 2007).

A preparação de espermatozoides é necessária para remover prostaglandinas, agentes infecciosos, proteínas antigénicas, espermatozoides não-móveis, leucócitos e células germinativas imaturas. O objetivo por detrás da IIU com espermatozoides homólogos (do parceiro da paciente) é escapar à barreira de muco cervical e aumentar o número de espermatozoides móveis, com uma proporção elevada de formas normais no local da fertilização (Ombelet *et al.*, 2008).

B. Fertilização *in vitro* (FIV): Este tipo de tratamento leva à maior taxa gravidez por ciclo. Desenvolvida com sucesso em 1978, desde aí sofreu um aumento exponencial na prática em todo o mundo (Voorhis, 2007).

A decisão de efetuar esta técnica é feita com base em indicações femininas como a disfunção ovulatória moderada ou severa e a obstrução tubar. As indicações masculinas contemplam um défice ligeiro da qualidade do sémen (Sá *et al.*, 2007).

O processo de FIV abrange uma série de passos que incluem: indução hormonal para crescimento de vários folículos ováricos. A hiperestimulação controlada do ovário é feita com FSH recombinante em associação com a inibição da libertação endógena de FSH e LH pela hipófise, graças ao recurso a agonistas ou antagonistas da GnRH (Esteves & Agarwal, 2013); administração da gonadotrofina coriônica humana (HCG) ou LH recombinante no final da estimulação para induzir a finalização da maturação ovocitária; aspiração ecoguiada dos folículos ováricos antes da ovulação; inseminação *in vitro* dos folículos ováricos (50000-10000 espermatozoides/folículo); desenvolvimento *in vitro* dos embriões resultantes (incubadora a 37°C com 5% CO₂, 5% O₂, 90% N₂); transferência ecoguiada para a cavidade uterina de 1-2 embriões de alta qualidade sob preparação do endométrio. A seleção para transferência faz-se desde o 2º dia, pelo que poderá ser efetuada desde o dia 2 até ao dia 5 (fase de blastocisto) consoante o nº de embriões disponíveis. Havendo menos de 4 embriões de elevada qualidade transfere-se habitualmente antes da fase de blastocisto. Sempre que possível efetua-se cultura prolongada até ao 5º dia, uma vez que a transferência de blastocistos produz taxas mais elevadas de gravidez e permite uma melhor seleção da potencialidade do embrião e a transferência seletiva de um só embrião; criopreservação dos embriões excedentários de boa qualidade para uso posterior pelo casal. A gravidez é detetada 12 dias depois usando o teste quantitativo β -HCG no soro e é confirmada clinicamente pela observação ecográfica de saco gestacional com batimentos cardíacos às 5-7 semanas (Edwards & Steptoe, 1983; Redlara, 2006; Voorhis, 2007; Sá *et al.*, 2007; Esteves & Agarwal, 2013).

A FIV alberga alguns riscos como a probabilidade de ocorrerem gestações múltiplas (pois a transferência de mais de um embrião resulta numa maior taxa de gravidez múltipla), resultados perinatais adversos, alguma probabilidade acrescida de defeitos congénitos, e o desenvolvimento da síndrome de hiperestimulação ovárica (SHO) (Sousa *et al.*, 2015). Hoje em dia, com o doseamento do estradiol e o nº de folículos em crescimento o SHO é passível de ser previsto e evitado com recurso ao uso de um agonista em vez de HCG e preparação especial do endométrio (Voorhis, 2007; Pundir *et al.*, 2012).

- C. Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI): Esta técnica consiste na micro-injeção de um único espermatozoide no interior do citoplasma de um ovócito com auxílio

de micropipetas ajustadas num equipamento composto de microscópio invertido e micromanipuladores (Palermo *et al.*, 1992; Redlara, 2006).

Para aplicação desta técnica pode haver indicação de fatores femininos como a ocorrência de falhas repetidas de implantação após FIV, baixo número de ovócitos, imaturidade ovocitária, idade avançada do ovário e diagnóstico genético pré-implantação (DGPI). As indicações masculinas são a causa maioritária para execução desta técnica, e podem ser devidas a alteração moderada ou severa dos parâmetros seminais, azoospermia, anejaculação, ejaculação retrógrada, doentes seropositivos, e DGPI. Se não ocorrer ejaculação, ou se os doentes tiverem azoospermia, espermatozoides viáveis podem ser recuperados do epidídimo ou do testículo (Clinical Guideline, 2004; Poongothai *et al.*, 2009). Desde de que a ICSI foi introduzida em 1992, a necessidade de doação de espermatozoides foi drasticamente reduzida (Devroey & Steirteghem, 2004).

Na ICSI, após a estimulação ovárica, igual à da FIV (Esteves & Agarwal, 2013), as células foliculares do cumulus oophorus e da corona radiata são removidas por processos mecânicos e enzimáticos (desnudação) (Figura 4A e 4B) (Van Steirteghem *et al.*, 1993). Na microinjeção, seleciona-se um espermatozoide que apresente uma morfologia normal e motilidade hiperativa, imobiliza-se-o com uma micropipeta (esmagamento do flagelo a meio da PP) e aspira-se para a ponta de uma micropipeta de injeção (Figura 4C). O ovócito é fixado com uma micropipeta de contenção (Figura 4D), e a micropipeta de injeção penetra a ZP e depois a membrana do ovócito na região equatorial, afastada da posição do 1º glóbulo polar, onde se encontra a placa metafásica-I (às 6h) (Figura 4E) (Van Steirteghem *et al.*, 1993). Uma vez no ooplasma, o espermatozoide é libertado na periferia equatorial oposta à zona de penetração (Figura 4F, 4G e 4H). De seguida o ovócito é colocado em cultura, segue-se o procedimento descrito na FIV (Devroey & Steirteghem, 2004) (Figura 4I e 4J). A ICSI é o método mais eficiente de fertilização assistida por meio de microcirurgia, oferecendo a possibilidade de uso de espermatozoides tanto do ejaculado como dos testículos e do epidídimo (Tesarik & Sousa, 1995). Esta técnica apresenta o mesmo tipo de complicações da FIV e tem sido associada a um aumento de recém-nascidos com aberrações cromossómicas e perturbações do imprinting. Porém, diversos estudos epidemiológicos demonstraram que tal não ocorre (Fauser *et al.*, 2014).

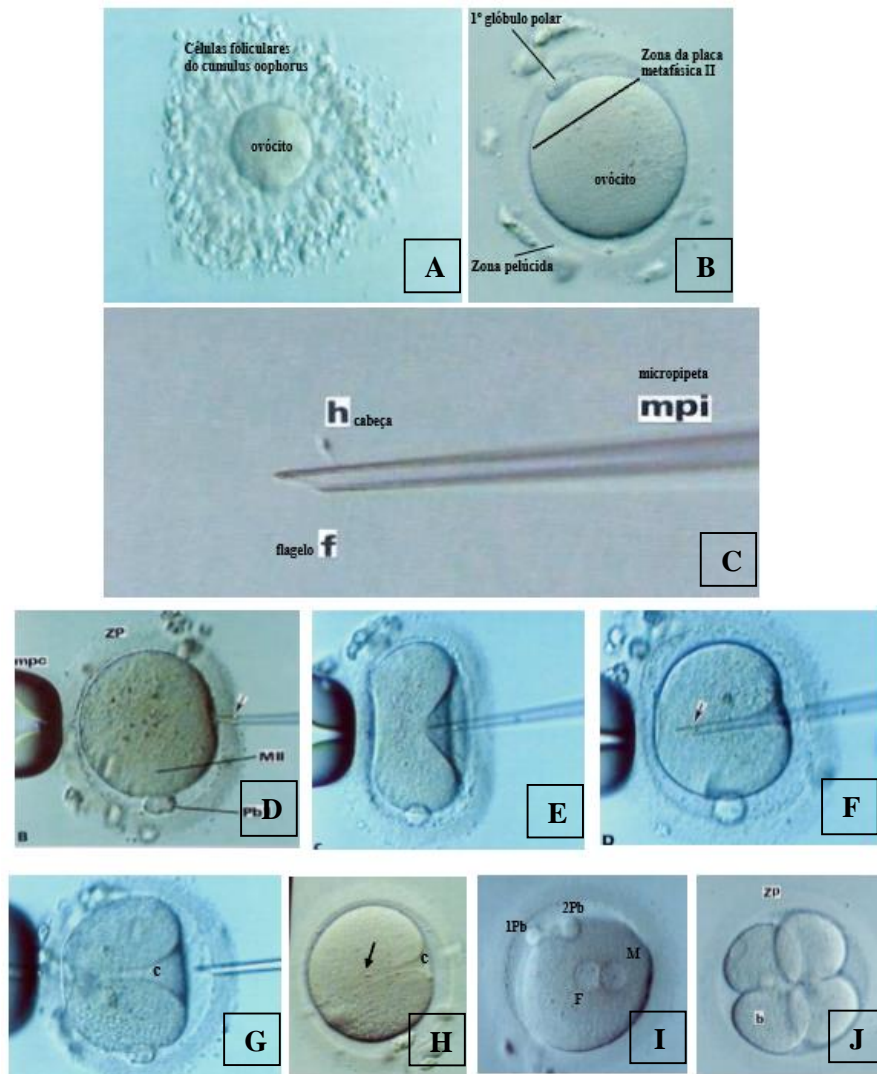


Figura 4: Microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides, 4A- Ovócito com células do cumulus, 4B- ovócito após desnudação sem, células do cúmulo, apenas com zona pelúcida e 1º glóbulo polar, 4C- imobilização do espermatozoide, 4D, 4E e 4F- Microinjeção do espermatozoide no citoplasma do ovócito, 4G e 4H- ovócito microinjetado com espermatozoide, 4I- formação de 2 pronúcleos e do 2º glóbulo polar, 4J- divisão em 4 blastómeros. (Retirado de Sá *et al.*, 2007- Medicina da Reprodução Laboratorial, Manual do Internato Médico)

D. Recuperação de espermatozoides: Os espermatozoides conseguem ser recuperados a através do epidídimo e testículo utilizando uma diversidade de técnicas, com o objetivo de obter gravidezes em casais em que o parceiro masculino tenha azoospermia obstrutiva (OAZ) ou não-obstrutiva (SAZ: azoospermia secretora) (Devroey *et al.*, 1995; Clinical Guideline, 2004). Durante um processo convencional de

extração de espermatozoides testiculares (TESE), o testículo é exposto a uma pequena incisão e uma ou várias biópsias são retiradas com base na aparência dos TS (Sousa *et al.*, 2002; Deruyver *et al.*, 2014). A Recuperação de espermatozoides também é utilizada na insuficiência ejaculatória, em ejaculados com 100% de imotilidade ou 100% de anomalias dos espermatozoides, e em casos de elevada fragmentação do ADN. Os espermatozoides recolhidos por TESE são em quantidade insuficiente para IIU ou FIV, para além de que não sofreram maturação nem capacitação, pelo que nestes casos se usa sempre a ICSI (Clinical Guideline, 2004).

As técnicas cirúrgicas para recuperação de espermatozoides do epidídimo ou do testículo incluem: MESA (micro-aspiração de espermatozoides do epidídimo), PESA (aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo), TESA (aspiração testicular de espermatozoides), TEFNA (aspiração testicular de espermatozoides por agulha fina) e TESE (extração testicular de espermatozoides) (Clinical Guideline, 2004). Nos casos de OAZ pode-se usar a MESA, mas os resultados foram muito fracos, pelo que se prefere usar a TESA, nos casos de anejaculação usa-se a TESA e na azoospermia secretora usa-se sempre a TESE (Deruyver *et al.*, 2014).

E. Diagnóstico genético pré implantação (DGPI): É uma opção alternativa ao diagnóstico pré-natal (DPN), e é usado para reconhecer anomalias genéticas e cromossómicas antes da implantação (Carvalho *et al.*, 2001). Pode ser aplicada a casais férteis portadores de doença genética transmissível ou a casais inférteis com ovário de idade avançada, falhas repetidas de implantação e abortamentos de repetição (Sá *et al.*, 2007).

O DGPI consiste em testar células individuais de um grupo de embriões, com a intenção de selecionar aqueles sem anomalias cromossómicas ou génicas, para evitar a contaminação com células foliculares, este diagnóstico obriga ao uso da ICSI (Devroey & Steirteghem, 2004).

Neste procedimento, é realizada uma extração (biópsia embrionária) de um ou dois blastómeros com o auxílio de micropipeta de biópsia embrionária (Figura 5). Efetua-se ao 3º dia do desenvolvimento embrionário (embrião com 8 células). Uma vez isolado, o blastómero é colocado numa lâmina para se isolar o seu núcleo e depois processada para deteção dos cromossomas por hibridização *in situ* fluorescente (FISH), simples ou por arrays. Esta técnica efetua-se para as anomalias numéricas e estruturais (translocações).

No caso das doenças génicas (fibrose quística, doenças neuromusculares, etc) o blastómero é colocado num tubo para extração do ADN. Enquanto se aguarda pelo diagnóstico genético, os embriões ficam em cultura prolongada até ao dia 5. Nesta fase selecciona-se o blastocisto normal que é então transferido. A biópsia embrionária também pode ser efetuada na trofectoderme dos blastocistos. Neste caso, os blastocistos em estudo são criopreservados e ulteriormente transferidos em ciclo natural ou após preparação do endométrio (Munné *et al.*, 2003; Redlara, 2006).



Figura 5: Biópsia embrionária para DGPI. (Retirado Sá *et al.*, 2007-de Medicina da Reprodução Laboratorial, Manual do Internato Médico)

F. Criopreservação de tecidos germinais, gâmetas e embriões:

Criopreservação de ovócitos- É feito o congelamento, armazenamento e descongelamento de ovócitos num estado favorável a que haja a fecundação e desenvolvimento final (Redlara, 2006). Criopreservam-se ovócitos imaturos nos casos de síndrome do ovário poliquístico que apresentam resistência a tratamento cirúrgico ou medicamentoso, em mulheres jovens com história familiar de falência ovárica prematura, bem como em pacientes oncológicos antes de iniciarem os tratamentos. O congelamento de ovócitos maduros é indicado para dadoras de ovócitos e mulheres que desejam adiar a idade de reprodução (Sá *et al.*, 2007).

Criopreservação de tecido ovárico- Apesar das dificuldades de congelamento de tecidos complexos, em comparação com as células individuais, o armazenamento de tecido ovárico provou ser surpreendentemente bem-sucedido. A criopreservação de tecido ovárico é uma opção viável para a conservação da fertilidade em pacientes oncológicos antes do tratamento e em mulheres jovens com história familiar de falência ovárica prematura (Donnez *et al.*, 2004; Sá *et al.*, 2007; Donnez *et al.*, 2015).

Criopreservação de espermatozoides e tecido testicular- A criopreservação de espermatozoides faz parte do trabalho de muitos laboratórios das clínicas de infertilidade. A sobrevivência das células após congelação e descongelação depende da minimização da geração de cristais de gelo intracelulares (WHO, 2010). Para além dos doadores de espermatozoides, a criopreservação de espermatozoides efetua-se nos casos de oligozoospermia severa ($< 1 \times 10^6/\text{ml}$), nos portadores de doenças que se sabe que evoluirão para azoospermia (síndrome de Klinefelter, microdeleção da região AZFc do cromossoma Y), nos casos com espermatozoides excedentários de procedimentos de TESE, e nos pacientes oncológicos antes dos tratamentos. A criopreservação de tecido testicular efetua-se nas crianças pre-púberes com uma neoplasia que necessite de quimio e/ou radioterapia (Sá *et al.*, 2007).

Criopreservação de embriões: A criopreservação de embriões é uma segurança para a obtenção da gestação, já que os embriões excedentários, que não foram transferidos, são armazenados e transferidos num ciclo posterior do casal (Clinical Guideline, 2004; Redlara, 2007).

1.4 Cromossoma Y

Nos seres humanos, o sexo de um indivíduo é resultado de um processo em cascata sincronizada de controlos genéticos propagados por mecanismos endócrinos (Goodfellow & Darling, 1988). A nível genético a distinção de homem e mulher é determinada pela presença ou ausência do cromossoma Y, sendo este o menor dos cromossomas humanos (aproximadamente 60Mb) contribui com apenas cerca de 2-3% para o genoma haplóide característico do fenótipo masculino (XY), estando envolvido no desenvolvimento e manutenção de células germinativas masculinas (Graves 1998; Quintana-Murci & Fellous, 2001).

Sob o ponto de vista citogenético este cromossoma é constituído por um braço longo (Yq) e um braço curto (Yp), demarcados por um centrómero, fundamental para a segregação cromossómica (Elliott *et al.*, 1997).

Foram distinguidas três diferentes regiões neste cromossoma: regiões pseudoautossómicas (PAR), região eucromática e região heterocromática (Quintana-Murci & Fellous, 2001) (Figura 7).

Regiões pseudoautossômicas distais assemelham-se a genes autossômicos, na composição de base e na diversidade e densidade do gene, sendo partilhados livremente por ambos os sexos (Lahn *et al.*,2001). Estão divididas em PAR1, localizada na região terminal do braço curto (Yp) e PAR2 na extremidade do braço longo (Yq), com cerca de 2,6 Mb e 0,4 Mb respetivamente, estas representam menos de 3Mb dos 60Mb do comprimento total do cromossoma Y (Bachtrog & Charlesworth,2001; Jobling & Tyler-Smith, 2003). É nesta região, em particular em PAR1, que há recombinação homóloga entre o cromossoma X e Y durante a primeira divisão na meiose masculina. E entre estes dois PARs há uma larga região onde não há recombinação (Glaser *et al.*,1998; Quintana-Murci & Fellous, 2001). As regiões pseudoautossômicas ocupam 5% do comprimento do cromossoma Y, sendo que a maior parte (cerca de 95%) é abrangida por regiões não recombinantes (NRY), onde não há crossing-over entre os cromossomas X e Y.

A região NRY é dividida em 43 intervalos definidos por deleções que ocorrem naturalmente (Lahn & Page, 1997). Sendo esta região renomeada como MSY (região específica masculina) após a descoberta de recombinação intracromossômica abundante, esta região é flanqueada dos dois lados pelas regiões pseudoautossômicas (PAR1 e PAR2) (Skaletsky *et al.*, 2003). A sequência MSY codifica 27 proteínas distintas que se enquadram nas regiões eucromática e heterocromática com 24 e 30Mb respetivamente (Tilford *et al.*,2001; Li *et al.*, 2008).

A região Yp (Yp11) e a parte proximal de Yq (Yq11 subdividida em Yq.11.1, 11.21, 11.22, 11.23) consistem na eucromatina, enquanto que a parte distal de Yq é composta por heterocromatina que corresponde a metade de dois terços de Yq (Yq12) (Skaletsky *et al.*, 2003).

A região eucromática compreende a área entre PAR1 e a zona proximal do braço longo (Yq) (Rives,2014). Nesta região existem grandes unidades repetitivas, denominadas amplicões, que apresentam diferente composição, tamanho, número de cópias e orientação, com a ocorrência de repetições em tandem e invertidas, outros estão ainda disseminados pelos braços (Yq e Yp) do cromossoma Y (Tilford *et al.*,2001).

Esta região é subdividida em três classes, X-transposto, X-amplicónico e X-degenerado (Poongothai J. *et al.*, 2009; Skaletsky *et al.*, 2003) (Figura 6).

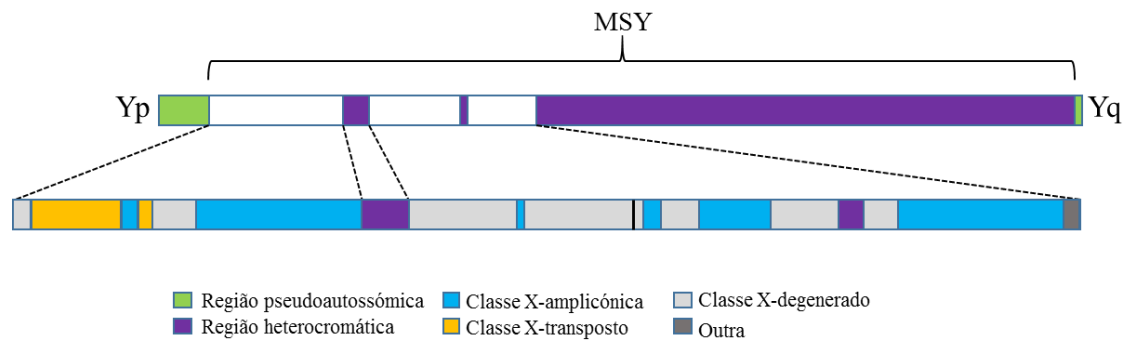


Figura 6: Porção de MSY que se estende desde o limite proximal de Yp até ao limite proximal de Yq (incluindo a região heterocromática). Representação das 3 classes de sequências euromáticas (X-transposto, X-degenerado e X-amplicônico). (Modificado de Skaletsky *et al.*, 2003).

Os genes transpostos a partir do cromossoma X durante o processo de evolução do cromossoma Y, codificam 2 proteínas de MSY e são 99% idênticos a sequências de ADN, em Xq21, contêm 3,4 Mb de comprimento total, pertencendo á classe do X-transposto. Aqueles que são pouco semelhantes á sequência do cromossoma X, representam genes de cópia única ou pseudogenes homólogos a genes ligados ao X que codificam 16 proteínas de MSY, apresentando 8.6Mb de comprimento e incluídos na classe do X-degenerado. Desta classe fazem parte o gene *SRY* e o gene *ZFY*. O gene *SRY* é um fator de transcrição de determinação do sexo, responsável pela iniciação do desenvolvimento gonadal. Possui apenas uma cópia e não apresenta homólogos no cromossoma X, estando expresso em vários tecidos. Este gene contém um único exão que codifica uma proteína de 204 aminoácidos que se apresenta conservada no domínio de ligação ao ADN. O gene *ZFY* (Zinc Finger Transcription Factor) apenas apresenta uma cópia, podendo funcionar como fator de transcrição, possuindo homólogos no cromossoma X (*ZFX*), com expressão ubíqua (Bachtrog & Charlesworth., 2001; Skaletsky *et al.*, 2003).

A classe do X-amplicônico é representada por sequências que exibem uma similaridade de mais de 99,9% de identidade ao longo de dezenas de kilobases. Apresenta unidades repetidas, organizadas em palíndromos, de todo o braço curto proximal do Yp, estes amplicões estão localizados em 7 segmentos, constituindo a maior parte da sequência euromática MSY cujo comprimento é 10,2Mb, codificando 9 proteínas de MSY . Desta classe faz parte um vasto grupo de genes dos quais o gene *TSPY* com função de proteína de ligação á ciclina B, localizado na porção euromática do braço curto do cromossoma Y. O *TSPY* está expresso no testículo, mais especificamente em espermatogónias e em

espermatócitos secundários de adultos, apresenta múltiplas cópias (entre 30 a 60), algumas das quais estão intercaladas com RBM (RNA Binding Motifs) em Yq11.23. Apresenta um homólogo no cromossoma X (Van der Ven *et al.*, 1997; Bachtrog & Charlesworth, 2001; Skaletsky *et al.*, 2003; Sadeghi-Nejad & Farrokhi, 2007; Suganthi *et al.*, 2014).

A região heterocromática é composta pelo Yq distal correspondente a Yq12 classificada como geneticamente inerte e polimórfica no comprimento em diferentes populações masculinas, isto devido a duas famílias de sequências altamente repetitivas, DYZ1 e DYZ2 (Goodfellow *et al.*, 1985; Quintana-Murci & Fellous, 2001).

Como consequência de fenômenos evolutivos, o cromossoma Y humano alberga uma vasta densidade de sequências repetitivas alternando entre sequências longas e curtas, assim como repetições em tandem (Glaser *et al.*, 1998).

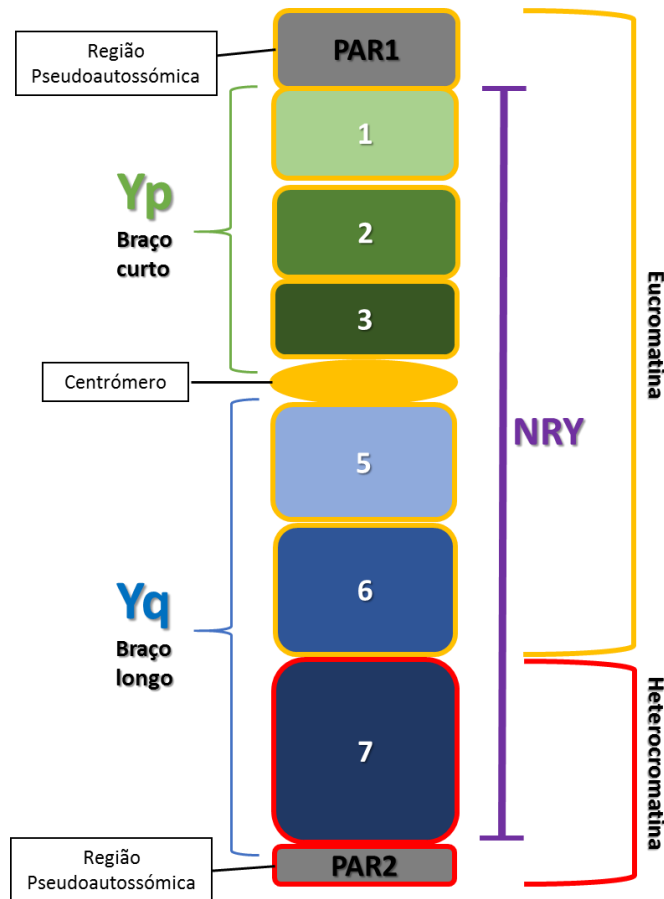


Figura 7: Desenho esquemático do cromossoma Y, incluindo os 7 intervalos em que está subdividido, regiões pseudoautosômicas, centrômero, braço longo (Yq), braço curto (Yp), regiões não recombinantes (NRY), heterocromatina e eucromatina.

1.4.1 Anomalias do cromossoma Y

A infertilidade masculina afeta 1 em cada 20 homens, destes 50% são devido a uma falha espermatogénica primária. Microdeleções Yq foram detetadas em 5-15% dos homens com insuficiência espermatogénica, mais concretamente estas deleções ocorrem originalmente em cerca de 8% dos homens com azoospermia não-obstrutiva e entre 3 e 5% em homens com oligozoospermia severa (Simoni *et al.*, 1998; Foresta *et al.*, 2001; Kleiman *et al.*, 2001).

O aparecimento de ferramentas de diagnóstico precisas e a compreensão do mapa do cromossoma Y, permitiu uma maior facilidade de reconhecimento das aberrações genéticas responsáveis pela infertilidade. Além disso, homens com azoospermia ou oligospermia grave causada por algum destes defeitos genéticos, podem ser submetidos a técnicas de recuperação de espermatozoides.

Assim, um diagnóstico definitivo dos fatores causais de comprometimento da espermatogénese pode determinar as abordagens terapêuticas e prever a taxa de sucesso do tratamento (Sadeghi-Nejad & Farrokhi, 2007). Até ao momento, vários genes relacionados com infertilidade têm sido investigados na tentativa de identificar marcadores moleculares confiáveis que possam prever a presença de células haploides nos testículos dos homens inférteis (Kostova *et al.*, 2007).

Quando alguns destes genes, responsáveis pela correta progressão da espermatogénese, estão ausentes na estrutura do cromossoma Y, dizemos que ocorreu uma microdeleção.

Assim sendo, o teste para microdeleções Yq não é simplesmente clinicamente relevante ao resultar num diagnóstico, mas também é necessário para o aconselhamento genético e abordagem clínica adequados dos casos inférteis (Sen *et al.*, 2013).

A conexão entre as deleções do cromossoma Y e a infertilidade, e a inexistência de tais deleções em homens férteis, sugerem que haja uma relação direta de causa-efeito entre as deleções e a infertilidade (Pryor *et al.*, 1997). O teste diagnóstico destas microdeleções é geralmente realizado através do PCR, por amplificação dos STSs (sequence tagged sites) selecionados, no cromossoma Y (Alechine & Corach, 2014).

O mapeamento deste cromossoma permite identificá-los e ordená-los por locus, este trabalho é muito útil não só para determinar a posição dos genes mas para averiguar a sua

diversidade estrutural e evolutiva podendo posteriormente inferir acerca de associações entre as populações humanas e primatas (Quintana-Murci & Fellous, 2001).

Um conhecimento mais aprofundado da sequência genômica do cromossoma Y revelou que eventos de recombinação homóloga não alélica (NAHR) entre amplicões no braço longo do cromossoma Y (Yq11) originaram microdeleções genômicas responsáveis pela infertilidade masculina idiopática (Soares *et al.*, 2012). Posto isto, sugeriu-se que pelo menos um fator genético no cromossoma Y, seria crucial para a espermatogênese, e está localizado na região eucromática do braço longo do cromossoma Y (Yq11) chamado de fator de azoospermia (AZF) (Foresta *et al.*, 2001).

A região AZF foi repartida por AZFa, AZFb e AZFc, estando estas regiões envolvidas na infertilidade masculina, uma vez que são verificados em pacientes azoospermicos ou oligozoospermicos (Tiepolo & Zuffardi, 1976; Vogt *et al.*, 1996) (Figura 8). As deleções nestas regiões podem ainda estar agrupadas em deleção da região AZFabc (quando tem 1 ou mais genes deletados em cada uma das regiões), AZFab (deleção parcial ou total da região AZFa e AZFb), AZFbc (quando tem um ou mais genes deletados na região AZFb e AZFc, ou na zona de sobreposição destas duas regiões) (Figura 9). O fator de azoospermia foi proposto existir no intervalo 5 e 6 do braço longo (Yq) do cromossoma Y estando subdividido em 43 intervalos (Vollrath *et al.*, 1992; Girardi *et al.*, 1997).

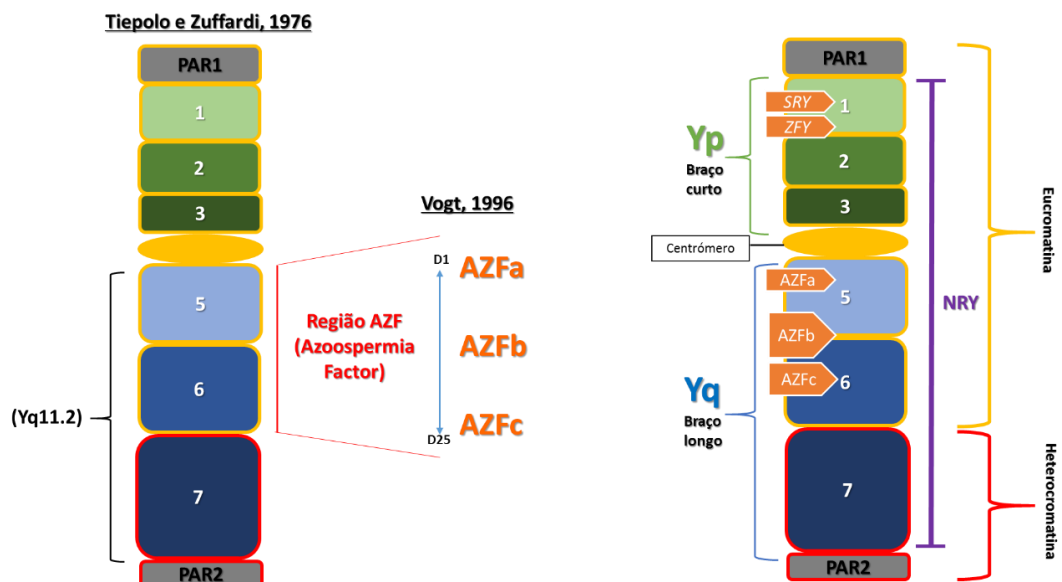


Figura 8: Desenho esquemático do cromossoma Y segundo diferentes autores em diferentes datas, inicialmente (em 1976) Tiepolo & Zuffardi caracterizam o cromossoma Y e identificam a região do braço longo (Yq11.2) como tendo fatores que controlam a espermatogênese. Mais tarde (1996) Vogt distinguiu esse fator como fator

de azoospermia (AZF) repartido por AZFa, AZFb e AZFc. Recentemente está caracterizado todo o cromossoma Y e estão identificados os genes pertencentes às diferentes regiões tanto no braço curto (Yp) como no braço longo (Yq).

Grande parte das anomalias cromossômicas numéricas e deleções AZF são eventos *de-novo* nas células germinativas dos pais (Dohle *et al.*, 2002).

Microdeleções na região AZF interrompem o processo espermatogénico em diferentes fases; SCOS (Síndrome de células de Sertoli) foi observado em pacientes com supressão completa do intervalo AZFa, ou seja, apenas as células de Sertoli eram visíveis nos túbulos das secções de tecido testicular. Pacientes com deleção completa de AZFb apresentaram paragem da espermatogénese na fase de espermátócitos, interrompendo a primeira divisão meiótica (PM), no entanto nos túbulos seminíferos foram observadas populações de espermatogónias e espermátócitos secundários. As patologias testiculares mais variadas foram encontradas em pacientes com deleções AZFc, geralmente ligadas á hipoespermatogénese (HP) e ao desenvolvimento de oligozoospermia severa e azoospermia. Em pacientes inférteis com microdeleções do cromossoma Y, a frequência de deleções em AZFa (5%) e AZFb (10-16%), é significativamente menor em comparação com a frequência de deleções AZFc (60%) (Reijo *et al.*, 1995; Vogt, P.H, 1998; Foresta *et al.*, 2001; Hoops *et al.*, 2003; Vogt *et al.*, 2005; Alechine & Corach, 2014).

Não há ainda um consenso na relação genótipo-fenótipo precisa, pois já foram observados alguns casos que são exceção, no entanto estas são as relações mais comumente observadas em inúmeros estudos feitos até à data.

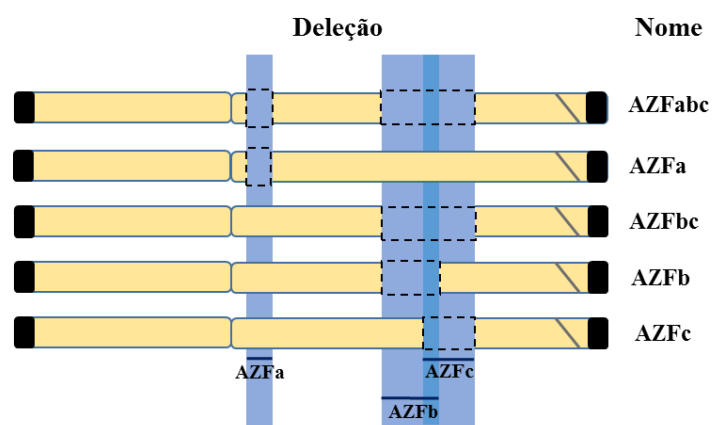


Figura 9: Diferentes deleções na região AZF do cromossoma Y.

1.4.1.1. AZFa

É a região mais pequena de AZF, estando localizada na zona proximal do intervalo 5 (subintervalo 5C) do cromossoma Y, estendendo-se por cerca de 1100 kb de ADN. Estruturalmente esta região é não-repetitiva e apresenta uma baixa frequência de deleções (Hamada *et al.*, 2013; Krausz *et al.*, 2014).

Deleções em AZFa são causadas por eventos de recombinação homóloga, não alélica e intracromossômica, de dois blocos de sequências retrovirais em Yq11, intervalo D3 e D6, correspondendo respetivamente a HERV15yq1 e HERV15yq2 (Kamp *et al.*, 2001; Bosch e Jobling, 2003) (Figura 10).

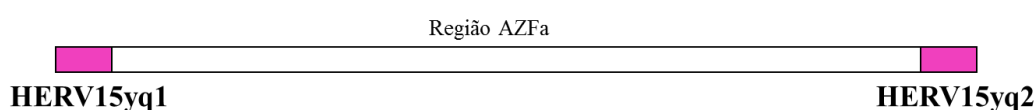


Figura 10: Região AZFa composta por 2 blocos de sequências retrovirais (HERV15yq1 e HERV15yq2).

Tendo em conta o padrão de deleção e a histologia testicular, a supressão da região AZFa foi associada com a completa ausência de células germinais, permanecendo somente a presença de células de Sertoli nos túbulos seminíferos, designando este fenótipo de síndrome de células de Sertoli (SCOS) (Ambukar *et al.*, 2014).

Em termos genéticos AZFa contém 3 genes que codificam sequências proteicas: DFFRY recentemente renomeado de USP9Y (*ubiquitine-specific peptidase 9 on the y chromosome*), DBY (*DDX3Y-dead box polipeptide 3 on the y chromosome*) e UTY (*ubiquitously transcribed tetratricopeptide repeat gene, Y chromosome*). Sabe-se que pelo menos dois destes (USP9Y e DBY) estão diretamente relacionados com a infertilidade masculina e a eliminação destes genes na região AZFa foi associada com a completa ausência de células espermatogénicas nos testículos (SCOS), é a chamada deleção AZFa completa (Sargent *et al.*, 1999; Kamp *et al.*, 2001; Krausz *et al.*, 2006; Hamada *et al.*, 2013; Krausz *et al.*, 2014). Ambos estão localizados na região da eucromatina em MSY, pertencentes á classe X-degenerada, tendo assim genes homólogos no cromossoma X (Sadeghi-Nejad & Farrokhi, 2007).

O gene USP9Y ocupa cerca de metade do intervalo de AZFa e difere substancialmente de outros genes candidatos da região AZF como DAZ e RBMY, pois não codifica para uma proteína de ligação ao ARN, em vez disso funciona como uma hidrolase (Jones *et al.*, 1996; Brown *et al.*, 1998; Foresta *et al.*, 2001). USP9Y contém aminoácidos

Cys e domínios *His*, sendo suscetível de operar como hidrolase ubiquitina C-terminal, tem como alvo proteínas específicas e remove a ubiquitina conjugada. A função de desubiquitinação de USP9Y atua como forma de prevenir a degradação de proteínas codificadas por genes essenciais expressos especificamente em espermatogônias ou espermátocitos primários (Brown *et al.*, 1998).

Este é um gene de cópia única que escapa á inativação do cromossoma X, e apresenta uma expressão ubíqua em vários tecidos (Jones *et al.*, 1996; Foresta *et al.*, 2001).

Apesar da ausência completa ou deleção significativa da proteína USP9Y, isto não é suficiente para produzir o fenótipo AZFa completo. Alguns autores afirmam que a transmissão natural de deleções envolvendo o gene USP9Y e a ausência do produto deste gene não impede a capacidade de fertilização de espermatozoides, e, portanto, não é crítico para o processo de maturação do espermatozoide (Krausz *et al.*, 2006).

Este gene é considerado por alguns, um “fine tuner” da espermatogénese, que sozinho, tem uma importância marginal, e que outros fatores genéticos ou não genéticos podem influenciar o fenótipo final (Kleiman *et al.*, 2012). Este facto leva-nos a querer que outros genes estejam envolvidos nesta região, responsáveis pela interrupção espermatogénica, quer isoladamente ou em combinação com USP9Y, são estes DBY e UTY (Mazeyrat *et al.*, 1998).

Os genes DBY e UTY também têm homólogos no cromossoma X, sendo respetivamente DBX e UTX e apresentam um padrão de expressão numa vasta gama de tecidos (Lin *et al.*, 2001).

O gene DBY é o maior gene localizado nesta região, pertence a uma família de ARN helicases altamente conservada (DEAD-box), com numerosos membros no genoma humano (De la Cruz *et al.*, 1999). Este gene é composto por 2 transcritos, o transcrito alternativo 1, que é o mais curto e é expresso apenas nos testículos e o transcrito alternativo 2 com expressão ubíqua (Lahn & Page, 1997; Foresta *et al.*, 2000). Porém, a proteína é detetada apenas na linha germinal do sexo masculino, predominantemente no citoplasma de espermatogônias e eventualmente no citoplasma de alguns espermátocitos no estágio de pré-léptoteno/ léptoteno (Ditton *et al.*, 2004). Pensa-se que DBY está envolvido no desenvolvimento das células germinais pré-meióticas (Vogt, 2005).

A expressão preponderante da proteína DBY em espermatogónias, mostra que, homens com deleções AZFa, mais especificamente no gene DBY, apresentam esta deleção como sendo causa mais provável da sua patologia testicular grave (Ditton *et al.*, 2004).

Foresta e os seus colaboradores na sua pesquisa constataram que o gene DBY é o gene mais frequentemente deletado em homens com deleção na região AZFa e este facto vem reforçar o seu papel crucial na espermatogénese (Floresta *et al.*, 2000).

Deleções parciais AZFa, com o gene DBY deletado, têm sido relatadas como sendo responsáveis por uma ampla gama de alterações na fertilidade desde oligozoospermia a azoospermia com fenótipo característico de SCOS no testículo.

Alguns autores afirmam que o gene DBY apresenta maior relevância no processo espermatogénico que o gene USP9Y (Kleiman *et al.*, 2012; O'Brien *et al.*, 2010).

O gene UTY abrange 9 repetições de tetratricopéptidos denominadas TPR, expressos de forma ubíqua em X-degenerado (Ginalski *et al.*, 2004). Alguns autores não abordam este gene quando se referem a AZFa, assumindo apenas DBY e USP9Y como genes pertencentes a esta região (Kleiman *et al.*, 2012).

Além destes genes da região AZFa, existe uma sequência anonimamente expressa denominada AZFaT1, foi mapeada e transcrita numa larga variedade de tecidos. Deleções em DFFRY e/ou AZFaT1 estão relacionadas com oligozoospermia e a perda adicional de DBY associa-se ao fenótipo mais crítico de SCOS (Sargent *et al.*, 1999).

Contudo devido à raridade de deleções AZFa, em termos de ocorrência em homens inférteis, é difícil caracterizar o papel dos genes desta região e a sua função específica na falha espermatogénica (Lin *et al.*, 2001; Kleiman *et al.*, 2012).

1.4.1.2. AZFb

As deleções no intervalo AZFb são originadas por recombinação homóloga entre os palíndromos P5 e P1 proximais, daí renomeadas de deleções P5/proximal P1 (Simoni *et al.*, 2004) (Figura 11).

Estendendo-se por cerca de 6,2Mb de comprimento, possuindo um intervalo de sobreposição com AZFc correspondente a 1,5Mb (Repping *et al.*, 2002). AZFb proximal apresenta grandes repetições diretas e invertidas organizadas em palíndromos, mas a maior parte consiste em sequências de cópia única (Ferlin *et al.*, 2003).

Os amplicões da região AZFb são divididos em 6 famílias e em 14 unidades de amplicões, metade deles (yel3, yel4, b5, b6, b1, t1, t2) são exclusivos de AZFb, e o restante é partilhado com AZFc. De acordo com esta nomenclatura, uma deleção AZFb completa (P5/proximal P1) corresponde ao intervalo entre os amplicões yel3 e yel1 (Navarro-costa *et al.*, 2010).

Deleções AZFb clássicas ocorrem através de crossing-over desigual entre segmentos homólogos nas suas extremidades (Soares *et al.*, 2012).

Numa porção específica do cromossoma Y, a região AZFb é composta por um conjunto de genes e transcritos cujas deleções individuais destas sequências podem ser a causa da falha espermatogénica, nomeadamente associada à paragem do desenvolvimento de células germinais na fase de paquíteno (Vogt, 2005; Ho-Su Sin *et al.*, 2011; Ambulkar *et al.*, 2014). Exclusões na região AZFb estão também relacionadas com a azoospermia, sendo esta uma consequência da paragem de maturação (PM) durante a primeira prófase da meiose, concluindo que esta região é crucial para a desenvolvimento eficiente da meiose na espermiogénese. (Longepied *et al.*, 2010; Soares *et al.*, 2012).

A análise de grandes deleções no cromossoma Y, resultante de recombinação homóloga entre P5/distal P1 ou entre P4/distal P1, incluindo AZFb e parte da região AZFc (AZFbc), têm revelado que estes palíndromos servem como substratos para a recombinação homóloga não-alélica na maioria dos casos (Repping *et al.*, 2002; Writzl *et al.*, 2006). Uma deleção maior P5/distal P1 ocorre entre os palíndromos P5 e P1.1 culminando na perda quase total do intervalo AZFc (Soares *et al.*, 2012).

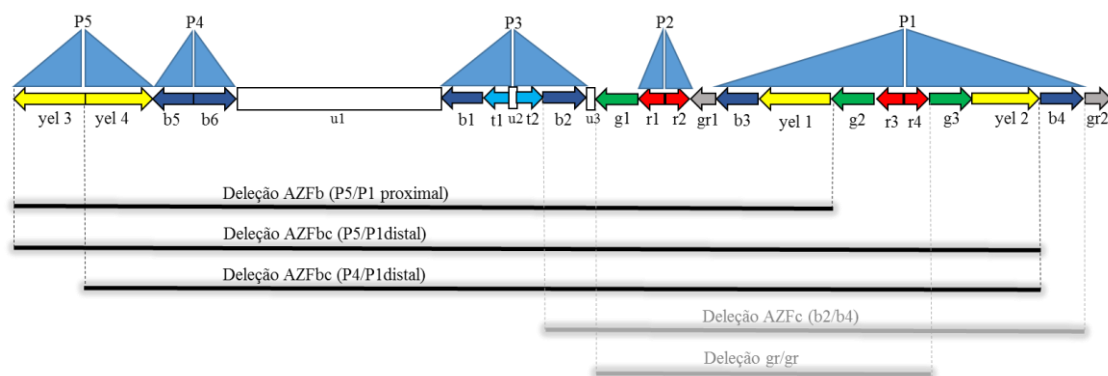


Figura 11: Região AZFb composta pelos palíndromos P5 e P1 proximal, deleção AZFbc constituída pelos palíndromos P5 e P1 distal ou pelos palíndromos P4 e P1 distal.

Na região AZFb há um conjunto de genes envolvidos na espermatogénese e que codificam proteínas conhecidas. Deste conjunto fazem parte os genes EIF1AY, RPS4Y2, e SMCY que estão localizados na eucromatina X-degenerada, e HSFY, XKRY, PRY e RBMY que estão situados nas regiões amplicónicas (Sadeghi-Nejad & Farrokhi, 2007).

Dentro dos genes de cópia única englobamos o gene CYorf15, EIF1AY, RPS4Y2 e o gene KDM5 (Navarro-Costa *et al.*, 2010).

O gene CYorf15 (*Chromosome Y Open Reading Frame 14*), subdivide-se em CYorf15A (*Chromosome Y Open Reading Frame 15A*) e CYorf15B (*Chromosome Y Open Reading Frame 15B*), a função deste gene é ainda desconhecida (Navarro-Costa *et al.*, 2010). São expressos em múltiplos tecidos e apresentam homólogos no cromossoma X, denominados X-cXorf14, X-cXorf15A, X-cXorf15B respetivamente. Os transcritos CYorf15A e CYorf15B degeneraram por divisão e evoluíram a partir do mesmo gene ancestral CXorf15 e estão expressos em vários tecidos (Vogt, 2005).

O transcrito EIF1AY (*Essential Initiation Translation Factor 1AY*) desempenha funções como fator de iniciação da transcrição, tendo efeitos pleiotrópicos em diferentes passos da via de iniciação, aumentam a dissociação do ribossoma em subunidades e estabilizam a ligação ao complexo 43S. Apresenta expressão em múltiplos tecidos e tem um homólogo no cromossoma X (EIF1AX), muitas das funções descritas são em grande parte deduzidas por similaridade com EIF1AX (Chia-Lin Wei, 1995; Vogt, 2005; Navarro-Costa *et al.*, 2010).

O gene RPS4Y2 (*Ribossomal protein S4 Y linked 2*) é uma duplicação do gene RPS4Y. Tem a função de proteína ribossomal S4, é expresso em múltiplos tecidos e apresenta uma cópia funcional no Yp11 distal (RPS4Y1) (Vogt, 2005). É sugerido que a expressão deste gene desempenhe um papel putativo na regulação pós-transcricional da espermatogénese (Navarro-Costa *et al.*, 2010).

O gene KDM5D (*lysine(K)-specific demethylase 5D*) codifica uma Histona (H3K4) que forma um complexo de proteínas com o fator de reparação de ADN (MSH5) durante a espermatogénese (Akimoto *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007). A atividade da histona H3K4 desmetilada foi detetada no gene SMCY numa linha de células germinativas testiculares do ser humano. Abordagens bioquímicas mostram que o gene SMCY forma um complexo com MSH5 que parecem funcionar em cooperação num estágio de desenvolvimento específico antes do início da meiose (Akimoto *et al.*, 2008). O gene SMCY (*Selected Mouse C DNA Y*)

codifica um antígeno de histocompatibilidade no cromossoma Y, com expressão em vários tecidos e possui um homólogo no cromossoma X (SMCX) (Vogt *et al.*, 2005).

O gene KDM5D está envolvido na remodelação da cromatina na célula germinal e na condensação do cromossoma durante a meiose. Estes pressupostos estão de acordo com o facto de se verificar paragem de maturação na fase espermatócito associada a deleções AZFb (Navarro-Costa *et al.*, 2010).

Os genes com múltiplas cópias são: CDY, PRY, RBMY1, HSFY, BPY2 e XKRY (Navarro-Costa *et al.*, 2010). As cópias CDY1 e CDY2 fazem parte do gene CDY (*Chromodomain Y2*), pertencem a uma família de genes que codificam proteínas da cromatina e histonas-acetil-transferase, é expresso só nos testículos, a cópia CDY1 está localizada na região AZFc (amplificações yel1 e yel2) e a cópia CDY2 em AZFb+Yq11-D11 (amplificações yel3 e yel4) (Vogt *et al.*, 2005). Uma redução significativa na concentração da proteína total CDY pode interferir com a transição de histona para protamina durante a espermiogénese (formação de espermatozoides maduros a partir de espermatídeos) contribuindo assim para o insucesso do processo espermatogénico (Lanh *et al.*, 2002).

Ao gene PRY (*PTP-BL Related Y*) correspondem as cópias PRY1 e PRY2, que codificam proteínas tirosina fosfatase, este transcrito é expresso apenas no testículo, localizado em AZFb e em AZFc (pseudogenes) e não partilha homólogos com o cromossoma X. Cada cópia do gene PRY compreende 5 exões. Esta família de genes localiza-se entre os amplificações b1 e b2 e está envolvida na regulação da apoptose, um processo essencial que remove células espermáticas anormais da população de espermatozoides (Vogt, 2005; Navarro-Costa *et al.*, 2010)

O gene RBMY1 (*RNA-Binding Motif Y-Linked*), antes denominado YRRM (*Y chromosome RNA recognition motif*), contém várias cópias na região AZFb do cromossoma Y, e a proteína codificada por este gene está envolvida na espermatogénese. A maioria das cópias deste locus são pseudogenes, embora seis cópias altamente semelhantes têm ORFs (*Open Reading Frames*) e são considerados funcionais. Entre as cópias funcionais, quatro cópias são encontradas dentro de repetições invertidas (IR2) e duas cópias são encontradas no palíndromo P3. RBMY é expresso em células germinativas dos testículos do feto, de adolescentes e de adultos e participa no splicing em espermatócitos. Dentro do intervalo Yq11, este gene está localizado em AZFb e AZFc (pseudogenes), este gene apresenta homólogos no cromossoma X (RBMX) (Venables *et al.*, 2000; Vogt, 2005; Miyamoto *et al.*,

2012). Este foi o primeiro entre os genes candidatos em AZFb a ser identificado. As proteínas RBMY, no N-terminal, contêm um único domínio ligação ARN do RRM (*RNA Recognition Motif*), responsável pela interação com as moléculas de ARN alvo (Navarro-Costa *et al.*, 2010). Contém ainda quatro caixas SRGY (*Sequência de serina-arginina-glicina-tirosina*) no domínio C-terminal que se pensa servir como um provável região reguladora para a modulação da função do gene RBMY1 (Poongothai *et al.*, 2009; Navarro-Costa *et al.*, 2010).

O estudo de deleções deste gene permitiu concluir que a persistência de ambas as cópias RBMY1 proximais, é suficiente para evitar uma falha completa na espermatogênese com paragem da meiose (PM), e que a produção de espermatozoides é viável, sendo importantes para a normal fertilidade do homem (Kostiner *et al.*, 1998; Plotton *et al.*, 2010). Por outro lado, algumas pesquisas observaram que o desenvolvimento de células germinativas até à meiose foi observado na ausência de expressão quantitativa de RBMY, concluindo que este gene não é essencial para o desenvolvimento até as fases meióticas da espermatogênese (Elliot *et al.*, 1997). Contudo, a família de genes PRY e RBMY são os principais genes da espermatogênese em AZFb, genes específicos com mutações "de-novo" ainda não foram encontrados nestas famílias de genes (Vogt, 2005).

O gene HSFY (*Heat Shock transcription Factor, Y chromosome*) produz, por splicing alternativo, dois transcritos diferentes que codificam duas proteínas (HSFY1 e HSFY2). HSFY1 contém 401 aminoácidos e HSFY2 codifica uma proteína com 203 aminoácidos. Este gene é expresso nos testículos e nos rins e não contém homólogos no cromossoma X (Vogt *et al.*, 2005; Ferlin *et al.*, 2006).

HSFY1 e HSFY2 são os únicos genes codificantes dentro do palíndromo P4 (Kichine *et al.*, 2012). Apresenta 2 cópias ativas nos amplicões b5 e b6 (Navarro-Costa *et al.*, 2010). O gene HSFY é representado por um domínio de ligação ao ADN do tipo HSF relacionado com o gene HSF2 no cromossoma 6 (Ferlin *et al.*, 2006). A família HSF é constituída por reguladores altamente conservados, tendo a função de ativadores da transcrição de determinadas proteínas (Witzl *et al.*, 2006). Estudos que analisaram a região em volta do gene HSFY mostraram, que toda a região, incluindo TTY9, HSFY e sequências PRY, é duplicada em dois *clusters* em AZFc (palíndromas P1 e P3), conservando a mesma disposição em AZFb (Tessari *et al.*, 2004).

Várias características sugerem que HSFY tem papel relevante na espermatogênese humana (Tessari *et al.*, 2004). Outros autores afirmam que na ausência de outros fatores de risco (idade, anomalias cromossômicas, efeitos ambientais ou redução da fertilidade feminina), a perda da expressão do gene HSFY, por si só, não aumenta significativamente a incidência da infertilidade masculina, no entanto a ausência de HSFY pode influenciar a expressão fenotípica de certas variantes alélicas de genes envolvidos na formação flagelar (Kichine *et al.*, 2012).

O Gene BPY2 (*Basic protein Y*), está expresso unicamente nos testículos, localizado em duas regiões, em AZFc proximal e AZFb distal. Este transcrito não possui homólogos no cromossoma X (Vogt, 2005).

O gene XKRY (*X-kell blood group precursor related Y*) tem duas cópias ativas em yel3 e yel4 e codifica proteínas de transporte membranar. Encontra-se expresso apenas nos testículos, em termos de localização genética está situado em AZFb+Yq11-D11, este gene não possui homólogos no cromossoma X (Vogt, 2005).

Verifica-se que ocorre hipoespermatogênese (HP) quando todos os genes AZFb são excluídos, exceto para RBMY e PRY que codificam proteínas primárias. Tendo em conta a proximidade entre AZFb e AZFc algumas deleções dentro de AZFc podem remover várias cópias de genes RBMY. Por outro lado, deleções em AZFb geralmente anulam alguns genes da região AZFc como DAZ1 e DAZ2 (Hamada *et al.*, 2013).

A família de transcritos TTY (*Testis Transcript Y*) também faz parte deste intervalo AZFb, é suposto ser exclusiva e predominantemente expressa no testículo, no entanto alguns estudos recentes mostram que alguns destes genes não são somente específicos do testículo. Genes TTY estão dispersos ao longo das regiões X-amplicônica e X-degenerada do cromossoma Y (Ho-Su Sin *et al.*, 2011). Dentro da família TTY, da região AZFb fazem parte, TTY2, TTY5, TTY6, TTY9, TTY10, TTY12, TTY13, TTY14 e TTY16 (Vogt, 2005). TTY2 apresenta cópias no Yp11 proximal, TTY9 é expresso nos testículos e nos rins, TTY10 é expresso numa grande variedade de tecidos exceto no ovário (Vogt, 2005; Ho-Su Sin *et al.*, 2011).

Não há ainda um consenso sobre a função concreta dos genes envolvidos na espermatogênese e conseqüentemente na infertilidade, vários estudos foram conduzidos para tentar chegar a uma relação direta genótipo-fenótipo, no entanto os resultados das diferentes pesquisas nem sempre são concordantes. Porém o fenótipo de paragem de maturação

associada a deleções AZFb deriva não só de defeitos estruturais dos cromossomas (deleções) mas também da perturbação genética, como deficiências no emparelhamento, não podemos dissociar estas duas causas, em associação estas originam o fenótipo de paragem de maturação (Navarro-Costa *et al.*, 2010).

Em suma, a importância de uma região proximal AZFb intacta, foi sugerida como sendo necessária para o sucesso da espermatogénese (Costa *et al.*, 2008).

1.4.1.3. AZFc:

A região AZFc está localizada na parte distal do intervalo 6 (Subintervalos 6C-6E) no cromossoma Y, é composta inteiramente por amplicões sendo por isso particularmente suscetível a deleções totais e parciais, estas últimas surgem a partir NAHR (*Non-allelic homologous recombination*) entre as unidades mais internas (Ho-Su Sin *et al.*, 2011; Navarro-Costa *et al.*, 2010).

Microdeleções na região AZFc são as mais comumente encontradas em homens com azoospermia não-obstrutiva, ocorrendo em 13% dos casos de azoospermia e em 6% dos homens com oligozoospermia severa (Parekattil & Agarwal A., 2012).

Estruturalmente, a região AZFc contém um grande palíndromo (P1) e um menor (P2) e ainda o segmento de amplicões b2-u3-g1, deleções nesta região são originadas por recombinação homóloga entre os amplicões b2 e b4 situados nos palíndromos P3 e P1 respetivamente (Navarro-Costa *et al.*, 2010) (Figura 12).

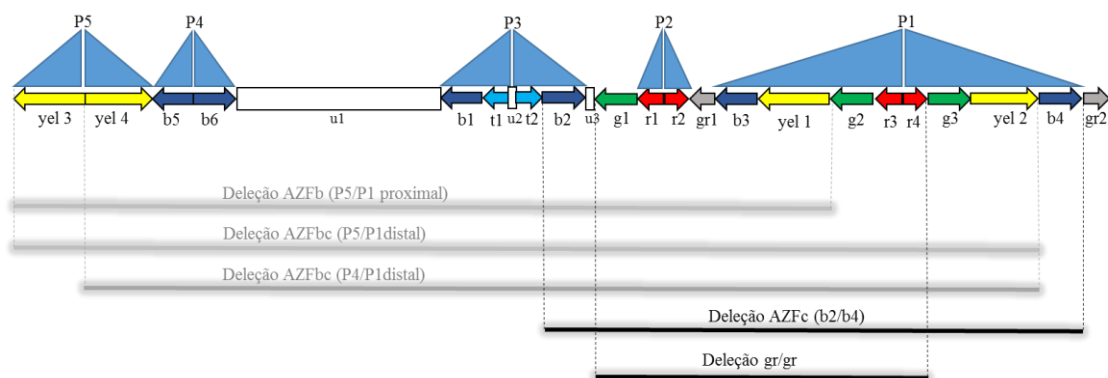


Figura 12: Região AZFc constituída pelos palíndromos P1, P2 e P3 distal, mais especificamente deleções em AZFc são denominadas por deleções b2/b4 pois abrangem o espaço ocupado entre estes dois amplicões. E deleções gr/gr abrangem os amplicões g1/r1/r2 e g2/r3/r4.

Esta região abrange 3,5 Mb e contém 12 membros de 8 famílias de genes (RBM1, BPY2, DAZ, CDY1, PRY, CSPGLY, GOLGA2LY, TTTY3, TTTY4 e TTTY17).

Deleções nesta região estão associadas a uma ampla gama de características fenotípicas que vão desde a azoospermia leve a oligozoospermia severa, passando por SCOS (*Sertoli-Cell-Only Syndrome*), paragem no desenvolvimento das células germinativas em fase de espermatóides e PM (paragem de maturação) (Thangaraj *et al.*, 2003; Repping *et al.*, 2004; Poongothai *et al.*, 2009; Ambulkar *et al.*, 2014).

Estas conduzem a diferentes graus de insuficiência espermatogénica, com uma variabilidade significativa entre indivíduos, variando desde a ausência de células germinais no testículo à presença de espermatozoides no ejaculado. No entanto, apesar de nestes pacientes a presença de espermatozoides no ejaculado ser um evento frequente (em 50 a 60% dos casos), a conceção natural é extremamente rara, devido à baixa concentração espermática (Giachini *et al.*, 2005; Navarro-Costa *et al.*, 2010).

O gene BPY2 (*Basic Protein Y2*) também denominado VCY2 (*Variable Charge, Y Chromosome 2*) constituído por 9 exões, com uma extensão de 21kb (apenas 5 exões são traduzidos em aminoácidos), apresenta 3 cópias (BPY2.1, BPY2.2 e BPY2.3 localizadas na ampliação g1, g2 e g3 respetivamente), é expresso apenas no testículo, e a proteína codificada interage com a proteína ubiquitina ligase E3A (UBE3A) estando envolvida no desenvolvimento de células germinativas na espermatogénese (Stuppia *et al.*, 2001; Tse *et al.*, 2003; Vogt *et al.*, 2005).

Foi ainda proposto que este gene em cooperação com um membro da família de proteínas associadas a microtúbulos (MAP1S) controlam a rede do citoesqueleto em células germinativas masculinas (Wong *et al.*, 2004; Orbán-Németh *et al.*, 2005).

A proteína codificada por este gene tem uma localização nuclear ao longo de todos os estágios de desenvolvimento das células germinativas no homem, e persiste no esperma ejaculado (Tse *et al.*, 2003).

Em AZFc apenas dois genes (CSPG4LY e GOLGA2LY) são exclusivos deste intervalo, os restantes são partilhados. Este facto pode explicar a razão da patologia testicular mais grave estar associada a deleções completas em AZFb quando comparado com deleções completas AZFc (Vogt *et al.*, 2005). Estas unidades de transcrição estão localizadas no interior de cada braço no palíndromo P1, num segmento de 80 kb (Kuroda-Kawaguchi *et al.*, 2001).

O gene CSPG4LY (*Chondroitin sulphate, proteoglycan 4 like Y*), expresso apenas nos testículos, codifica proteínas com função homóloga das caderinas, e o gene GOLGA2LY (*Golgi autoantigen golgin subfamily a2 like Y*), apresenta duas cópias GOLGA2LY.1 e GOLGA2LY.2, expresso apenas nos testículos e codifica proteínas com função homóloga à matriz proteica CIS GOLGI (Vogt *et al.*, 2005).

O gene CDY1 (*Chromodomain Y2*), expresso apenas nos testículos, apresenta 2 cópias e pertencem a uma família de genes que codificam proteínas da cromatina e histonas-acetil-transferase, localizado nos amplicões yel1 e yel2 (Vogt *et al.*, 2005). Dois genes CDY1 genes são mapeados na região AZFc, um dentro do *cluster* DAZ e a outro na extremidade distal. Esta observação é de extrema importância, uma vez que pelo menos uma cópia CDY1 é invariavelmente ausente em pacientes com deleções no gene DAZ (Poongothai *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2010). O papel deste transcrito na linha germinal masculina é de regulação da expressão do gene e remodelação nuclear pós-meiótica, e ainda foi proposto que este gene interage com a histona 3, metilada na lisina 9 (H3K9me2 e H3K9me3), embora o papel funcional exato desta interação seja desconhecido (Kim *et al.*, 2006). Apresenta ainda duas cópias autossômicas CDYL no cromossoma 6 e CDYL2 no cromossoma 16. As proteínas CDY contêm dois domínios funcionais: um domínio de ligação à cromatina N-terminal e um domínio catalítico C-terminal (responsável pela atividade de acetiltransferase dependente de CoA) (Navarro-Costa *et al.*, 2010).

Os genes da família TTY (*testis-specific transcript*) pertencentes a AZFc são: TTY3, TTY4 e TTY17, estes estão expressos apenas nos testículos, esta família é não codificante (Lu *et al.*, 2014).

A família de genes DAZ (*Deleted in Azoospermia*) corresponde a um regulador ativo da espermatogênese, através de mediação de transporte, transcrição/armazenamento, iniciação da tradução e função das proteínas (Navarro-Costa *et al.*, 2010). A alta prevalência de deleções DAZ em homens inférteis faz deste gene o principal candidato AZFc. Redução do número de cópias deste gene foi descrito como tendo um risco aumentado em subfertilidade e infertilidade (Vries *et al.*, 2002).

a) Os genes DAZ

Mutações em DAZ estão associados a 13% dos casos de infertilidade masculina humana. O tamanho do *cluster* do gene DAZ é de cerca de 380 kb, que consiste em sete

cópias, das quais, quatro estão situadas relativamente próximas no intervalo 6 do cromossoma Y (Yq11) (Poongothai *et al.*, 2009).

DAZ é a única unidade de transcrição encontrada consistentemente em homens azoospermicos com Yq deleções *de novo* (Reijo *et al.*, 1996). Este é o gene candidato mais provável causador de deficiência espermatogénica da região AZFc, pois codifica uma proteína de ligação ao ARN, que é importante para a espermatogénese (Navarro-Costa *et al.*, 2010). Na verdade, quase 10 anos antes de o sequenciamento do MSY, DAZ foi considerado o fator de azoospermia (Reijo *et al.*, 1995).

Quatro cópias deste gene são encontradas no cromossoma Y em duplicações palindrómicas, um par de genes é parte do palíndromo P2 e o segundo par é parte do palíndromo P1. Cada gene contém uma repetição de 2,4 kb incluindo um exão de 72 pb, chamado de repetição DAZ, o número de repetições é variável e existem muitas variações na sequência da repetição.

Em humanos, o gene DAZ pertence a uma família de genes que é constituída por três membros: DAZ no cromossoma Y, DAZ-like (DAZL) no braço curto do cromossoma 3 e BOULE no cromossoma 2 (Kim *et al.*, 2009; Hsu *et al.*, 2010).

DAZL é o gene homólogo autossómico do gene DAZ apresentando 83% de similaridade com este, localizado no braço curto do cromossoma 3 (Poongothai *et al.*, 2009).

O gene BOULE é provavelmente um regulador meiótico em seres humanos, pode funcionar como o principal regulador que controla a meiose na transição da fase G2-M através de interações deste com a proteína CDC25 (Xu *et al.*, 2003). Devido ao seu papel essencial para a transição meiótica e, portanto, para a produção de células germinativas haplóides aquando da espermatogénese masculina, BOULE pode ser considerado como um gene candidato a marcador molecular para a predição da espermatogénese completa (Kostova *et al.*, 2007).

A organização palindrómica das cópias do grupo DAZ está dividido em dois dupletos, um cluster mais proximal contendo DAZ1 e DAZ2 e outro cluster mais distal composto por DAZ3 e DAZ4 (Navarro-Costa *et al.*, 2010). Estas quatro cópias de genes DAZ existem em dois grupos, cada um composto por um par invertido (orientação 3' ← 5' e 5' → 3') de genes DAZ (Poongothai *et al.*, 2009). Dupletos de genes DAZ1/DAZ2 e DAZ3/DAZ4 estão localizados em dois domínios de sequências palindrómicas, separados por uma distância de 1,47 Mb. Palíndromos e repetições invertidas no genoma são

usualmente associadas à indução de instabilidades locais que dependem dos seus comprimentos e conteúdos de sequências repetitivas (Fernandes *et al.*, 2002).

Os quatro genes DAZ no cromossoma Y humano parecem possuir um total de 96 exões e 66 pseudoexões, já o seu progenitor autossômico, DAZL, é um gene convencionalmente estruturado, com apenas 11 exões (Saxena *et al.*, 2000).

A origem dos transcritos distingue-se pelo número de domínios de RRM (*RNA Recognition Motif*) e do tipo de sequências de repetição DAZ.

DAZ1 apresenta 744 a.a., contém três domínios RRM e uma repetição única DAZ tipo-Y, sendo o mais longo dos quatro genes, e a porção 5' da região codificante de DAZ1 consiste numa triplicação em tandem perfeita de uma unidade de 495 nucleótidos, que codifica um RRM, em DAZ4 este aparece duplicado (Saxena *et al.*, 2000; Kim *et al.*, 2009).

DAZ2 tem 559 a.a., tem um RRM e uma repetição DAZ tipo A. DAZ3 é constituído por 487 a.a., contém um RRM e uma repetição DAZ tipo-Y. Finalmente, DAZ4 é semelhante ao DAZ1 mas contém 579 a.a., dois RRM e uma repetição DAZ tipo-Y. Todas as 4 isoformas de DAZ são expressas no testículo humano (Kim *et al.*, 2009).

Alguns estudos suportam a hipótese de que cópias DAZ1/DAZ2 são funcionalmente mais importantes do que cópias DAZ3/DAZ4 (Fernandes *et al.*, 2002).

Foram identificadas várias proteínas que interagem com DAZ, a maior parte delas também exibe propriedades de ligação a ARN, sendo estas, DAZAP1 (*DAZ associated protein 1*), PUM2 (*pumilio homolog 2*), DZIP1 (*DAZ interacting protein 1*), DZIP3 (*DAZ interacting protein 3*) e DAZAP2 (*DAZ associated protein 2*). Uma característica interessante da família DAZ é que as proteínas podem interagir com outros membros sob a forma de homo ou heterodímeros, adquirindo assim vários padrões de interação que modulam o estado funcional da proteína (Ruggiu & Cooke, 2000; Navarro-Costa *et al.*, 2010).

Embora a maioria das deleções envolvam todos os quatro genes DAZ, uma ausência de apenas dois dos genes DAZ está também associada a falhas espermatogénicas, em pacientes com supressão da região AZFc, proteínas DAZ estão ausentes na cauda dos espermatozoides, estas têm um papel funcional como proteínas de controlo da tradução na fase final dos espermátides (Vogt *et al.*, 1998; Poongothai *et al.*, 2009). Além disso, as deleções DAZ não interferem com a produção de espermatozoides maduros embora os pacientes com esta deleção produzam espermatozoides em baixo número (oligozoospermia).

Isto sugere que as proteínas DAZ não são essenciais para a diferenciação terminal de células germinais masculinas, mas são necessários para a sua adequada função (Vogt *et al.*, 1998).

O Alinhamento de sequências de ADN dentro de AZFc revelaram a possibilidade de formação de pequenas subdeleções ou deleções parciais. A análise detalhada da região AZFc confirmou a existência destas três deleções, denominadas deleções gr/gr, b1/b3 e b2/b3 (Lynch *et al.*, 2005).

Deleções gr/gr são causadas por recombinação homóloga não-alélica, entre sequências de repetição g e r (mais precisamente entre os amplicões g1/r1/r2 e g2/r3/r4), resultando na perda de duas das quatro cópias do gene DAZ e uma das três cópias do gene BPY2 (Lynch *et al.*, 2005; Lu *et al.*, 2009). Nestas encontramos três tipos de padrão de exclusão: DAZ1 / DAZ2 + CDY1a, DAZ3 / DAZ4 + CDY1a e DAZ3 / DAZ4 + CDY1b.

Este grupo de deleções constituem um importante fator de risco para a falha espermatogénica e incluem deleções g1/g2 encontradas na estrutura de AZFc em homens oligozoospermicos e com deleções na dupla de genes DAZ1/DAZ2.

No grupo de deleções b2/b3, a supressão remove cerca de 1,8 Mb do segmento de ADN e é precedida por um evento de inversão (Lu *et al.*, 2009). Nesta encontramos dois tipos de padrão de exclusão: DAZ3 / DAZ4 + CDY1a e DAZ3 / DAZ4 + CDY1b. O resultado de deleções b2/b3 e b1/b3 é semelhante às deleções gr/gr, levando à retenção de duas cópias do gene DAZ e uma ou duas cópias do gene BPY2. A frequência de deleções gr/gr é significativamente mais elevada em homens inférteis sugerindo um possível efeito deletério deste polimorfismo na eficiência da espermatogénese, quando estas exclusões resultam na perda de CDY1a apresentam um maior fator de risco (Fernandes *et al.*, 2002; Giachini *et al.*, 2005; Repping *et al.*, 2003; Lynch *et al.*, 2005).

2. Objetivo

O objetivo do presente trabalho é apresentar os resultados clínicos e embriológicos de pacientes com microdeleções no cromossoma Y, tratados por microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), através do uso de espermatozoides testiculares a fresco (TESE) ou criopreservados e descongelados (TESE-C), e através do uso de espermatozoides do ejaculado (EJAC). A originalidade deste trabalho reside nas comparações efetuadas entre os diferentes tipos de microdeleções no cromossoma Y (AZFa, AZFb e AZFc) e os tratamentos efetuados (TESE, TESE-C, EJAC), com os detalhes dos resultados demográficos, de estimulação, embriológicos, clínicos e dos recém-nascidos.

Foi realizado o estudo de 128 pacientes com microdeleções na região AZF para averiguar se há diferenças significativas nos resultados entre os diferentes tipos de microdeleções realizando diferentes tratamentos de reprodução medicamente assistida (RMA). Este estudo representa uma das maiores séries em microdeleções no cromossoma Y. O estudo pormenorizado destes pacientes é uma forte mais-valia quer para a investigação quer para a clínica, na medida em que estes casos permitem-nos fazer inferências sobre o padrão de distribuição e características específicas destas microdeleções na população infértil masculina, o que conseqüentemente possibilita um aconselhamento clínico mais adequado.

3. Materiais e Métodos

3.1 Considerações éticas

Este trabalho não envolve experiências humanas ou animais. No desenrolar deste estudo os cuidados em termos éticos foram importantes na condução da pesquisa, com o consentimento informado e escrito de todos os casais, tendo sido obtidos antes do início do presente trabalho.

3.2 Seleção de pacientes

Os pacientes que representam a amostra deste estudo foram aqueles que frequentaram as consultas de infertilidade no Centro de Genética da Reprodução Prof. Alberto Barros, Porto, Portugal (CGR).

As análises genéticas dos pacientes foram realizadas no Departamento de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, Portugal. Foram avaliados, retrospectivamente, durante 19 anos (1995 a 2014) 128 pacientes com microdeleções no cromossoma Y. Os dados destes casais foram inseridos numa base de dados num ficheiro Excel. Para estes casais, a média de idade do sexo masculino foi de 34,8 (24-55) anos de idade. A análise de sémen (espermograma) foi feita, de acordo com o Manual da OMS de Análise do Esperma (WHO, 2010). O exame físico foi realizado com particular atenção ao volume testicular. Foi feita a medição dos níveis hormonais séricos masculinos (FSH, LH e testosterona) (Tabela 2). Destes pacientes, 65 realizaram tratamento fazendo biopsia testicular (TESE), seguida de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), enquanto 18 continham espermatozoides no ejaculado e realizaram ICSI.

Os resultados desses 83 pacientes foram o objeto de estudo do presente trabalho.

O cariótipo foi obtido utilizando bandas G e incluem a análise de pelo menos 30 metáfases de linfócitos do sangue periférico, de acordo com os protocolos gerais (Rooney & Czepulkowski, 1997). Os pacientes são classificados como azoospermicos se não há espermatozoides no ejaculado mesmo depois da centrifugação ou como oligozoospermicos severos se a concentração de espermatozoides é inferior a 1×10^6 espermatozoides/ml. Dos 128 pacientes, havia 25 cariótipos anormais (19,5%), 8 (6,3%, 32%, de 25; 100% de 8) pacientes com microdeleções AZFabc, 12 (9,4%, 48%, de 25; 54,5% dos 22) pacientes com microdeleções AZFbc (22 pacientes) e 5 (3,9%, 20%, de 25; 7,8% de 64) dos pacientes com microdeleções AZFc (64 pacientes) (Anexo 2).

3.3 Protocolos de estimulação

As mulheres foram submetidas a hiperestimulação ovárica controlada com um antagonista curto, GnRH (Cetrorelix; Merck Serono, Geneve, Suíça; Ganirelix; Organon, Oss, Holanda) protocolo utilizado na grande maioria dos casos, em que há Indução do crescimento folicular com a administração subcutânea do antagonista. Este protocolo atua na prevenção do pico precoce de LH, suprimindo a libertação de gonadotropinas. Para a estimulação foi usado essencialmente rFSH (Puregon; Organon; Gonal-F; Merck Serono).

O crescimento folicular é monitorizado por análises sanguíneas (estradiol) e ecografias, cujos resultados também permitem ajustar as doses dos medicamentos. Geralmente demora 1-2 semanas. Há boa resposta quando vários folículos (3-8 por ovário) atingem 17 mm. Cerca de 36 horas antes da recuperação de oócitos foi administrada a hormona HCG (5.000-10.000 UI, im/sc; Pregnyl; Organon) por uma injeção única intramuscular, para induzir a maturação dos ovócitos e o crescimento final dos folículos até 20-30 mm de diâmetro.

Seguidamente o especialista aspira os folículos ováricos por via endovaginal sob controlo ecográfico, efetua-se sob ligeira sedação endovenosa por anestesia.

Os níveis séricos de estradiol foram ensaiados no dia da administração de HCG ou um dia antes (Huirne *et al.*, 2007; Pinto *et al.*, 2009). A progesterona (comprimidos vaginais) prepara o endométrio para a implantação e é necessária porque a aspiração dos ovários remove a teca folicular.

3.4 Colheita de espermatozoides a partir do ejaculado

A colheita é feita por masturbação, a que se segue a lavagem e purificação dos espermatozoides fecundantes. Se o homem não conseguir masturbar-se por motivos psicológicos, a companheira pode ajudá-lo. Se falhar, deve ser dado um sedativo suave. Se a situação não se resolver, pode tentar em casa, desde que o transporte seja efetuado em menos de 30 minutos (com o recetáculo contendo o sémen à temperatura de 37°C: por exemplo, junto ao corpo, envolvido em toalha aquecida). Em alternativa, dá-se um preservativo especial (não tóxico para os espermatozoides) e o casal tem relações sexuais em casa, sendo o preservativo colocado no contentor estéril e transportado para o centro nas mesmas condições acima descritas. Se tudo falhar, cancela-se o ciclo e passa-se para a obtenção dos espermatozoides por biopsia testicular.

3.5 Biópsia testicular

A biópsia testicular aberta, para a recolha de espermatozoides, foi realizada com o bloqueio do cordão espermático (Li *et al.*, 1992, Gorgy *et al.*, 1998).

Para a preparação do tecido, pequenos fragmentos dos túbulos seminíferos testiculares foram fragmentados e comprimidos, e a fração de fluido resultante foi tratada, utilizando um tampão de lise de eritrócitos e efetuando a digestão enzimática com colagenase e ADNase (Crabbé *et al.*, 1998; Sousa *et al.*, 2002).

O volume de cada um dos testículos foi determinado por dois métodos sequenciais, primeiro utilizando orquidometro Prader (12 modelos sólidos elipsóides de 1-25 ml) e depois o usando o orquidometro com anéis elipsóides de 1-30 ml. O volume testicular foi considerado atrófico (A) quando o volume era inferior a 6 ml, hipotrófico (H) quando o volume varia entre 6-15 ml e normal (N) quando o volume era superior a 15 ml (Bujan *et al.*, 1989). A biópsia foi múltipla e extensa, com uma verificação microscópica preliminar das amostras (2 mm) no final de cada biópsia, sendo sempre o mais conservadora possível, a fim de manter o estado hormonal anterior dos pacientes. A recuperação foi suportada por uma procura exaustiva de espermatozoides nos fragmentos obtidos, após digestão enzimática.

Não houve complicações pós-operatórias. No fim da biópsia, o paciente faz analgésico oral. Em casa, durante dois dias, deve fazer 1g de paracetamol de 8/8h. Durante 1-2 dias não deve conduzir. Durante 1-2 semanas não deve praticar desportos e deve evitar relações sexuais. A TESE só pode ser repetida passados 6-12 meses para permitir a recuperação testicular.

Quanto ao volume testicular (testículo esquerdo/direito), dos 40 pacientes que tiveram recuperação de espermatozoides na TESE, havia 25 (62,5%) casos N/N, 3 (7,5%) casos N/H, 11 (27,5%) casos H/H e 1 (2,5%) caso H/A. Dos 25 pacientes sem recuperação de espermatozoides na TESE, havia 13 (52%) casos N/N, nenhum caso N/H, 11 (44%) casos H/H e 1 (4%) caso N/A.

Dos 128 pacientes, 65 realizaram TESE. A TESE foi unilateral em 23 casos (35,4%) e bilateral em 42 pacientes (64,6%), com 15 (23,1%) no testículo direito e 8 (12,3%) no testículo esquerdo. Nos 40 casos de recuperação de espermatozoides, a TESE foi unilateral em 20 casos (50,0%) e bilateral em 20 casos (50,0%), com 14 (35,0%) pacientes, em que apenas o testículo direito foi analisado, 6 pacientes (15,0%) onde apenas o testículo esquerdo

foi biopsiado e 20 (50%) pacientes, onde a intervenção foi bilateral. Nos 25 pacientes sem recuperação de espermatozoides ambos os testículos foram totalmente analisados.

3.6 Preparação dos espermatozoides provenientes do ejaculado

O sémen é colocado numa estufa humidificada a 37°C, durante 30 minutos, para o liquefazer (simulação da função vaginal). É depois purificado através de gradientes, por centrifugação, durante 30 minutos, para remover micro-organismos, leucócitos, células germinais imaturas e espermatozoides anómalos. Esta etapa corresponde à ação natural do muco cervical. De seguida, os espermatozoides purificados são recobertos por um meio de cultura especial, sendo incubados a 37°C. Ao fim de 1h, recolhem-se os espermatozoides que migraram ativamente até à superfície (fração swim-up), que são os com melhor morfologia e mobilidade. Esta etapa corresponde à ação natural das secreções uterinas e das trompas de Falópio. A fração swim-up é então colocada num cateter muito fino, mole e não-tóxico, num volume de 0,1-0,2 mL, contendo 500.000-1 milhão de espermatozoides hiperativados. No caso de sémen de dador, descongela-se a amostra e processa-se como acima descrito.

3.7 Criopreservação de espermatozoides testiculares

As células foram congeladas com *Sperm-Freezing-Medium* ou *Cryosperm* (Måløv, Dinamarca) na diluição de 1:1. As amostras foram aspiradas em palhetas rotuladas e vedadas (l'Aigle, França), depois colocadas em vapor de azoto líquido, finalmente imersas e armazenadas em azoto líquido.

3.8 Manipulação de gâmetas e embriões

A manipulação de gâmetas e embriões foi realizada com o meio MEDICULT (Jyllinge, Dinamarca) ou Vitrolife (Kungsbacka, Suécia). A microinjecção foi realizada num microscópio invertido (Nikon Diaphot 200; Nikon, Tokyo, Japão), equipado com uma placa térmica (37 ° C), óptica Hoffman (Nikon) e micromanipuladores Narishige (MO-188; Narishige, Tóquio, Japão), utilizando micropipetas de Swemed (Gotemburgo, Suécia).

A ICSI foi realizada utilizando o forte deslocamento do citoplasma (Tesarik *et al.*, 1994; Tesarik & Sousa, 1995). Após a aspiração dos ovários, selecionam-se os folículos

ovários e deixam-se repousar por 2 h. Depois, os folículos são desnudados (remoção das células foliculares) e deixam-se repousar por mais 2 h. De seguida, selecionam-se espermatozoides com morfologia normal e mobilidade progressiva rápida 4D. Cada um é depois lavado e imobilizado por esmagamento do flagelo (sem secção). Finalmente, injeta-se um espermatozoide/espermatídeo em cada ovócito. A fecundação e o desenvolvimento embrionário ocorrem *in vitro* numa incubadora.

A classificação do embrião foi avaliada de acordo com métodos descritos por Vandervorst *et al.*, 1998 e a classificação dos blastocistos segundo Gardner *et al.*, 2000. Embriões de dia 2-4 são classificados conforme o número de células e percentagem de fragmentos. Grau A: embriões com blastómeros de diâmetro similar e 0% de fragmentos. Grau B: embriões com <25% de fragmentos. Grau C: embriões com 25-50% de fragmentos. Grau D: embriões com > 50% de fragmentos. Só se devem transferir embriões C e D na ausência de embriões A/B e após uma ponderação cuidada caso a caso, uma vez que está descrito que estes embriões possuem uma maior percentagem de anomalias genéticas e conseqüentemente um menor potencial de implantação. Estes embriões não devem ser criopreservados. Os embriões de dia 5-6, denominados blastocistos, são classificados de acordo com o grau de expansão e o estado de *hatching* (implantação do embrião). Vão desde 1 a 6, sendo que 1 é um blastocisto inicial, com o blastocélio a ocupar menos de metade do volume do embrião. O estado 3 é descrito como blastocisto completo, em que o blastocélio preenche completamente o embrião. E o estado classificado como 6 é um blastocisto eclodido, o blastocisto foi expelido completamente da zona. Para blastocistos classificados de 3-6, o desenvolvimento da massa celular interna (ICM) e da trofoctoderme podem ser avaliados. Grau da ICM-A: bem empacotado, muitas células; B: pouco agrupadas, várias células; C: Muito poucas células. Grau da Trofoctoderme- A: Muitas células que formam um epitélio coeso; B-Poucas células; C: Muito poucas células que formam um epitélio solto (Gardner & Schoolcraft, 1999).

3.9 Suplementação Lútea

Todos as pacientes realizaram uma suplementação lútea com a administração intravaginal de 200 mg de progesterona natural micronizada, 8/8h (600 mg diários) (Jaba, Besins Int, Montrouge, França) com início no dia da colheita dos óvulos.

Na altura da transferência embrionária, o endométrio deve ter uma espessura de 10-12 mm (8-14 mm) e um aspeto trilamelar (característico da fase secretora) na ecografia. (Sá *et al.*, 2007).

A implantação foi confirmada por um aumento de β HCG no soro, 12 dias após a transferência do embrião.

A gravidez clínica foi estabelecida por ultra-sonografia com 6 semanas de gestação.

A progesterona (comprimidos vaginais aplicando de 8/8h) foi mantida até haver β HCG no soro e, em caso positivo, ele foi mantido até 12 semanas de gestação.

3.10 Screening do cromossoma Y

Deleções na região AZF foram detetadas por PCR através de sequence tagged sites (STS) dentro do Yq, em particular a região AZFa, AZFb e AZFc.

O ADN genómico foi obtido a partir de linfócitos de sangue periférico utilizando um método de salting out modificado (kit Citogene, Citomed, Lisboa, Portugal).

Microdeleções no cromossoma Y nas regiões AZFa, AZFb e AZFc, foram detetadas através do diagnóstico molecular de rotina do cromossoma Y segundo as Guidelines EAA/EMQN (Krausz *et al.*, 2014), usando uma sequência de locais marcados (STS) nos multiplexes PCR (Taq DNA polimerase da Thermo Scientific, Lituânia).

Embora não haja um consenso sobre o número de STS necessários para a deteção ideal de supressões AZF, foram usados os seguintes STS, abrangendo todas as regiões AZF e SRY: AZFa: sY84, USP9Y, DDX3Y (DBY) e sY88; AZFb: sY591, sY114, sY121, EIFIAY, sY134, sY135 e sY142; como a região AZFc é a mais frequentemente deletada e apresenta uma estrutura em palíndromo, foram utilizados mais marcadores STS: sY152, sY254, DAZ1, CDY1, BPY2, sY1206, sY157, sY1192, sY1291, sY1197 e sY1201. Os marcadores utilizados foram combinados em 4 diferentes multiplex-PCR e os resultados foram verificados por eletroforese capilar (QIAxcel, Qiagen, Hilden, Alemanha).

De acordo com a nomenclatura atual (Simoni *et al.*, 2004), as microdeleções do cromossoma Y têm vindo a ser renomeadas como AZFb (P5 / proximal P1), AZFb parcial (P4/proximal P1), AZFbc (P5/P1 distal ou P4/P1 distal), AZFc (b2/b4) e AZFc parcial (gr/gr; DAZ1/2). Todos os casos em que havia deleção na região AZFa e/ou AZFb em simultâneo com a presença de espermatozoides, foi repetido o PCR para confirmar estes casos.

3.11 Análise estatística

O estudo estatístico foi realizado usando o software STATISTICA (Ver 12,6, STATSOFT, EUA) ou o PAST (Ver 3.05c, Hammer 2001, Norway), dependendo do tipo de análise e da conveniência (disponibilidade de testes e facilidade de operação).

Para a realização de testes paramétricos em variáveis contínuas, a normalidade e homogeneidade de variâncias dos conjuntos foram verificadas pelo teste de Shapiro-Wilk W e pelo teste de Levene, respectivamente. Sempre que necessário (para HCG e E2), os dados foram transformados de Logaritmo.

A análise de variância de uma via (One-Way ANOVA) foi aplicada para comparar os grupos de microdeleções (AZFa, AZFb e AZFc). Sempre que a ANOVA foi significativa, a análise post-hoc (comparações emparelhadas) foi realizada utilizando o teste de Newman-Keuls.

Como o "n" de alguns grupos de microdeleção é escasso (devido às diferenças na prevalência das três microdeleções), realizámos uma abordagem paralela não-paramétrica, usando o teste de Kruskal-Wallis ANOVA, sempre que este foi significativo, foram feitas posteriormente várias comparações entre pares um usando o Mann-Whitney U pairwise com sequencial Bonferroni correction of the *p-values*; como houve acordo entre as abordagens paramétricas e não-paramétricas, os níveis de significância são referidos apenas para a abordagem paramétrica.

Quando em certas ocasiões só há dados para dois grupos de microdeleção, as comparações entre os grupos foram feitas com o Student T-test para amostras independentes, e, para complementar, usou-se o teste de Mann-Whitney U; como ambas as abordagens estão de acordo, apenas se referem os valores de significância do teste paramétrico.

Em relação à análise de proporções, os grupos foram comparados através teste Z.

Os testes foram sempre de duas caudas, e as diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando o valor de $p < 0,05$. Mais detalhes da estatística podem ser encontrados em Zar (1996), Hammer (2015) e StatSoft (2013).

Uma análise estatística adicional foi realizada através do programa IBM SPSS *Statistics 20 para o Windows*, utilizando os testes qui-quadrado, teste exato de Fisher, 2 faces e as T-teste para amostras independentes de igualdade de médias, 2 faces.

4.Resultados

Durante o período deste estudo, foram realizadas 1387 análises de cromossoma Y na FMUP, e a percentagem de microdeleções foi de 1.2% AZFa (17 casos), 1.9% de AZFb (26 casos) e 6.1% de AZFc (85 casos). Destes 128 pacientes com microdeleções no cromossoma Y, a percentagem por tipo de microdeleção é de 13.3% em AZFa, 20.3% em AZFb e 66.4% em AZFc (Figura 13).

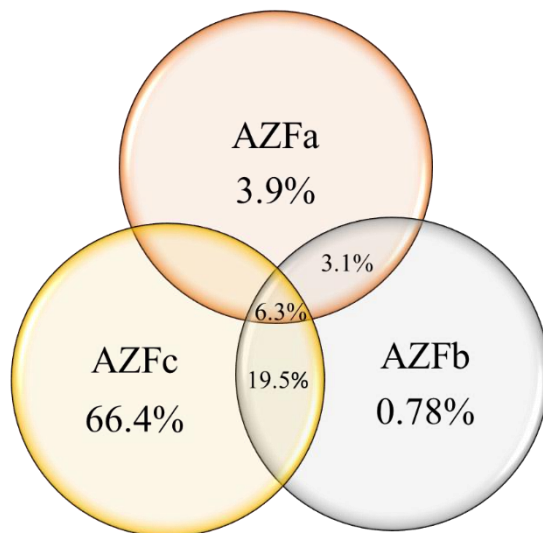


Figura 13: Distribuição de deleções na região AZF na amostra de pacientes deste estudo. As deleções AZFab e AZFabc e AZFa foram classificadas como AZFa. Tendo em conta que deleções AZFa= AZFa+ AZFab+ AZFabc; deleções AZFb= AZFb+ AZFbc; e deleções AZFc=AZFc. No total 13.3% dos pacientes tinham deleções na região AZFa, 20.3% tinham deleções na região AZFb e os restantes 66.4% apresentavam deleções na região AZFc.

Dos 128 pacientes, 33 apresentavam oligozoospermia severa (26.4%) e 92 apresentavam azoospermia secretora (73,6%) (Gráfico 1), destes, 3 pacientes foram apenas a consulta e não obtiveram um diagnóstico, ficando assim com uma amostra de 125 pacientes. Dos casos com oligozoospermia severa, 18 fizeram tratamentos com espermatozoides ejaculados e dos casos com azoospermia secretora, 65 fizeram TESE em que 40 tiveram sucesso na recuperação de espermatozoides. Por uma questão de conveniência AZFc e DAZ1/2 são ambos designados como microdeleções AZFc, ao longo do texto.

4.1 Cariótipos anormais

Dos 125 pacientes, 25 tinham cariótipos anormais (20.0%): 8 com deleções AZFabc (6.4%), 12 com deleções AZFbc (9.6%) e 5 com deleções em AZFc (4.0%) (Anexo 2). As taxas correspondentes por tipo de microdeleção são: 100% em AZFabc (todos os 8 pacientes

tinham cariótipo anormal), 54.5% dos 22 pacientes com microdeleção AZFbc e 6.1% dos 82 pacientes com microdeleção AZFc.

4.2 Casos específicos de microdeleções no cromossoma Y

A recuperação de espermatozoides em pacientes com microdeleções AZFa e AZFb é um evento raro, neste estudo temos alguns casos destes, que é de todo o interesse detalhar para explicar estas observações. Todos os casos nestas condições, repetiram a análise molecular para confirmar os resultados (Tabela 1).

O paciente que continha microdeleção AZFa e que obteve recuperação de espermatozoides, apresentava cariótipo normal, tinha uma deleção no gene DDX3Y (DBY) (Figura 14), e um diagnóstico de hipoespermatozoides (Tabela 2), com uma gravidez clínica de gémeos, de onde resultaram 2 recém-nascidos (NB).

Os 3 pacientes com microdeleção AZFb e com recuperação de espermatozoides, tinham um cariótipo normal, apresentam deleção isolada do gene DDX3Y (DBY) (2 casos com diagnóstico de paragem de maturação e um caso com hipoespermatozoides) (Tabela 2), em AZFa associada a uma deleção P4/P4 em AZFb (Figura 14). Nenhum destes casos obteve gravidez clínica.

O paciente com microdeleção AZFabc e com recuperação de espermatozoides, apresentava deleções completas das 3 regiões AZF (Tabela 1) e um cariótipo anormal, 46,X,del(Y) (Anexo 2). Como seria espectável, neste paciente não houve fertilização.

O paciente com microdeleção AZFb+DAZ apresenta cariótipo normal e microdeleção P5/P1 proximal abrangendo toda a região AZFb e parte da região AZFc (Figura 14). Tendo um diagnóstico de hipoespermatozoides (Tabela 3), apresentou uma amostra muito pobre no ejaculado e fez TESE, sem obter gravidez clínica.

Os dois pacientes com microdeleção AZFb+DAZ tinham oligozoospermia severa, apresentaram uma amostra muito pobre no ejaculado. Um caso apresentava cariótipo normal e uma microdeleção IR4/P2 distal (Figura 14), não obtendo sucesso na fertilização após ICSI. O outro paciente apresentava microdeleção IR4/P1 proximal (Figura 14), devido ao baixo número de espermatozoides encontrado no ejaculado fez TESE, obteve uma gravidez clínica que culminou em aborto no 1º trimestre de gravidez.

Os dois pacientes com microdeleção AZFbc e com recuperação de espermatozoides, apresentam microdeleção da região IR4/P1 distal (deleção parcial da região AZFb e deleção

total da região AZFc) (Figura 14) e cariótipo normal. Um caso apresenta raros espermatozoides no ejaculado, e alcançou uma gravidez clínica (trigêmeos) que terminou com aborto no 1º trimestre. O outro paciente apresentava um diagnóstico de hipoespermatogênese (Tabela 3), realizou TESE e não alcançou uma gravidez clínica.

Diagnóstico	Deleção	bc-EJAC	abc-PM	ab-PM	ab-HP	ab-PM	a-HP	bc-HP	bp+DAZ1,2-HP	bp+DAZ1,2-EJAC	b+DAZ1,2-HP
Genes do Cromossoma Y											
sY14 (SRY)											
ZFX/ZFY											
TSPY											
sY84 (DYS273)	AZFa		-								
USP9Y (DFFRY)	AZFa		-								
DDX3Y (DBY)	AZFa		-	-	-	-	-				
sY88 (DYS276)	AZFa		-								
sY591 (XKRY)	AZFb		-								-
sY114 (DYS206)	AZFb		-	-	-						-
sY121 (G38341)	AZFb		-	-	-						-
sY691 (EIF1AY)	AZFb	-	-			-					-
sY134 (DYS224)	AZFb	-	-						-		-
sY135 (DYS225)	AZFb	-	-						-		-
sY142 (DYS230)	AZFb	-	-					-	-	-	-
sY1197	AZFc	-	-					-	-	-	-
sY1192	AZFc	-	-					-	-	-	-
sY1291	AZFc	-	-					-	-		-
sY152	AZFc	-	-					-			
sY254	AZFc	-	-					-			
DAZ1	AZFc	-	-					-			
CDY1	AZFc	-	-					-			
BPY2	AZFc	-	-					-			
sY1206	AZFc	-	-					-			
sY157	AZFc	-	-					-			
sY1201	AZFc	-	-					-			

Tabela 1: Painel de microdeleções no cromossoma Y que foi avaliado. Casos de microdeleções AZFa e AZFb com recuperação de espermatozoides testiculares ou espermatozoides do ejaculado. ND- não disponível na época; EJAC- espermatozoides do ejaculado; HP- azoospermia secretora devido a hipoespermatogênese; PM- azoospermia secretora devido à paragem de maturação

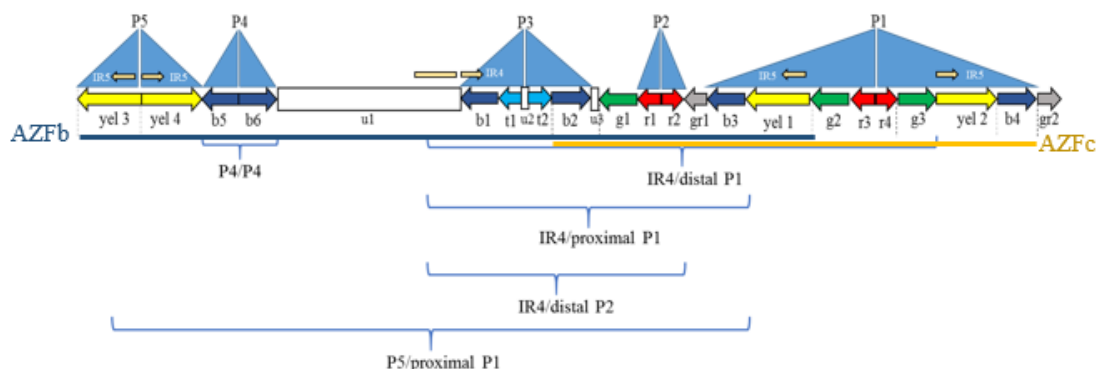


Figura 14: Estrutura palindrômica das regiões AZFb e AZFc.

Microdeleção na região AZFa	Fenótipo testicular	Localização da deleção
AZFabc	Paragem de maturação	Deleção completa
AZFab	Paragem de maturação	P4/P4 + deleção DBY
AZFab	Hipoespermatogénese	P4/P4 + deleção DBY
AZFab	Paragem de maturação	P4/P4 + deleção DBY
AZFa	Hipoespermatogénese	Apenas deleção DBY

Tabela 2: Casos específicos de microdeleções na região AZFa do cromossoma Y e com recuperação de espermatozoides.

Microdeleção na região AZFb	Fenótipo testicular	Localização da deleção
AZFbc	Ejaculado	IR4/ P1 distal
AZFbc	Hipoespermatogénese	IR4/ P1 distal
AZFbp+ DAZ 1,2	Hipoespermatogénese	IR4/ P1 proximal
AZFbp+ DAZ 1,2	Ejaculado	IR4/ P2 distal
AZFb+ DAZ 1,2	Hipoespermatogénese	P5/ P1 proximal

Tabela 3: Casos específicos de microdeleções na região AZFb do cromossoma Y e com recuperação de espermatozoides.

4.3 Características hormonais dos pacientes que realizaram TESE

Dos 65 pacientes que fizeram TESE, os espermatozoides foram recuperados em 40 pacientes (61,5%): em 5 dos 8 pacientes com deleção AZFa (62,5%), em 3 dos 13 pacientes com deleção AZFb (23,1%) e em 32 dos 44 pacientes com deleção AZFc (72,2%) (Tabela 4). Destes 40 casos que realizaram TESE e obtiveram espermatozoides recuperados, a

intervenção foi unilateral em 20 casos (50.0%), com 14 pacientes em que apenas houve intervenção no testículo direito e 6 pacientes em que apenas o testículo esquerdo foi analisado, e bilateral em 20 casos (50.0%). Nos 25 pacientes sem recuperação de espermatozoides ambos os testículos foram totalmente analisados.

Em relação à idade do sexo masculino, o tempo de infertilidade, os níveis séricos de FSH, LH e testosterona, e o número total de fragmentos testiculares analisados, comparações entre casos com e sem recuperação de espermatozoides, indicam que não há diferenças significativas, exceto nos níveis séricos de FSH, que são mais elevados nos casos sem recuperação de espermatozoides em AZFc (Tabela 4).

Parâmetros	Com recuperação de sz	Sem recuperação de sz	Valor de p ^a	Total
Total				
N	40	25	-	65
Idade Masculina (Anos)	34.03 ± 4.71 (26-44)	33.36 ± 5.02 (24-50)	0.591	33.77 (24-50)
FSH (IU/L)	12.55 ± 7.89 (3-40.3)	17.86 ± 8.73 (3.5-41.5)	0.014	14.59 (3-41.5)
LH (IU/L)	4.77 ± 2.04 (1.4-9.24)	5.81 ± 3.95 (2.2-14.72)	0.168	5.17 (1.4-14.72)
Testosterona (ng/ml)	7.85 ± 5.60 (2.52-33.1)	7.50 ± 3.40 (3.23-17.9)	0.779	7.72 (2.52-33.1)
Total de Fragmentos biopsiados (n)	12.38 ± 6.23 (5-26)	13.44 ± 3.57 (6-20)	0.440	12.78 (5-26)
AZFa				
N	5	3	-	8
Idade Masculina (Anos)	34.80 ± 4.38 (27-37)	32.67 ± 7.57 (24-38)	0.624	34 (24-38)
FSH (IU/L)	16.91 ± 15.46 (3.7-40.3)	22.69 ± 19.00 (3.5-41.5)	0.652	19.08 (3.5-41.5)
LH (IU/L)	3.62 ± 1.19 (2.8-5.4)	4.77 ± 2.19 (3.49-7.3)	0.364	4.05 (2.8-7.3)
Testosterona (ng/ml)	6.92 ± 4.96 (3.8-15.6)	6.34 ± 2.41 (3.88-8.7)	0.858	6.71 (3.8-15.6)
Total de Fragmentos biopsiados (n)	10.20 ± 8.53 (5-25)	11.00 ± 5.00 (6-16)	0.889	10.5 (5-25)
AZFb				
N	3	10	-	13
Idade Masculina (Anos)	33.67 ± 2.52 (31-36)	32.40 ± 2.91 (28-38)	0.513	32.69 (28-38)
FSH (IU/L)	10.10 ± 11.44 (3.2-23.3)	16.18 ± 7.94 (5.7-25.6)	0.310	14.78 (3.2-25.6)
LH (IU/L)	3.57 ± 2.85 (1.4-6.8)	5.87 ± 4.08 (2.2-13.6)	0.388	5.34 (1.4-13.6)
Testosterona (ng/ml)	5.11 ± 0.56 (4.59-5.7)	8.99 ± 4.46 (4.03-17.9)	0.173	8.09 (4.03-17.9)
Total de Fragmentos biopsiados (n)	13.67 ± 6.66 (6-18)	13.80 ± 3.65 (9-18)	0.964	13.77 (6-18)
AZFc+DAZ1,2				
N	32	12		44
Idade Masculina (Anos)	33.94 ± 4.99 (26-44)	34.33 ± 5.97 (27-50)	0.825	34.05 (26-50)
FSH (IU/L)	12.10 ± 5.92 (3-22.9)	18.05 ± 6.34 (6.7-27.63)	0.006	13.73 (3-27.63)
LH (IU/L)	5.06 ± 2.02 (1.8-9.24)	6.01 ± 4.37 (2.5-14.72)	0.326	5.32 (1.8-14.72)
Testosterona (ng/ml)	8.26 ± 5.94 (2.52-33.1)	6.55 ± 2.14 (3.23-10.2)	0.341	7.79 (2.52-33.1)
Total de Fragmentos biopsiados (n)	12.59 ± 5.97 (5-26)	13.75 ± 3.25 (10-20)	0.530	12.91 (5-26)

Tabela 4: Dados clínicos de pacientes com microdeleção no cromossoma Y e submetidos a TESE (Testicular Sperm Extraction). Os valores são representados da seguinte forma: média ± desvio padrão (mínimo-máximo).

O intervalo normal dos valores de **FSH** é de: 0.7-11.1 IU/L; O intervalo normal dos valores de **LH** é: 0.8-7.6 IU/L; O intervalo normal dos valores de **Testosterona** é de: 2.45-16 ng/ml.; ^a Diferenças Significativas ($p < 0.05$). sz- Espermatozoides

4.4 Relações entre SOZ/SAZ e o tipo de microdeleção no cromossoma Y

Dos 17 pacientes com microdeleção na região AZFa não houve casos SOZ, todos os pacientes apresentavam SAZ.

Dos 26 pacientes com microdeleção na região AZFb, houve 4 casos (15.4%) com SOZ e 22 casos (84.6%) com SAZ. Analisando estes casos SOZ, verificou-se que todos apresentavam um pequeno número de espermatozoides no ejaculado, 2 casos fizeram ciclos ICSI com espermatozoides do ejaculado, destes, 1 caso não obteve fertilização e o outro teve uma gravidez clinica de trigêmeos que terminou em aborto. O 3º caso fez TESE com uma gravidez que terminou em aborto. E por fim o 4º caso realizou um ciclo TESE, dois ciclos TESE-C e uma ICSI com espermatozoide do ejaculado, mas nenhuma gravidez progrediu.

Dos 82 pacientes com microdeleção na região AZFc, houve 29 casos (35.4%) com SOZ e 53 casos (64.6%) com SAZ. Destes casos SOZ, 12 preferiram não fazer tratamento e 1 realizou TESE. Dos restantes 16 pacientes tratados com ICSI usaram espermatozoides do ejaculado, no total realizaram-se 24 ciclos de onde resultaram 8 NB (Gráfico 1).

No total houve 92 casos SAZ e 33 casos SOZ.

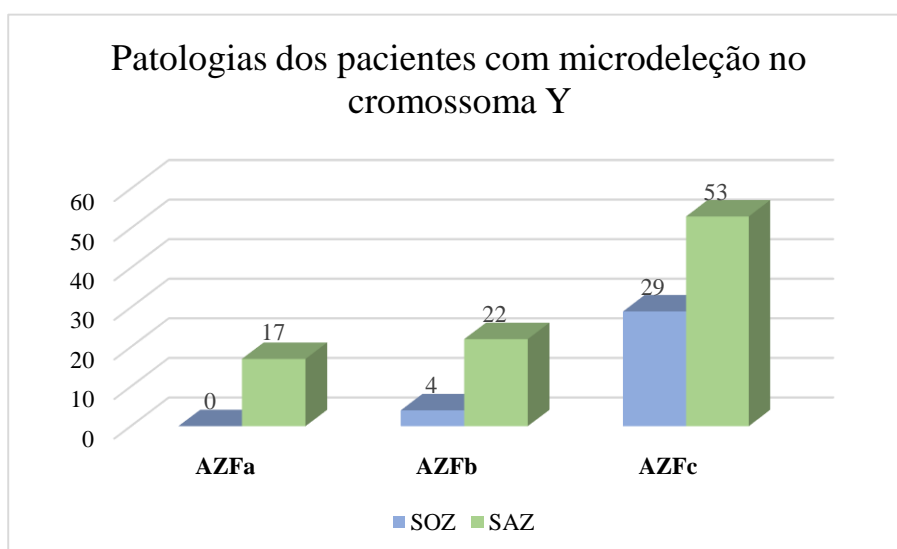


Gráfico 1: Patologias dos pacientes (Oligozoospermia severa (SOZ) ou Azoospermia secretora (SAZ)) com microdeleção na região AZFa, AZFb e AZFc.

4.5 Relações entre o fenótipo testicular e o tipo de microdeleção no cromossoma Y

Em pacientes com microdeleção AZFa, 4 foram diagnosticados com SCOS (3 com TESE negativa), 3 com PM (todos com TESE positiva) e 2 com HP (com TESE positiva).

Em pacientes com microdeleção na região AZFb, 10 foram diagnosticados com SCOS (9 com TESE negativa), 1 com PM (com TESE negativa) e 3 com HP (com TESE positiva em 2 SOZ). Dos pacientes com deleção AZFc, 17 apresentavam SCOS (7 com TESE positiva) 13 PM (11 com TESE positiva) e 16 HP (14 com TESE positiva) (Gráfico 2).

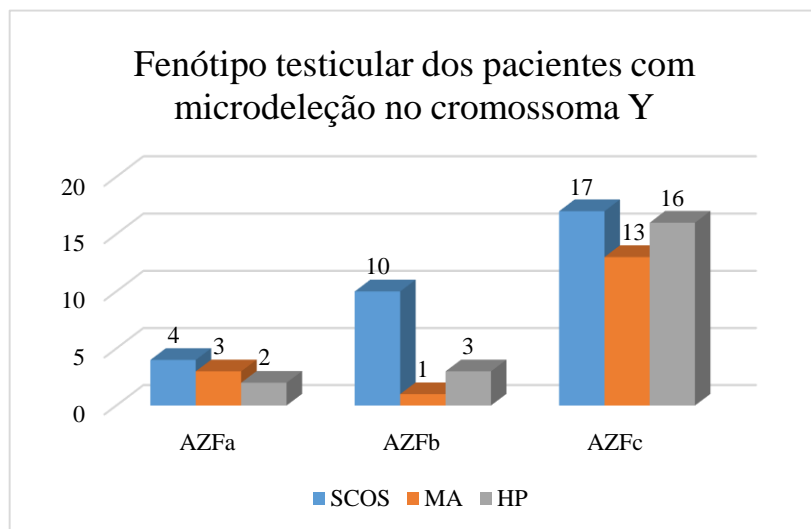


Gráfico 2: Fenótipo testicular (Síndrome de células de Sertoli (SCOS), Paragem de maturação (MA), Hipoespermatogénese (HP)) dos pacientes com microdeleção na região AZFa, AZFb e AZFc.

4.6 Características de estimulação de pacientes que fizeram tratamento

Em relação às características de estimulação das mulheres que realizaram ciclos de tratamento com TESE, no grupo AZFa observou-se uma dose total de gonadotrofina utilizada (DOSE TOTAL) e tempo de estimulação (DIAS TOTAL) significativamente maiores (Gráficos 3 e 4).

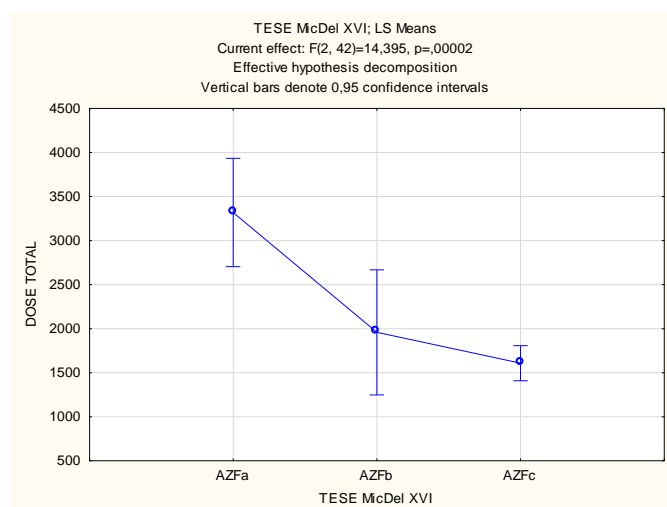


Gráfico 3: Resultado do teste estatístico “ANOVA de uma via” para a Dose total de Gonadotrofina administrada a mulheres, dos 3 grupos de microdeleções, cujos parceiros realizaram tratamento com TESE.

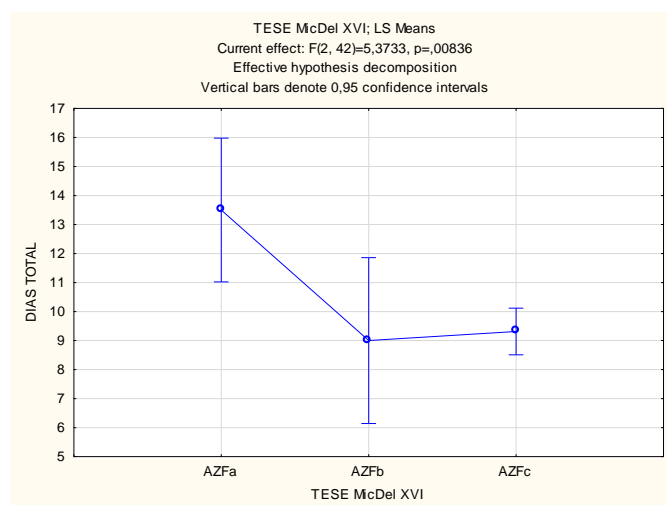


Gráfico 4: Resultado do teste estatístico “ANOVA de uma via” para os dias de estimulação aos quais foram sujeitas as mulheres, dos 3 grupos de microdeleções, cujos parceiros realizaram tratamento com TESE.

Para os ciclos de tratamento com TESE e posterior congelação dos espermatozoides (TESE-C), no grupo AZFa a idade das mulheres era significativamente mais elevada do que em AZFc, em AZFb os níveis de estradiol (logE2) foram significativamente menores e a dose de HCG (log HCG) foi significativamente mais elevada. Os valores das dosagens hormonais de Estradiol e HCG foram logaritmizados, pois os dados não eram homogêneos, nunca

deixando de fazer uma análise complementar não paramétrica que estava em concordância com os dados (Gráficos 5, 6 e 7).

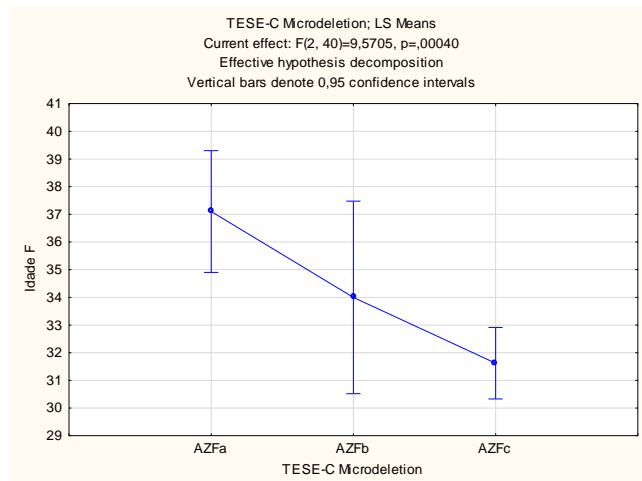


Gráfico 5: Resultado do teste estatístico “ANOVA de uma via” para a Idade das mulheres, dos 3 grupos de microdeleções, cujos parceiros realizaram tratamento com TESE-C.

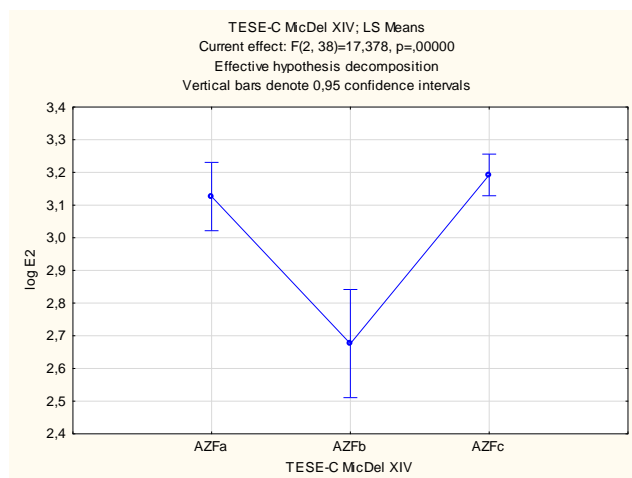


Gráfico 6: Resultado do teste estatístico “ANOVA de uma via” para Quantidade de Estradiol administrado mulheres, dos 3 grupos de microdeleções, cujos parceiros realizaram tratamento com TESE-C. Foi efetuada a transformação para o logaritmo dos valores para termos uma análise mais precisa.

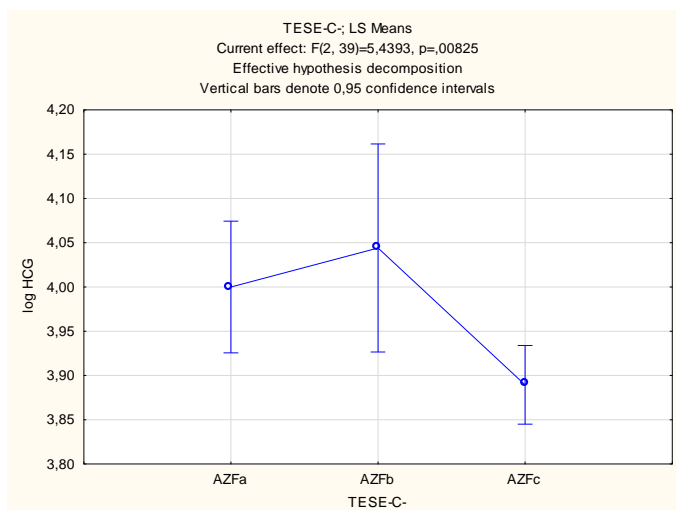


Gráfico 7: Resultado do teste estatístico “ANOVA de uma via” para a Quantidade de HCG administrado mulheres, dos 3 grupos de microdeleções, cujos parceiros realizaram tratamento com TESE-C. Foi efetuada a transformação para o logaritmo dos valores para termos uma análise mais precisa.

Para ciclos de tratamento com espermatozoides do Ejaculado não se observaram diferenças significativas em relação a todos os parâmetros analisados.

4.7 Resultados clínicos

No total houve 128 pacientes, 123 ciclos de tratamento, 112 embriões transferidos, 31 gravidezes clínicas (15 simples; 6 gêmeos), 27 NB (12 rapazes; 15 raparigas), com 2 NB em AZFa e 25 NB em AZFc.

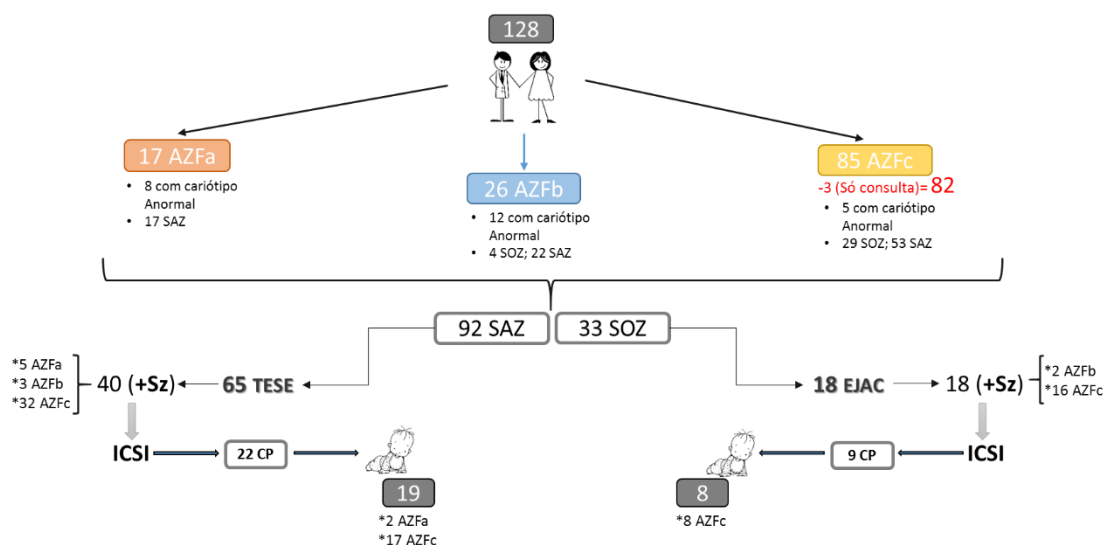


Figura 15: Esquema representativo da seleção e do plano de tratamento dos pacientes e os resultados obtidos. SAZ-azoospermia secretora; SOZ-oligozoospermia severa; TESE-biopsia testicular; Sz- espermatozoides;

+Sz- com recuperação de espermatozoides; ICSI- microinjeção intracitoplasmática de espermatozoides; CP- gravidez clínica.

Os 5 pacientes com microdeleção AZFa realizaram 15 ciclos de tratamento (12.2%) com espermatozoides testiculares (5 TESE: 10 TESE-C com 2 NB) (Gráfico 8).

Os 3 pacientes com microdeleção AZFb fizeram 7 ciclos de tratamento com espermatozoides testiculares (3 TESE; 4 TESE-C). Outros 3 pacientes com esta microdeleção fizeram 5 ciclos de tratamento com espermatozoides do ejaculado. Em todos os casos nunca se obtiveram recém-nascidos. No total, haviam 6 pacientes com microdeleção em AZFb, que realizaram 12 ciclos de tratamento (9.8%) (Gráfico 8).

Os 32 pacientes com microdeleção AZFc realizaram 72 ciclos de tratamento com espermatozoides testiculares (43 TESE com 12 NB; 29 TESE-C com 5 NB) (Gráfico 8).

Adicionalmente, houve 16 pacientes tratados com espermatozoides testiculares, com 24 ciclos de tratamento e 8 NB. No total houve 58 pacientes (1 paciente realizou TESE depois ICSI com espermatozoides do ejaculado) com microdeleções AZFc e realizaram 96 ciclos de tratamento (78.0%).

Em suma os tratamentos incluíram 51 ciclos com espermatozoides testiculares (41.5%), 43 ciclos com espermatozoides testiculares anteriormente congelados (34.9%) e 29 ciclos com espermatozoides do ejaculado (23.6%).

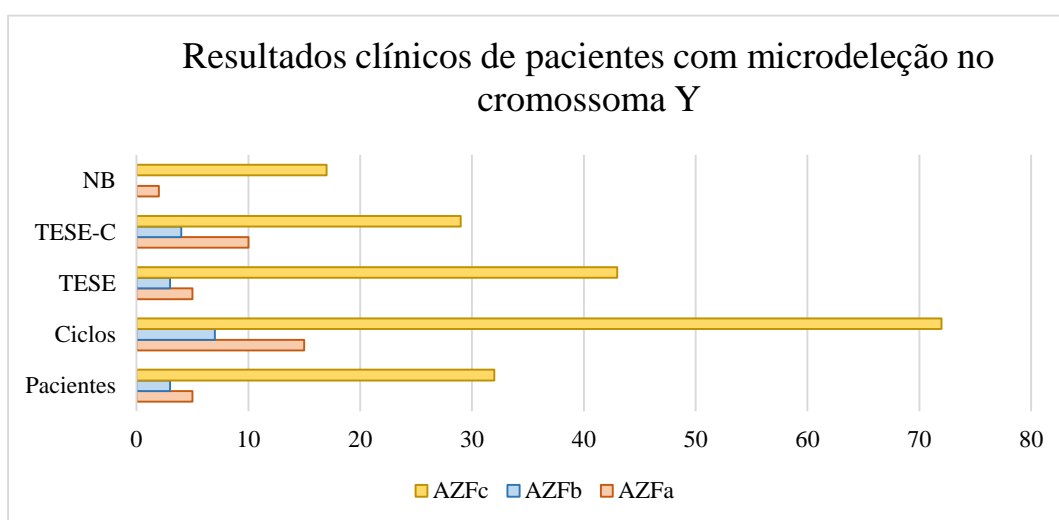


Gráfico 8: Resultados clínicos (número de recém-nascidos (NB), número de pacientes que efetuaram biopsia e posterior congelamento dos espermatozoides (TESE-C), número de pacientes que efetuaram biopsia (TESE), número de ciclos aos quais foram submetidos os pacientes e o número de pacientes no total) de pacientes com microdeleção no cromossoma Y.

4.7.1 Resultados clínicos com espermatozoides testiculares a fresco (TESE)

Pacientes com microdeleção AZFa evidenciam 92.3% de taxa de maturação, 66.7% de taxa de fertilização (FR), 93.8% de taxa de clivagem embrionária (ECR), 46.7% de embriões de alta qualidade e 12.5% de taxa de blastocistos. Houve 4 ciclos de transferência de embriões (ETC) mas nenhuma gravidez (Tabela 5).

Nos pacientes com microdeleção AZFb observa-se taxa de maturação de 89.5%, 47.1% de FR, 87.5% DE ECR, 71.4% de embriões de alta qualidade e 14.3% de taxa de implantação (IR). Houve 3 ETC, com uma gravidez clinica (CP) simples que terminou com um aborto (Tabela 5).

Pacientes com microdeleção na região AZFc apresentam 81.6% de taxa de maturação, 52.9% de FR, 95.7% de ECR, 67.3% de embriões de grau elevado e 27.4% de taxa de blastocistos. Houve 40 ETC com 37.5% de CP (n=15), 19.8% de IR, 13.3% de gémeos (n=2), 33.3% de taxa de aborto (n=5), 25% de gravidezes evolutivas (OP) e de taxa de nados vivos (LBDR) (N=10), 12 NB (30%), 0.5 de rácio entre Masculino/Feminino, e uma malformação classificada como *Major* (pé boto). Não houve gestações múltiplas, gravidezes ectópicas, nadomortos, óbitos neonatais precoces nem anomalias cromossómicas nos recém-nascidos (Tabela 5). Para todos os parâmetros dos resultados clínicos e embriológicos não houve diferenças significativas entre as microdeleções AZFa, AZFb e AZFc. Em AZFc a média da idade de gestação foi de 38.2 semanas com um caso de muito pré-termo (<32- ≥28 semanas) e 3 casos com baixo peso ao nascer (Tabela 6)

TESE	AZFa	AZFb	AZFc	Valor de p ^a
Pacientes (n)	4 + (1)	3	29 + (8)	
Ciclos (n)	5	3	43	-
COC (n, média, min-máx)	26 (5.2 ± 3.4) (3-12)	19 (6.3 ± 2.5) (3-9)	430 (10 ± 5.4) (0-25)	NS: a-0.728;b-0.308;c-0.263
MII (n, média, min-máx)	24 (4.8 ± 3.7) (2-12)	17 (5.7 ± 2.6) (2-8)	351 (8.4 ± 4.6) (0-22)	NS:a-0.758;b-0.418;c-0.341
Taxa de Maturação (MII/COC)	92.3	89.5	81.6	NS:a-0.744;b-0.166;c-0.381
2PN (n, média, min-máx)	16 (3.2 ± 2.6) (0-8)	8 (2.7 ± 0.9) (2-4)	186 (4.5 ± 2.5) (1-10)	NS:a-0.733;b-0.393;c-0.456
FR (2PN/MI)	66.7	47.1	52.9	NS:a-0.209;b-0.189;c-0.640
Embriões clivados (n, média, min-máx)	15 (3.8 ± 2.5) (2-8)	7 (2.3 ± 1.2) (1-4)	178 (4.3 ± 2.4) (1-10)	NS:a-0.358;b-0.700;c-0.394
ECR (d2/2PN)	93.8	87.5	95.7	NS:a-0.598;b-0.724;c-0.280
Embriões ao 3º dia (n, média, min-máx)	15 (3.8 ± 2.5) (2-8)	7 (2.3 ± 1.2) (1-4)	165 (4.02 ± 2.6) (0-10)	NS:a-0.406;b-0.872;c-0.579
Embriões ao 3º dia, grau A/B (n, rate, range)	7 (46.7) (1-3)	5 (71.4) (1-2)	111 (67.3) (0-9)	NS:a-0.953;b-0.344;c-0.570
Embrões ao 5º dia (n, média, min-máx)	8 (2 ± 3.4) (0-8)	0	62 (1.9 ± 3.1) (0-10)	NS:a-0.582;b-0.975;c-0.339
BL (n,min-máx)	1 (1-1)	0	17 (0-5)	NS:0.629
BLR (BL/d5)	12.5	0	27.4	NS:0.364
ETC (n, range, rate)	4 (3-5) (80.0)	3 (3-3) (100)	40 (2-5) (93.02)	NS:a-0.408;b-0.319;c-0.636
nº ET (n, media, min-máx)	10 (2.5 ± 0.5) (2-3)	7 (2.3 ± 0.5) (2-3)	91(2.2 ± 0.75) (0-3)	NS:a-0.725;b-0.824;c-0.810
BP (/ETC) (n, taxa)	0	1 (33.3)	15 (37.5)	NS:0.885
CP (/ETC) (n, rate)	0	1 (33.3)	15 (37.5)	NS:0.885
Sacos (n, min-máx)	0	1 (1-1)	18 (1-2)	-
IR (nº sacs/nº ET)	-	14.3	19.8	NS:0.723
Individuais (/CP) (n, taxa)	-	1 (100)	13 (86.7)	-
Gêmeos (/CP) (n, taxa)	-	0	2 (13.3)	-
Trigêmeos (/CP) (n, taxa)	-	0	0	-
Grav. Ectópica (/CP) (n, taxa, min-máx)	-	0	0	-
Aborto (/CP) (n, taxa)	-	1 (100)	5 (33.3)	-
OP (/ETC) (n, rate) (CP-Aborto)	-	0	10 (25.0)	NS:0.323
Delivery (/ETC) (n, taxa)	-	0	10 (25.0)	NS:0.323
Nadomorto (/ETC) (n, taxa)	-	0	0 (0.0)	-
LBDR (/ETC)(n, taxa)(Delivery-nadomorto)	-	0	10 (25.0)	NS:0.323
NB (/ETC) (n, taxa)	-	0	12 (30.0)	NS:0.264
NB (Sg-individuais; Tw-gêmeos)	-	-	8(Sg); 2(Tw)	-
Masculino (/NB) (n, taxa)	-	-	4 (33.3)	-
Feminino (/NB) (n, taxa)	-	-	8 (66.6)	-
Relação M/F	-	-	0.5	-
Malformação NB (n, taxa)	-	-	1 (8.3)	-
Major (/NB) (n, taxa)	-	-	1 (8.3)	-
Minor (/NB) (n, taxa)	-	-	0	-
Anom. Cromossômicas. NB (n, taxa, min-máx)	-	-	0	-
Morte Neonatal Precoce (/ETC) (n, taxa, min-máx)	-	-	0	-

Tabela 5: Resultados clínicos e embriológicos de pacientes com microdeleção no cromossoma Y e que foram submetidos a TESE. Comparações: a, AZFa vs AZFb; b, AZFa vs AZFc; c, AZFb vs AZFc. Valores em :n, taxa, média ± desvio padrão, min-máx. ^aDiferenças significativas ($p < 0.05$); NS, não significativo

TESE	AZFa	AZFb	AZFc	Valor de p ^a
Ciclos (n)	5	3	43	-
ETC (n, min-máx)	4 (3-5)	3 (3-3)	40 (2-5)	NS:a-0.408;b-0.319;c-0.636
NB (n, taxa)	0	0	12 (30.0)	-
Tempo de gestação (n, média, min-máx)	-	-	10 (38.2 ± 2.5) (31-40.5)	-
Termo (n, media, taxa, min-máx)	-	-	9 (39 ± 0.8) (90.0) (38-40.5)	-
Pré-termo (PT) (n, média, taxa, min-máx)	-	-	0	-
Muito PT (n, média, taxa, min-máx)	-	-	1 (31 ± 0.0) (10.0)	-
Extremamente PT (n, média, taxa, min-máx)	-	-	0	-
Peso (n, média, min-máx)	-	-	12 (3021.3 ± 795.4) (1530-4250)	-
Peso Normal (n, média, taxa, min-máx)	-	-	7 (3179.3 ± 290.1) (58.3) (2800-3610)	-
Baixo peso (LW) (n, média, taxa, min-máx)	-	-	3 (1880 ± 274.4) (25.0) (1530-2200)	-
Muito LW (n, média, taxa, min-máx)	-	-	0	-
Extremamente LW (n, média, taxa, min-máx)	-	-	0	-

Tabela 6: Resultados de recém-nascidos de pacientes com microdeleção no cromossoma Y e que foram submetidos a TESE. Termo- ≥ 37 - ≤ 42 (semanas); Pré-Termo- < 37 - ≥ 32 ; Muito Pré-Termo- < 32 - ≥ 28 ; Extremamente Pré-Termo- < 28 ; Peso Normal- ≥ 2500 - ≤ 4000 (gramas); Baixo peso- < 2500 - ≥ 1500 ; Muito baixo peso- < 1500 - ≥ 1000 ; Extremamente baixo peso- < 1000 . Comparações: a, AZFa vs AZFb; b, AZFa vs AZFc; c, AZFb vs AZFc. Valores em: n, taxa, média \pm desvio padrão, min-máx. ^a Diferenças significativas ($p < 0.05$); NS, não significativo

4.7.2 Resultados clínicos com espermatozoides testiculares criopreservados descongelados (TESE-C)

Pacientes com microdeleção AZFa evidenciam 90.4% taxa de maturação, 63.8% de FR, 96.7% de ECR, 48.1% de embriões de alta qualidade e 8.0% de IR. Houve 9 ETC e uma gravidez clínica de gémeos com o nascimento de 2 NB, um rapaz e uma rapariga (Tabela 7).

No grupo de pacientes com microdeleção na região AZFb verificou-se uma taxa de maturação de 61.1%, FR de 54.5%, 66.7% de ECR e 50.0% de embriões de alta qualidade. Houve 4 ETC sem gravidez (Tabela 7).

Pacientes com microdeleção AZFc apresentam 88.2% de taxa de maturação, 41.7% de FR, 82.2% de ECR, 41.1% de embriões de alta qualidade e uma taxa de blastocistos de 11.1%. Houve 25 ETC com 20.0% de CP (n=5), 11.8% de IR, a taxa de gémeos foi de 20.0% (n=1), e a taxa de abortamento foi igualmente de 20.0% (n=1), 16.0% de OP e de LBDR

(n=4). A taxa de recém-nascidos foi de 20.0% com um rácio entre Masculino/ Feminino de 0.7. Não houve gestações múltiplas, gravidezes ectópicas, nadomortos, óbitos neonatais precoces nem malformações e anomalias cromossómicas nos recém-nascidos (Tabela 7).

Comparações entre os três tipos de microdeleções mostraram que no grupo com microdeleções AZFc o número médio de complexos *cumulus-oocitos* recuperados (COC) e o número de oócitos maduros foi significativamente mais elevado, enquanto que a taxa de maturação, ECR, nº de embriões ao 3º dia e a média do nº de embriões transferidos foi inferior em AZFb. Em AZFa os 2 NB tiveram um tempo normal de gestação (37 semanas) e peso (2,500 g; 3,000 g). Em AZFc a média do tempo de gestação foi de 36,5 semanas com um caso de parto prematuro e dois casos de baixo peso ao nascer. Não houve diferenças significativas para AZFa (Tabela 8).

TESE-C	AZFa	AZFb	AZFc	Valor de p
Pacientes (n)	1 + (1+3)	(2)	3 + (14)	
Ciclos (n)	10	4	29	-
COC (n, média, min-máx)	52 (5.2 ± 1.9) (3-8)	18 (4.5 ± 2.9) (1-9)	245 (8.4 ± 3.2) (2-14)	b,c:a-0.653;b-0.042;c-0.038
MII (n, média, min-máx)	47 (4.7 ± 1.8) (3-8)	11 (2.75 ± 1.5) (1-5)	216 (7.4 ± 3.4) (1-14)	c:a-0.212;b-0.081;c- 0.011
Taxa de Maturação (MII/COC)	90.4	61.1	88.2	a,c:a-0.005;b-0.650;c-0.001
2PN (n, média, min-máx)	30 (3 ± 1.6) (0-6)	6 (1.5 ± 0.5) (1-2)	90 (3.1 ± 2.4) (0-11)	NS:a-0.179;b-0.925;c-0.319
FR (2PN/MII)	63.8	54.5	41.7	b:a-0.567;b-0.006;c-0.402
Embrões clivados (n, média, min-máx)	29 (3.2 ± 1.5) (1-6)	4 (1 ± 0.0) (1-1)	74 (2.85 ± 1.97) (0-9)	NS:a-0.061;b-0.693;c-0.059
ECR (d2/2PN)	96.7	66.7	82.2	a,b:a-0.015;b-0.049;c-0.346
Embrões ao 3º dia (n, média, min-máx)	27 (3 ± 1.8) (1-6)	2 (0.5 ± 0.5) (0-1)	73 (2.9 ± 2.1) (0-9)	a,c:a-0.048;b-0.938;c-0.023
Embrões ao 3º dia, grau A/B (n, rate, range)	13 (48.1) (0-4)	1 (50.0) (0-1)	30 (41.1) (0-4)	NS:a-0.451;b-0.731;c-0.390
Embrões ao 5º dia (n, média, min-máx)	0	0	18 (1.29 ± 2.7) (0-9)	NS:0.522
BL (n,min-máx)	0	0	2 (0-2)	-
BLR (BL/d5)	0	0	11.1	-
ETC (n, range, rate)	9 (2-4) (90.0)	4 (2-3) (100)	25 (2-5) (86.2)	NS:a-0.512;b-0.757;c-0.428
nº ET (n, media, min-máx)	25 (2.8 ± 0.6) (2-4)	4 (1 ± 0.0) (1-1)	51 (2.04 ± 0.8) (1-4)	a,c:a-0.000;b-0.058;c-0.009
BP (/ETC) (n, taxa)	1 (11.1)	0	7 (28.0)	NS:a-0.488;b-0.305;c-0.224
CP (/ETC) (n, rate)	1 (11.1)	0	5 (20.0)	NS:a-0.488;b-0.548;c-0.326
Sacos (n, min-máx)	2 (2-2)	-	6 (1-2)	-
IR (nº sacs/nº ET)	8.0	-	11.8	NS:0.612
Individuais (/CP) (n, taxa)	0 (0.0)	-	4 (80.0)	-
Gêmeos (/CP) (n, taxa)	1 (100)	-	1 (20.0)	-
Trigêmeos (/CP) (n, taxa)	0	-	0	-
Grav. Ectópica (/CP) (n, taxa, min-máx)	0	-	0	-
Aborto (/CP) (n, taxa)	0	-	1 (20.0)	-
OP (/ETC) (n, rate) (CP-Aborto)	1 (11.1)	-	4 (16.0)	NS:0.722
Delivery (/ETC) (n, taxa)	1 (11.1)	-	4 (16.0)	NS:0.722
Nadomorto (/ETC) (n, taxa)	0	-	0 (0.0)	-
LBDR (/ETC)(n, taxa)(Delivery-nadomorto)	1 (11.1)	-	4 (16.0)	NS:0.722
NB (/ETC) (n, taxa)	2 (22.2)	-	5 (20.0)	NS:0.889
NB (Sg-individuais; Tw-gêmeos)	1(Tw)	-	3(Sg); 1(Tw)	-
Masculino (/NB) (n, taxa)	1 (50.0)	-	2 (40.0)	NS:0.809
Feminino (/NB) (n, taxa)	1 (50.0)	-	3 (60.0)	NS:0.809
Relação M/F	1	-	0.7	NS:0.3822
Malformação NB (n, taxa)	0	-	0	-
Major (/NB) (n, taxa)	0	-	0	-
Minor (/NB) (n, taxa)	0	-	0	-
Anom. Cromossômicas. NB (n, taxa, min-máx)	0	-	0	-
Morte Neonatal Precoce (/ETC) (n, taxa, min-máx)	0	-	0	-

Tabela 7: Resultados clínicos e embriológicos de pacientes com microdeleção no cromossoma Y e que foram submetidos a TESE e posterior congelamento e descongelamento dos espermatozoides (TESE-C). Comparações: a, AZFa vs AZFb; b, AZFa vs AZFc; c, AZFb vs AZFc. Valores em :n, taxa, média ± desvio padrão, min-máx.^a Diferenças significativas ($p < 0.05$); NS, não significativo.

TESE-C	AZFa	AZFb	AZFc	Valor de p^a
Ciclos (n)	10	4	29	-
ETC (n, min-máx)	9 (2-4)	4 (2-3)	25 (2-5)	NS:a-0.512;b-0.757;c-0.428
NB (n, taxa)	2 (22.2)	0	5 (20.0)	NS:0.889
Tempo de gestação (n, média, min-máx)	1 (37 ± 0.0) (37-37)	-	4 (36.5 ± 2.7) (32-39)	NS:0.895
Termo (n, media, taxa, min-máx)	1 (37 ± 0.0) (100) (37-37)	-	3 (38 ± 0.8) (75.0) (37-39)	NS:1.000
Pré-termo (PT) (n, média, taxa, min-máx)	0	-	1 (32 ± 0.0) (25.0) (32-32)	-
Muito PT (n, média, taxa, min-máx)	0	-	0	-
Extremamente PT (n, média, taxa, min-máx)	0	-	0	-
Peso (n, média, min-máx)	2 (2750 ± 250) (2500-3000)	-	5 (2653 ± 634.7) (1835-3280)	NS:0.866
Peso Normal (n, média, taxa, min-máx)	2 (2750 ± 250) (100) (2500-3000)	-	3 (3160 ± 162.7) (60.0) (2930-3280)	NS:0.184
Baixo peso (LW) (n, média, taxa, min-máx)	0	-	2 (1892.5 ± 57.5) (40.0) (1835-1950)	-
Muito LW (n, média, taxa, min-máx)	0	-	0	-
Extremamente LW (n, média, taxa, min-máx)	0	-	0	-

Tabela 8: Resultados de recém-nascidos de pacientes com microdeleção no cromossoma Y e que foram submetidos a TESE e posterior congelamento e descongelamento dos espermatozoides (TESE-C). Termo- ≥ 37 - ≤ 42 (semanas); Pré-Termo- < 37 - ≥ 32 ; Muito Pré-Termo- < 32 - ≥ 28 ; Extremamente Pré-Termo- < 28 ; Peso Normal- ≥ 2500 - ≤ 4000 (gramas); Baixo peso- < 2500 - ≥ 1500 ; Muito baixo peso- < 1500 - ≥ 1000 ; Extremamente baixo peso- < 1000 . Comparações: a, AZFa vs AZFb; b, AZFa vs AZFc; c, AZFb vs AZFc. Valores em: n, taxa, média ± desvio padrão, min-máx. ^a Diferenças significativas ($p < 0.05$); NS, não significativo

4.7.3 Resultados clínicos com espermatozoides do ejaculado (EJAC)

Não houve pacientes com microdeleção AZFa e com espermatozoides no ejaculado (Tabela 9).

Pacientes com microdeleções AZFb apresentam uma taxa de maturação de 64.3%, FR de 59.3%, ECR de 93.8%, 84.6% de embriões de alta qualidade e 37.5% de IR. Houve 3 ETC e uma gravidez clínica de trigêmeos que terminou em aborto (Tabela 9).

Nos pacientes com microdeleção na região AZFc verificou-se 76.8% de taxa de maturação, 73.8% de FR, 95.5 % de ECR, 71,2% de embriões de alta qualidade e 42.0% de taxa de blastocistos. Houve 24 ETC com 33.3% de gravidezes clínicas (n=8), 23.9% de IR, 50.0% de gémeos (n=4), 25.0% de taxa de abortamento (n=2), 25.0% de OP e de LBDR (n=6), 33.3% de recém-nascidos (n=8) e 1.7 de rácio Masculino/Feminino. Não houve gravidezes ectópicas, nadomortos, óbitos neonatais precoces, nem malformações e anomalias cromossômicas nos recém-nascidos (Tabela 9).

Comparações entre os dois tipos de microdeleções mostraram que não houve diferenças significativas em todos os parâmetros embriológicos e clínicos avaliados, exceto no número de embriões transferidos por ciclo que foi significativamente superior no grupo de microdeleções AZFc. Em AZFc a média da idade de gestação foi de 38.8, com 1 caso de gravidez pré-termo e 3 casos de baixo peso ao nascer (Tabela 10).

EJAC	AZFa	AZFb	AZFc	Valor de p
Pacientes (n)	0	2 + (1+2)	16 + (8)	
Ciclos (n)	0	5	24	-
COC (n, média, min-máx)	-	42 (8.4 ± 2.4) (5-12)	194 (8.1 ± 2.9) (2-13)	NS:0.832
MII (n, média, min-máx)	-	27 (5.4 ± 3.3) (1-11)	149 (6.2 ± 2.6) (1-11)	NS:0.565
Taxa de Maturação (MII/COC)	-	64.3	76.8	NS:0.092
2PN (n, média, min-máx)	-	16 (3.2 ± 3.4) (0-9)	110 (4.6 ± 2.1) (1-10)	NS:0.270
FR (2PN/II)	-	59.3	73.8	NS:0.124
Embriões clivados (n, média, min-máx)	-	15 (5 ± 2.4) (2-8)	105 (4.4 ± 2.2) (1-10)	NS:0.667
ECR (d2/2PN)	-	93.8	95.5	NS:0.764
Embriões ao 3º dia (n, média, min-máx)	-	13 (4.3 ± 3.3) (5-8)	104 (4.3 ± 2.3) (0-10)	NS:1.000
Embriões ao 3º dia, grau A/B (n, rate, range)	-	11 (84.6) (4-7)	74 (71.2) (1-9)	NS:0.136
Embrões ao 5º dia (n, média, min-máx)	-	0	50 (6.3 ± 1.9) (4-10)	NS:0.362
BL (n,min-máx)	-	0	21 (1-6)	-
BLR (BL/d5)	-	0	42.0	-
ETC (n, range, rate)	-	3 (2-4) (60.0)	24 (2-5) (100)	c-0.001
nº ET (n, média, min-máx)	-	8 (2.7 ± 0.5) (2-3)	46 (1.9 ± 0.6) (1-4)	NS:0.070
BP (/ETC) (n, taxa)	-	1 (33.3)	8 (33.3)	NS:1.000-
CP (/ETC) (n, rate)	-	1 (33.3)	8 (33.3)	NS:1.000
Sacos (n, min-máx)	-	3 (3-3)	11 (1-2)	-
IR (nº sacs/nº ET)	-	37.5	23.9	NS:0.418
Individuais (/CP) (n, taxa)	-	0	4 (50.0)	-
Gêmeos (/CP) (n, taxa)	-	0	4 (50.0)	-
Trigêmeos (/CP) (n, taxa)	-	1 (100)	0	-
Grav. Ectópica (/CP) (n, taxa, min-máx)	-	0	0	-
Aborto (/CP) (n, taxa)	-	1 (33.3)	2 (25.0)	-
OP (/ETC) (n, rate) (CP-Aborto)	-	0	6 (25.0)	NS:0.757
Delivery (/ETC) (n, taxa)	-	0	6 (25.0)	NS:0.326
Nadomorto (/ETC) (n, taxa)	-	0	0	-
LBDR (/ETC)(n, taxa)(Delivery-nadomorto)	-	0	6 (25.0)	NS:0.326
NB (/ETC) (n, taxa)	-	0	8 (33.3)	NS:0.234
NB (Sg-individuais; Tw-gêmeos)	-	-	4(Sg); 2(Tw)	-
Masculino (/NB) (n, taxa)	-	-	5 (62.5)	-
Feminino (/NB) (n, taxa)	-	-	3 (37.5)	-
Relação M/F	-	-	1.67	-
Malformação NB (n, taxa)	-	-	0	-
Major (/NB) (n, taxa)	-	-	0	-
Minor (/NB) (n, taxa)	-	-	0	-
Anom. Cromossômicas. NB (n, taxa, min-máx)	-	-	0	-
Morte Neonatal Precoce (/ETC) (n, taxa, min-máx)	-	-	0	-

Tabela 9: Resultados clínicos e embriológicos de pacientes com microdeleção no cromossoma Y e que obtiveram espermatozoides do ejaculado. Comparações: a, AZFa vs AZFb; b, AZFa vs AZFc; c, AZFb vs AZFc. Valores em :n, taxa, média ± desvio padrão, min-máx.^a Diferenças significativas ($p < 0.05$); NS, não significativo

EJAC	AZFa	AZFb	AZFc	Valor de p^a
Ciclos (n)	0	5	24	-
ETC (n, min-máx)	-	3 (2-4)	24 (2-5)	c-0.001
NB (n, taxa)	-	0	8 (33.3)	NS:0.234
Tempo de gestação (n, média, min-máx)	-	-	6 (38.8 ± 1.5) (36.5-40.5)	-
Termo (n, media, taxa, min-máx)	-	-	5 (39.2 ± 1.3) (83.3) (37-40.5)	-
Pré-termo (PT) (n, média, taxa, min-máx)	-	-	1 (36.5 ± 0.0) (16.7) (36.5-36.5)	-
Muito PT (n, média, taxa, min-máx)	-	-	0	-
Extremamente PT (n, média, taxa, min-máx)	-	-	0	-
Peso (n, média, min-máx)	-	-	8 (2820.1 ± 544.5) (2200-4000)	-
Peso Normal (n, média, taxa, min-máx)	-	-	5 (3137.2 ± 448.4) (62.5) (2800-4000)	-
Baixo peso (LW) (n, média, taxa, min-máx)	-	-	3 (2291.7 ± 93.5) (37.5) (2200-2420)	-
Muito LW (n, média, taxa, min-máx)	-	-	0	-
Extremamente LW (n, média, taxa, min-máx)	-	-	0	-

Tabela 10: Resultados de recém-nascidos de pacientes com microdeleção no cromossoma Y e que obtiveram espermatozoides do ejaculado. Termo- ≥ 37 - ≤ 42 (semanas); Pré-Termo- < 37 - ≥ 32 ; Muito Pré-Termo- < 32 - ≥ 28 ; Extremamente Pré-Termo- < 28 ; Peso Normal- ≥ 2500 - ≤ 4000 (gramas); Baixo peso- < 2500 - ≥ 1500 ; Muito baixo peso- < 1500 - ≥ 1000 ; Extremamente baixo peso- < 1000 . Comparações: a, AZFa vs AZFb; b, AZFa vs AZFc; c, AZFb vs AZFc. Valores em: n, taxa, média \pm desvio padrão, min-máx. ^a Diferenças significativas ($p < 0.05$); NS, não significativo

5. Discussão

Este estudo representa a terceira maior série de pacientes (n = 128) com microdeleções no cromossoma Y (185: Totonchi *et al.*, 2012; 143: Kleiman *et al.*, 2012; 110: Choi *et al.*, 2013; 105: Kumtepe *et al.*, 2009). Cinquenta e oito pacientes realizaram ICSI, usando espermatozoides testiculares a fresco ou congelados e descongelados, recuperados através da TESE (n = 40), e espermatozoides do ejaculado (n = 18). A originalidade dos resultados apresentados reside nas comparações realizadas entre os diferentes tipos de microdeleções do cromossoma Y e os tratamentos, com detalhes demográficos, de estimulação, embrionários, clínicos e dos recém-nascidos.

5.1 Microdeleções AZFa

Todos os 17 pacientes com microdeleções na região AZFa apresentaram azoospermia secretora. Destes, 8 permaneceram sem diagnóstico testicular (2 em AZFa, 6 em AZFabc), pela recusa de tratamento. Um caso fez biópsia de diagnóstico, que revelou SCOS, mas não realizou tratamento clínico. Dos 8 pacientes que realizaram TESE, 5 (62,5%) obtiveram recuperação de espermatozoides.

Houve 3 (37,5%) casos com SCOS (sem espermatozoides recuperados), 3 (37,5%) casos com PM (com espermatozoides recuperados) e 2 casos (25%) com HP (com espermatozoides recuperados).

As deleções AZFa ocorreram em distintas sub-regiões, 5 em AZFa, 4 em AZFab e 8 em AZFabc. **Em AZFa**, houve 2 casos que não realizaram tratamento, 2 casos com SCOS (sem espermatozoides recuperados) e 1 caso com HP (uma gravidez de gémeos com 2 NB após 4 ciclos de ICSI com espermatozoides testiculares criopreservados). **Em AZFab**, houve 1 caso com SCOS (sem espermatozoides recuperados), 2 casos com PM (sem gravidez) e 1 caso com HP (sem gravidez). **Em AZFabc**, houve 6 casos sem tratamento, 1 caso com SCOS (sem espermatozoides recuperados) e 1 caso com PM (sem gravidez). Assim, é demonstrado que em pacientes com deleções AZFa, os espermatozoides podem ser recuperados apenas em casos PM e HP, mas apenas naqueles com HP pode ser conseguida uma gravidez termo.

Todos os 8 casos com microdeleções AZFabc tinham cariótipos anormais. Isto incluiu de seis casos sem tratamento, o caso com SCOS e o caso com PM. Tendo em consideração os 125 pacientes com análise do cariótipo, a percentagem de pacientes com microdeleção AZFabc e com cariótipo anormal dá uma taxa de 6,4%. Estudos anteriores encontraram cariótipos anormais, com uma taxa de 1-3% em AZFa e de 11-22% em AZFabc

(Kumtepe *et al.*, 2009; Patrat *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012; Totonchi *et al.*, 2012). Comparando os resultados dos diferentes estudos, nós encontramos uma taxa mais baixa em AZFabc. A ausência de cariótipo anormal em AZFa já havia sido reportada (Kumtepe *et al.*, 2009; Patrat *et al.*, 2010).

Pacientes com microdeleção AZFa não apresentam espermatozoides nos seus túbulos seminíferos. Os nossos resultados estão de acordo com estas descobertas, os espermatozoides podem ser recuperados apenas na presença de uma microdeleção isolada no gene DDX3Y (DBY) (o único caso com recém-nascido; 1 caso AZFa) e nos casos com microdeleção isolada DDX3Y (DBY) associada com a microdeleção P4/P4 (todos sem gravidez; 3 casos AZFab). O caso com uma microdeleção AZFabc e espermatozoides recuperados, tinha um cariótipo anormal (46X,del (Y)) e foram encontrados raros espermatozoides testiculares imaturos que não fertilizaram o oócito. Apesar de vários estudos indicarem que a deleção dos genes USP9Y (DFFRY) e DDX3Y (DBY) em AZFa, é causadora do fenótipo de SCOS com total ausência de espermatozoides nos testículos (Vogt *et al.*, 1996; Kamp *et al.*, 2001; Krausz *et al.*, 2006;. Hotaling e Carrel , 2014), outros estudos referem a recuperação de espermatozoides testiculares em pacientes com deleções isoladas numa dessas regiões de genes (Sargent *et al.*, 1999; Kamp *et al.*, 2001; Luddi *et al.*, 2009) e mesmo quando ambos os genes se encontram deletados (Foresta, 2000; Kleiman *et al.*, 2001).

5.2 Microdeleções AZFb

Dos 26 pacientes com deleções AZFb, 4 (15,4%) apresentaram oligozoospermia grave e 22 (84,6%) azoospermia secretora. Entre os casos com oligozoospermia severa, dois pacientes realizaram ciclos de ICSI com espermatozoides do ejaculado e 2 realizaram TESE (diagnosticada como HP em tratamento). Num caso com espermatozoides no ejaculado, houve uma gestação única, que terminou em aborto, e no outro caso com HP, havia uma gravidez tripla que terminou em aborto. Dos casos com azoospermia secretora, 11 não realizaram tratamento, dos quais 10 não tinham fenótipo testicular e um tinha SCOS. Dos 11 casos que realizaram tratamento, houve 9 (81,8%) casos com SCOS (sem espermatozoides recuperados), 1 (9,1%) caso com PM (sem espermatozoides recuperados) e 1 (9,1%) caso com HP (sem gravidez).

A região AZFb apareceu deletada em sub-regiões distintas, 1 em **AZFb** (azoospermia secretora), 1 em **AZFb + DAZ** (oligozoospermia severa), 2 em **AZFbp + DAZ** (oligozoospermia severa) e 22 em **AZFbc** (1 com oligozoospermia, 21 com azoospermia secretora). Em AZFb, houve 1 caso de SCOS (sem espermatozoides recuperados). Em AZFb + DAZ, houve 1 caso com oligozoospermia severa, mas que realizou TESE (sem gravidez). Em AZFbp + DAZ, houve 1 caso com ICSI com espermatozoides do ejaculado (sem gravidez), e 1 caso que realizou TESE (aborto de uma gravidez única). Em AZFbc, houve 1 caso tratado com ICSI com espermatozoides do ejaculado (aborto de uma gravidez tripla), 8 casos com SCOS (sem espermatozoides recuperados), 1 caso com PM (sem espermatozoides recuperados), e 1 caso com HP (sem gravidez). Assim, em pacientes com microdeleções AZFb os espermatozoides podem ser recuperados somente em casos com ejaculado e HP, apesar de nenhuma gravidez termo ser alcançada.

Os cariótipos anormais foram observados apenas em AZFbc (12 casos). Estes incluíram 6 casos sem tratamento (de 10 casos), 5 casos com SCOS (de 10 casos), e 1 caso MA. Considerando os nossos 125 pacientes com análise de cariótipos, isto dá uma taxa de 9,6% de pacientes com cariótipo anormal e com microdeleção AZFb, que é semelhante a anteriores estudos que relataram de 9-50% em AZFbc (Kumtepe *et al.*, 2009; Patrat *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012; Totonchi *et al.*, 2012).

Pacientes com microdeleções AZFb não têm espermatozoides nos seus túbulos seminíferos. Os nossos resultados estão de acordo com estas descobertas no entanto os espermatozoides podem ser recuperados em situações únicas: na presença da microdeleção P5/P1 proximal (AZFb+DAZ), sem gravidez (Soares *et al.*, 2012); na presença da microdeleção IR4/P2 distal (AZFbp+DAZ) com espermatozoides do ejaculado e sem fertilização (Soares *et al.*, 2012); na presença da microdeleção IR4/P1 proximal (AZFbp+DAZ) resultando em aborto (Soares *et al.*, 2012) e na presença da microdeleção IR4/P1 distal (2 casos AZFbc), com espermatozoides do ejaculado (aborto de trigêmeos) ou com espermatozoides testiculares (sem gravidez) (Costa *et al.*, 2008). Embora as microdeleções em AZFb consideram-se associadas com fenótipo MA e ausência de espermatozoides recuperados (Vogt *et al.*, 1996; Martinez *et al.*, 2000; Stouffs *et al.*, 2005; Patrat *et al.*, 2010), são relatados casos que mostram que existe a possibilidade de recuperação de espermatozoides em AZFb (Costa *et al.*, 2008; Ferrás *et al.*, 2004; Kim *et al.*, 2012; Soares *et al.*, 2012.), AZFbc (Soares *et al.*, 2012; Choi *et al.*, 2013) e em AZFbp

(Choi *et al.*, 2004; Totonchi *et al.*, 2012), devido á diferente extensão e localização da deleção.

5.3 Microdeleções AZFc

Dos 82 pacientes com microdeleções AZFc (3 pacientes sem diagnóstico de oligozoospermia severa ou azoospermia secretora), 29 (35,4%) tiveram oligozoospermia severa e 53 (64,6%) azoospermia secretora. Entre os casos com oligozoospermia severa, 12 não realizaram tratamento e não tinham fenótipo testicular diagnosticado, 16 tiveram ciclos de tratamento de ICSI com espermatozoides do ejaculado (8 NB, 2 abortos), e 1 teve HP e realizou TESE (1 aborto). Entre os casos com azoospermia secretora, 9 não realizaram tratamento e não tinham diagnóstico do fenótipo testicular. Dos 44 casos com diagnóstico, 17 (38,6%) tiveram SCOS (10 sem recuperação de espermatozoides; 7 com recuperação de espermatozoides e 2 NB), 13 (29,5%) tiveram PM (2 sem recuperação de espermatozoides; 11 com recuperação de espermatozoides e 5 NB), e 14 (31,8%) tinham HP (10 NB). Os nossos resultados estão de acordo com estudos anteriores, onde demonstram que as microdeleções AZFc não impedem a possibilidade de recuperação de espermatozoides na TESE e que o fenótipo pode variar de SCOS a oligozoospermia severa (Vogt *et al.*, 1996; Calogero *et al.*, 2001; Fernandes *et al.*, 2002; Oates *et al.*, 2002; Patrat *et al.*, 2010).

Os cariótipos anormais foram encontrados em 5 casos. Estes incluíram dois casos tratados com espermatozoides do ejaculado (1 caso com 2 NB), um caso com SCOS (sem gravidez), um caso com PM (sem gravidez), e um caso com HP (aborto de uma gravidez única). Considerando os nossos 125 pacientes com análise de cariótipos isto dá uma taxa de 4% de pacientes com microdeleção AZFc e anomalias no cariótipo, é semelhante à anteriormente que relatada de 5-25% em AZFc (Kumtepe *et al.*, 2009; Patrat *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012; Totonchi *et al.*, 2012).

5.4 Em relação às características hormonais de pacientes

As comparações entre os casos com e sem recuperação de espermatozoides por cada tipo de microdeleção, não revelou diferenças significativas em relação à idade e aos níveis hormonais, com exceção dos níveis de FSH elevados em pacientes sem recuperação de espermatozoides com microdeleção AZFc. Estudos anteriores, embora efetuando comparações com controlos, também não apresentaram diferenças significativas para estes

parâmetros (Martinez *et al.*, 2000; Oates *et al.*, 2002; Peterlin *et al.*, 2002; Choi *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Park *et al.*, 2013).

5.5 Em relação aos parâmetros de estimulação

Em relação às características de estimulação, em ciclos TESE não houve diferenças significativas em relação à idade, tempo de infertilidade, níveis de estradiol assim como a dose da hormona HCG. A dose total de gonadotrofinas administradas e o tempo de estimulação, foram significativamente maiores em AZFa. Em ciclos TESE-C a idade do sexo feminino foi significativamente maior nos casos de AZFa do que em AZFc, os níveis de estradiol em AZFb foram significativamente inferiores, e a dose da hormona HCG foi significativamente mais baixa em AZFc do que em AZFb. Para os ciclos EJAC não foram encontradas diferenças significativas. Na literatura não foi possível encontrar dados para comparações com os nossos resultados atuais.

5.6 Em relação aos resultados clínicos

Vários estudos avaliaram o impacto da ICSI usando espermatozoides de pacientes com microdeleções no cromossoma Y. Em quase todos esses estudos anteriores, os autores compararam controlos (pacientes sem microdeleções) com os pacientes com microdeleções AZFc. Nestes estudos os autores não encontraram diferenças significativas para os resultados embriológicos, clínicos e de recém-nascidos, com exceção de uma taxa de fertilização significativamente mais baixa (van Gold *et al.*, 2001; Patrat *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013).

Nós não comparámos os nossos resultados com esse tipo de controlos, mas entre os diferentes tipos de microdeleções (AZFa, AZFb e AZFc) e tratamentos (TESE, TESE-C e EJAC), uma vez não existir precedentes para esta abordagem. Em relação aos resultados embriológicos e clínicos, em **ciclos TESE** não houve diferenças significativas para os parâmetros avaliados, incluindo o número médio de oócitos recuperados, taxa de fertilização, taxa de clivagem embrionária, alto grau de embriões, a taxa de blastocistos, gravidezes clínicas e em curso, taxa de implantação, taxa de nados vivos e de recém-nascidos. Em relação aos resultados dos recém-nascidos, não houve casos prematuros ou extremamente prematuro, peso muito baixo ou extremamente baixo, com um caso de gravidez muito pré-termo e 3 casos de baixo peso ao nascer (AZFc).

Para os **ciclos TESE-C**, os casos AZFc mostraram um número significativamente maior de média de oócitos recuperados, a taxa de maturação foi menor em AZFb, a taxa de fertilização foi menor em AZFc, e a taxa de clivagem embrionária também foi menor em AZFb. Houve um caso gravidez pré-termo e dois casos de baixo peso ao nascer (AZFc). Para os **ciclos EJAC**, não houve diferenças significativas entre os grupos, com um caso de gravidez pré-termo e 3 casos de baixo peso ao nascer (AZFc). No entanto, estes resultados satisfatórios foram apenas para AZFc, pois em AZFa havia apenas 1 CP (2 recém nascidos gêmeos) e em AZFb havia apenas 2 CP, que terminaram em aborto.

Para podermos desenvolver um estudo com base em números reais, por vezes lidamos com parâmetros com um baixo número de casos na amostra, isto pode afetar os resultados finais, tendo em conta que em algumas situações as comparações são feitas com uma amostra reduzida. Isto acontece porque naturalmente há uma prevalência de pacientes com microdeleção AZFc muito mais elevada do que pacientes com microdeleção AZFa, por exemplo. Portanto, devemos designar esta análise como sendo preliminar e exploratória, no sentido em que, com um número mais equilibrado de pacientes entre os 3 microdeleções, poderia ser elaborada uma correlação com mais precisão entre os diferentes parâmetros e microdeleções.

6. Conclusões

6.1 Originalidade do trabalho

A singularidade deste trabalho reside nas comparações realizadas entre os diferentes tipos de microdeleções (AZFa, AZFb e AZFc) e tratamentos (TESE, TESE-C e EJAC). Além disso, são apresentados os resultados de 128 pacientes com microdeleções (3º maior da série) avaliando detalhadamente os dados demográficos, de estimulação, embrionários, clínicos e dos recém-nascidos. Por outro lado, o uso de um grande número de STS's, para identificar os *loci* específicos que estão deletados nas diferentes regiões, melhora a taxa de fiabilidade e de detecção das microdeleções do cromossoma Y.

6.2 Principais elações

As taxas de microdeleções no cromossoma Y e de recuperação de espermatozoides testiculares foram semelhantes às previamente relatadas, bem como a associação com cariótipos anormais. A alta taxa de recuperação de espermatozoides testiculares, as taxas de fertilização similares, de gravidez clínica e de nados vivos, a ausência de problemas na gestação e com os recém-nascidos, em relação aos estudos anteriores, tranquilizam o homem estéril com microdeleções no cromossoma Y. No entanto, casos com microdeleções na região AZFa e AZFb tiveram um pior prognóstico. Obtivemos um caso com uma deleção completa da região de AZFa e outro com uma deleção completa da região de AZFb, ambos obtiveram recuperação de espermatozoides. Estes dois casos serão estudados no futuro para a pesquisa dos pontos de rutura, a fim de elucidar a verdadeira natureza e as consequências dessas deleções.

6.3 Implicações clínicas

Como os filhos possuirão a mesma microdeleção do pai e também devido à associação com o cariótipo anormal, ainda é necessário informar os pacientes sobre estas consequências, assim como oferecer o diagnóstico genético pré-implantação (DGPI) para a triagem da aneuploidia e seleção do sexo feminino.

7. Bibliografia

- Akimoto, C., Kitagawa, H., Matsumoto, T. & Kato, S. (2008). Spermatogenesis-specific association of SMCY and MSH5. *Genes to Cells*, 13(6), 623–633.
- Alechine, E. & Corach, D. (2014). High-Throughput Screening for Spermatogenesis Candidate Genes in the AZFc Region of the Y Chromosome by Multiplex Real Time PCR Followed by High Resolution Melting Analysis. *PLoS ONE*, 9(5), (e97227) 1-9.
- Amann, R.P. (2008). The cycle of the seminiferous epithelium in humans: a need to revisit? *Journal of andrology*, 29(5), 469–487.
- Ambulkar, P.S., Sigh, R., Reddy, MVR, Varma, P.S., Gupta, D.O., Shende, M.R. & Pal, A. K. (2014). Genetic Risk of Azoospermia Factor (AZF) Microdeletions in Idiopathic Cases of Azoospermia and Oligozoospermia in Central Indian Population. *Journal of Clinical and Diagnostic Research*, 8(3), 88–91.
- Anifandis, G., Messini, C., Dafopoulos, K., Sotiriou, S. & Messinis, I. (2014). Molecular and cellular mechanisms of sperm-oocyte interactions opinions relative to in vitro fertilization (IVF). *International Journal of Molecular Sciences*, 15(7), 12972–12997.
- Bachtrog, D. & Charlesworth, B. (2001). Minireview Towards a complete sequence of the human Y chromosome. *Genome Biology*, 2(5), 1–5.
- Bosch, E. & Jobling, M. A. (2003). Duplications of the AZFa region of the human Y chromosome are mediated by homologous recombination between HERVs and are compatible with male fertility. *Human Molecular Genetics*, 12(3), 341–347.
- Brown, G.M., Furlong, R.A., Sargent, C.A., Erickson, R.P., Longepied, G., Mitchell, M. *et al.* (1998). Characterisation of the coding sequence and fine mapping of the human DFFRY gene and comparative expression analysis and mapping to the Sxrb interval of the mouse Y chromosome of the Dffry gene. *Human Molecular Genetics*, 7(1), 97–107.
- Bujan, L., Mieusset, R., Mansat, A., Moatti, J.P., Mondinat, C., & Pontonnier F. (1989). Testicular size in infertile men: relationship to semen characteristics and hormonal blood levels. *British Journal of Urology*, 64(6), 632-637.
- Carvalho, F., Sousa, M., Fernandes, S., Silva, J., Saraiva, M. J. and Barros, A. (2001). Preimplantation genetic diagnosis for familial amyloidotic polyneuropathy (FAP). *Prenatal Diagnosis*, 21(12), 1093–1099.
- Chiu, C.N.P., Wong, B.S.T., Chung, MK, Lam, K.K.W., Pang, R.T.K., Lee KF, *et al.* (2008). Effects of native human zona pellucida glycoproteins 3 and 4 on acrosome reaction and zona pellucida binding of human spermatozoa. *Biology of reproduction*, 79(5), 869–877.

- Choi, D.K., Gong, I.H., Hwang, J.H., Oh, J.J., Hong, J.Y. *et al.* (2013). Detection of Y chromosome microdeletion is valuable in the treatment of patients with nonobstructive azoospermia and oligoasthenoteratozoospermia: Sperm retrieval rate and birth rate. *Korean Journal of Urology*, 54(2), 111–116.
- Clermont, Y. (1963). The cycle of the seminiferous epithelium in man. *American Journal of Anatomy*, 112(1), 35–51.
- Clermont, Y. (1972). Kinetics of spermatogenesis in Mammals. *Physiological reviews*, 52(1), 198–235.
- Clermont, Y. (1966). Renewal of spermatogonia in man. *American Journal of Anatomy*, 118(2), 509–524.
- Clinical Guideline. (2004). Assessment and treatment for people with fertility problems. *National Collaborating centre for women's and children's health*, 1-115.
- Conner, S.J., Lefièvre, L., Hughes, D.C. & Barratt, C.L.R. (2005). Cracking the egg: Increased complexity in the zona pellucida. *Human Reproduction*, 20(5), 1148–1152.
- Costa, P., Gonçalves, R., Ferrás, C., Fernandes, S., Fernandes, A.T., Sousa, M. & Barros, A. (2008). Identification of new breakpoints in AZFb and AZFc. *Molecular Human Reproduction*, 14(4), 251–258.
- Crabbé, E., Verheyen, G., Silber, S., Tournaye, H., Van de Velde, H., Goossens, A. & Van Steirteghem, A. (1998). Enzymatic digestion of testicular tissue may rescue the intracytoplasmic sperm injection cycle in some patients with non-obstructive azoospermia. *Human reproduction (Oxford, England)*, 13(10), 2791–2796.
- De Jonge, C.J., & Barratt C.L.R., eds. (2006) The sperm cell: production, maturation, fertilization, regeneration. *Cambridge University Press*, 1-357.
- De la Cruz, J., Kressler, D., & Linder, P. (1999). Unwinding RNA in *saccharomyces cerevisiae*: DEAD-box proteins and related families. *Trends in Biochemical Sciences*, 24(99), 192–198.
- De Robertis, E.D.P., & De Robertis, E.M.F. (1987). Cell and molecular biology. *Philadelphia, Lea & Febiger*.
- De Vries, J.W., Repping, S., Van Daalen, S.K.M., Korver, C.M., Leschot, N.J., & Van der Veen, F. (2002). Clinical relevance of partial AZFc deletions. *Fertility and Sterility*, 78(6), 1209–1214.

- Deruyver, Y., Vanderschueren, D. & Van der Aa, F. (2014). Outcome of microdissection TESE compared with conventional TESE in non-obstructive azoospermia: A systematic review. *Andrology*, 2(1), 20–24.
- Devroey, P. & Van Steirteghem, A. (2004). A review of ten years experience of ICSI. *Human Reproduction Update*, 10(1), 19–28.
- Devroey, P., Liu, J., Nagy, Z., Goossens, A. *et al.* (1995). Pregnancies after testicular sperm extraction and ICSI in non-obstructive azoospermia. *Human Reproduction*, 10(6), 1457-1460.
- Ditton, H.J., Zimmer, J. Kamp, C. Rajpert-De Meyts, E. & Vogt, P.H. (2004). The AZFa gene DBY (DDX3Y) is widely transcribed but the protein is limited to the male germ cells by translation control. *Human Molecular Genetics*, 13(19), 2333–2341.
- Dohle, G.R. Halley, D.J.J. Van Hemel, J.O. van den Ouwel, A.M.W. Pieters, M.H.E.C. Weber, R.F.A. & Govaerts, L.C.P. (2002). Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Human reproduction (Oxford, England)*, 17(1), 13–16.
- Donnez, J., & Dolmans, M. M. (2015). Ovarian cortex transplantation: 60 reported live births brings the success and worldwide expansion of the technique towards routine clinical practice. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 32(8), 1167-1170.
- Donnez, J., Dolmans, M. M., Demylle, D., Jadoul, P., Pirard, C., Squifflet, J., *et al.* (2004). Livebirth after orthotopic transplantation of cryopreserved ovarian tissue. *The Lancet*, 364(9443), 1405-1410.
- Edwards, R.G. & Steptoe, P.C. (1983). Current status of in vitro Fertilization and implantation of human embryos. *Lancet*, ii, 1265- 1269.
- Elliott, D.J., Millar, M.R., Oghene, K., Ross, A., Kiesewetter, F., Pryor, J. *et al.* (1997). Expression of RBM in the nuclei of human germ cells is dependent on a critical region of the Y chromosome long arm. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 94(8), 3848–3853.
- Escott, G.M., Rosa, L. A & Loss, E.S. (2011). Regulação hormonal do transporte de glicose e aminoácido e sua relação com as funções e o desenvolvimento das células de Sertoli : uma revisão. *Ciência em movimento*, 27(13), 85–98.
- Esteves, S.C. & Agarwal, A. (2013). Reproductive outcomes, including neonatal data, following sperm injection in men with obstructive and nonobstructive azoospermia: case series and systematic review. *Clinics*, 68(5), 141–149.

- Fausser, B.C.J.M., Devroey, P., Diedrich, K., Balaban, B., Bonduelle, M., Delemarre-Van De Waal, H.A. *et al.* (2014). Health outcomes of children born after IVF/ICSI: A review of current expert opinion and literature. *Reproductive BioMedicine Online*, 28(2),162–182.
- Ferlin, A., Arredi, B. & Foresta, C. (2006). Genetic causes of male infertility. *Reproductive Toxicology*, 22(2), 133–141.
- 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(1), 18–24.
- Fernandes, S., Huellen, K., Goncalves, J., Dukal, H., Zeisler, J., De Meyts, E.R., *et al.* (2002). High frequency of DAZ1/DAZ2 gene deletions in patients with severe oligozoospermia. *Molecular Human Reproduction*, 8(3), 286-298.
- Foresta, C., Ferlin, A. & Moro, E. (2000). Deletion and expression analysis of AZFa genes on the human Y chromosome revealed a major role for DBY in male infertility. *Human Molecular Genetics*, 9(8), 1161-1169.
- Foresta, C., Moro, E. & Ferlin, A. (2001). Prognostic value of Y deletion analysis The role of current methods. *Human Reproduction*, 16(8), 1543–1547.
- Frydelund-Larsen, L., Krausz, C., Leffers, H., Andersson, A.M., Carlsen, E., Bangsboell, S., *et al.* (2002). Inhibin B: A marker for the functional state of the seminiferous epithelium in patients with azoospermia factor c microdeletions. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*, 87(12), 5618–5624.
- Ganguly, A., Pankaj, B., Gupta, T., & Gupta, S.K. (2010). In humans, zona pellucida glycoprotein-1 binds to spermatozoa and induces acrosomal exocytosis. *Human Reproduction*, 25(7), 1643–1656.
- Gardner, D.K., & Schoolcraft, W.B. (1999). In vitro culture of human blastocysts. *Towards reproductive certainty: fertility and genetics beyond*, 378-388.
- Giachini, C., Guarducci, E., Longepied, G., Degl'Innocenti, S., Becherini, L., Forti, G *et al.* (2005). The gr/gr deletion(s): a new genetic test in male infertility? *Journal of medical genetics*, 42(6), 497–502.
- Ginalski, K., Rychlewski, L., Baker, D., & Grishin, N.V. (2004). Protein structure prediction for the male-specific region of the human Y chromosome. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(8), 2305–2310.
- Girardi, S.K., Mielnik, A. & Schlegel, P.N. (1997). Submicroscopic deletions in the Y chromosome of infertile men. *Human Reproduction*, 12(8),1635–1641.

- Gläser, B., Yen, P.H. & Schempp, W. (1998). Fibre-fluorescence in situ hybridization unravels apparently seven DAZ genes or pseudogenes clustered within a Y-chromosome region frequently deleted in azoospermic males. *Chromosome Research*, 6(6),481–486.
- Goodfellow, P., Darling, S., and Wolfet, J. (1985) “The Y chromosome” *Journal of Medical Genetics*, 22, 329-344.
- Goodfellow, P.N. & Darling, S.M. (1988). Genetics of sex determination in man and mouse. *Development (Cambridge, England)*, 102(2), 251–258.
- Gorgy, A., Meniru, G.I., Naumann, N., Beski, S., Bates, S. & Craft, I.L. (1998). The efficacy of local anesthesia for percutaneous epididymal sperm aspiration and testicular sperm aspiration. *Human Reproduction*, 13(3), 646–650.
- Guyton, A.C., & Hall, J.E. (2002). Funções reprodutoras e hormonais masculinas. In: *Tratado de fisiologia médica*, Cap.80, 10ª edição, 857-868.
- Hamada, A.J., Esteves, S.C. & Agarwal, A. (2013). A comprehensive review of genetics and genetic testing in azoospermia. *Clinics*, 68(S1), 39–60.
- Hammer O, Harper DAT & Ryan PD. (2001). PAST: paleontological statistics software package for education and data analysis. *Palaeontol Electr* 4, 1-9.
- Heller, C.G., Clermont Y. (1964) Kinetics of the germinal epithelium in man. *Recent Progress in Hormone Research*. 20, 545–571.
- Heller, C.G., Clermont Y. (1963) Spermatogenesis in man: an estimation of its duration. *Science*. 140, 184–186.
- Holstein, A.-F., Schulze, W. & Davidoff, M. (2003). Understanding spermatogenesis is a prerequisite for treatment. *Reproductive biology and endocrinology*, 1, 107.
- Hopps, C.V., Mielnik, A., Goldstein, M., Palermo, G. D., Rosenwaks, Z., & Schlegel, P. (2003). Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb, and AZFc regions. *Human Reproduction*, 18(8), 1660–1665.
- Hotaling, J. & Carrell, D.T. (2014). Clinical genetic testing for male factor infertility: current applications and future directions. *Andrology*, 2(3), 339–50.
- Hsu, CC., Kuo, PH., Lee, IW., Su, MT., Tseng, J.T., & Kuo, PL. (2010). Quantitative trait analysis suggests human DAZL may be involved in regulating sperm counts and motility. *Reproductive BioMedicine Online*, 21(1), 77–83.

- Huirne, J. A., Homburg, R. & Lambalk, C.B. (2007). Are GnRH antagonists comparable to agonists for use in IVF? *Human Reproduction*, 22(11), 2805–2813.
- Irvine, D.S. (1998). Epidemiology and aetiology of male infertility. *Human Reproduction*, 13(S1), 33–44.
- Jobling, M.A. & Tyler-Smith, C. (2003). The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age. *Nature reviews. Genetics*, 4, 598–612.
- Jones, M.H., Furlong, R.A., Burkin, H., Chalmers, I.J., Brown, G.M., & Khwaja, O. and Affara, N.A. (1996). The Drosophila developmental gene fat facets has a human homologue in Xp11.4 which escapes X-inactivation and has related sequences on Yq11.2. *Human Molecular Genetics*, 5(11), 1695–1701.
- Junqueira, L. C., & Carneiro, J. (2004). Aparelho reprodutor masculino, In: *Histologia Básica*, Cap. 21, 10ª edição, 415-431.
- Kamp, C., Huellen, K., Fernandes, S., Sousa, M., Schlegel, P.N. Mielnik, A. *et al.* (2001). High deletion frequency of the complete AZFa sequence in men with Sertoli-cell-only syndrome. *Molecular human reproduction*, 7(10), 987–994.
- Kichine, E., Rozé, V., Di Cristofaro, J., Taulier, D., Navarro, A., Streichemberger, E. *et al.* (2012). HSFY genes and the P4 palindrome in the AZFb interval of the human Y chromosome are not required for spermatocyte maturation. *Human Reproduction*, 27(2), 615–624.
- Kim, B., Lee, Y., Kim, Y., Lee, K.H., Chun, S., Rhee, K. *et al.* (2009). Polymorphic expression of DAZ proteins in the human testis. *Human Reproduction*, 24(6), 1507–1515.
- Kim, J., Daniel J., Espejo, A., Lake, A., Krishma, M., Xia, L., Zhang, Y., & Bedford M.T. (2006). Tudor, MBT and chromo domains gauge the degree of lysine methylation. *EMBO reports*, 7(4), 397–403.
- Kim, M.J., Choi, H.W., Park, S.Y., Song, I.O., Seo, J.T. & Lee, H-S., (2012) Molecular and cytogenetic studies of 101 infertile men with microdeletions of Y chromosome in 1,306 infertile Korean men. *Journal of Assisted and Genetics*, 29(6), 539-546.
- Kleiman, S.E., Almog, R., Yogev, L., Hauser, R., Lehavi O, Paz G, Yavetz H & Botchan A. (2012) Screening for partial AZFa microdeletions in the Y chromosome of infertile men: is it of clinical relevance? *Fertility and Sterility* 98(1), 43-47.
- Kleiman, S.E., Bar-Shira, B., Yogev, L., Paz, G., Yavetz, H. (2001). The prognostic role of the extent of Y microdeletion on spermatogenesis and maturity of Sertoli cells. *Human Reproduction*, 16(3), 399–402.

- Kostiner, D.R., Turek, P.J. & Reijo, R.A. (1998). Male infertility: analysis of the markers and genes on the human Y chromosome. *Human reproduction*, 13(11), 3032–3038.
- Kostova, E., Yeung, C.H., Luetjens, C.M., Brune, M., Nieschlag, E., Gromoll, J. (2007). Association of three isoforms of the meiotic BOULE gene with spermatogenic failure in infertile men. *Molecular Human Reproduction*, 13(2), 85–93.
- Krausz, C., Degl'Innocenti, S., Nuti, F., Morelli, A., Felici, F., Sansone, M., Varriale, G., & Forti G. (2006) Natural transmission of USP9Y gene mutations: a new perspective on the role of AZFa genes in male fertility. *Human Molecular Genetics*, 15(18), 2673-2681.
- Krausz, C., Hoefsloot, L., Simoni, M., & Tüttelmann F. (2014). EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions state-of-art 2013. *Andrology* 2(1), 5-19.
- Kumtepe, Y., Beyazyurek, C., Cinar, C., Ozbey, I., Ozkan, S., Cetinkaya, K., Karlikaya, G., Karagozolu, H., & Kahraman, S., (2009) A genetic survey of 1935 Turkish men with severe male factor infertility. *Reproductive Biomedicine Online*, 18(4), 465-474.
- Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Brown, L.G., Minx, P.J., Cordum, H.S., Waterston, R.H., *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.
- Lahn, B.T., & Page, D.C. (1997). Functional coherence of the human Y chromosome. *Science (New York, N.Y.)*, 278(5338), 675–680.
- Lahn, B.T., Pearson, N.M. & Jegalian, K. (2001). The human Y chromosome, in the light of evolution. *Nature reviews. Genetics*, 2, 207–216.
- Lee, M.G., Norman, J., Shilatifard, A., & Shiekhattar, R. (2007). Physical and Functional Association of a Trimethyl H3K4 Demethylase and Ring6a/MBLR, a Polycomb-like Protein. *Cell*, 128(5), 877–887.
- Li, P.S., Li, S., Schlegel, P.N., & Goldstein, M. (1992). External spermatic sheath injection for vasal nerve block. *Urology*, 39(2), 173-176.
- Li, Z., Haines, C.J. & Han, Y. (2008). “Micro-deletions” of the human Y chromosome and their relationship with male infertility. *Journal of Genetics and Genomics*, 35(4), 193–199.
- Lin, Y.M., Teng, Y.N., Lee, P.C., Lin, Y.H., Hsu, C.C., Lin, J.S.N., & Kuo P.L. (2001). AZFa candidate gene deletions in taiwanese patients with spermatogenic failure. *Journal of the Formosan Medical Association* , 100 (9), 592–597.

- Liu, X., Qiao, J., Li, R., Yan, L., & Chen, L. (2013). Y chromosome AZFc microdeletion may not affect the outcomes of ICSI for infertile males with fresh ejaculated sperm. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(6), 813-819.
- Longepied, G., Saut, N., Akinin-Seifer, I., Levy, R., Frances, A.M., Metzler-Guillemain, C., *et al.* (2010). Complete deletion of the AZFb interval from the y chromosome in an oligozoospermic man. *Human Reproduction*, 25(10), 2655–2663.
- Lu, C. Jiang, J., Zhang, R., Wang, Y., Xu, M., Qin, Y. *et al.* (2014). Gene copy number alterations in the azoospermia-associated AZFc region and their effect on spermatogenic impairment. *Molecular Human Reproduction*, 20(0), 836–843.
- Lu, C. Zhang, J., Li, Y., Xia, Y., Zhang, F., Wu, B. *et al.* (2009). The b2/b3 subdeletion shows higher risk of spermatogenic failure and higher frequency of complete AZFc deletion than the gr/gr subdeletion in a Chinese population. *Human Molecular Genetics*, 18(6), 1122–1130.
- Luddi, A., Margollicci, M., Gambera, L., Serafini, F., Cioni, M., De Leo, V., *et al.* (2009). Spermatogenesis in a man with complete deletion of USP9Y. *The New England journal of medicine*, 360(9), 881–885.
- Lynch, M., Cram, D.S., Reilly, A., O'Bryan, M. K., Baker, H.W.G., de Kretser D.M., & McLachlan, R.I. (2005). The Y chromosome gr/gr subdeletion is associated with male infertility. *Molecular Human Reproduction*, 11(7), 507–512.
- Marshall Graves, J.A. (1998). Evolution of the mammalian Y chromosome and sex determining genes. *Journal of Experimental Zoology*, 281(5), 472–481.
- Martin, R.H. (2008). Cytogenetic determinants of male fertility. *Human Reproduction Update*, 14(4), 379–390.
- Martinez, M.C., Bernabe, M.J., Gomez, E., Ballesteros, A., Landeras, J., Glover, G., *et al.* (2000). Screening for AZF deletion in a large series of severely impaired spermatogenesis patients. *Journal of Andrology*, 21(5), 651-655.
- Mazeyrat, S., Saut, N., Sargent, C.A., Grimmond, S., Longepied, G., Ehrmann, I.E., *et al.* (1998). The mouse Y chromosome interval necessary for spermatogonial proliferation is gene dense with syntenic homology to the human AZFa region. *Human Molecular Genetics*, 7(11), 1713–1724.
- McLachlan, R.I. (2000). The endocrine control of spermatogenesis. *Best Practice and Research: Clinical Endocrinology and Metabolism*, 14(3), 345–362.
- Miyamoto, T., Tsujimura, A., Miyagawa, Y., Koh, E., Namiki, M., & Sengoku, K. (2012). Male Infertility and Its Causes in Human. *Advances in Urology*, 1-7.

- Munné, S., Sandalinas, M., Escudero, T., Velilla, E., Walmsley, R., Sadowy, S., *et al.* (2003). Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reproductive biomedicine online*, 7(1), 91–97.
- Navarro-Costa, P., Plancha, C.E. & Gonçalves, J. (2010). Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: Thriller or filler for male (In)fertility? *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-18.
- O'Donnell, L. Robertson, K.M., Jones, M.E., Simpson, E.R. *et al.* (2001). Estrogen and spermatogenesis. *Endocrine Reviews*, 22(3), 289–318.
- O'Flynn O'Brien, K.L., Varghese, A.C. & Agarwal, A. (2010). The genetic causes of male factor infertility: A review. *Fertility and Sterility*, 93(1), 1–12.
- Oates, R.D., Silber, S., Brown, L.G., & Page, D.C. (2002). Clinical characterization of 42 oligospermic or azospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. *Human Reproduction* 17(11), 2813-2824.
- Ombelet, W., Campo R., Bosmans, E., & Nijs, M. (2008). Intrauterine insemination (IUI) as a first-line treatment in developing countries and methodological aspects that might influence IUI success. *Human Reproduction*, 2008(1), 64–72.
- Orbán-Németh, Z., Simader, H., Badurek, S., Trančíková, A., & Propst, F. (2005). Microtubule-associated protein 1S, a short and ubiquitously expressed member of the microtubule-associated protein 1 family. *Journal of Biological Chemistry*, 280(3), 2257–2265.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. (1992). Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*, 340 (8810), 17-18.
- Parekattil, S. J., & Agarwal, A. (Eds.). (2012). Male Infertility: Contemporary Clinical Approaches, Andrology, ART & Antioxidants. *Springer Science & Business Media*.
- Park, S.H., Lee, H.S., Choe, J.H., Lee, J.S. & Seo, J.T. (2013). Success rate of microsurgical multiple testicular sperm extraction and sperm presence in the ejaculate in Korean men with Y chromosome microdeletions. *Korean Journal of Urology*, 54(8), 536-540.
- Patrat, C., Biennu, T., Janny, L., Faure, A.K., Fauque, P., Aknin-Seifer, I. *et al.* (2010). Clinical data and parenthood of 63 infertile and Y-microdeleted men. *Fertility and Sterility*, 93(3), 822-832.

- Peterlin, B., Kunej, T., Sinkovec, J., Gligorievska, N., & Zorn, B. (2002). Screening for Y chromosome microdeletions in 226 Slovenian subfertile men. *Human Reproduction*, 17(1), 17-24.
- Piomboni, P., Focarelli, R., Stendardi, A., Ferramosca, A., Zara, V. (2012). The role of mitochondria in energy production for human sperm motility. *International Journal of Andrology*, 35(2), 109–124.
- Plotton, I., Ducros, C., Pugeat, M., Morel, Y., Lejeune, H., *et al.* (2010). Transmissible microdeletion of the Y-chromosome encompassing two DAZ copies, four RBMY1 copies, and both PRY copies. *Fertility and Sterility*, 94(7), 11–16.
- Poongothai, J., Gopenath, T.S. & Manonayaki, S. (2009). Genetics of human male infertility. *Singapore medical journal*, 50(4), 336–347.
- Pundir, J., Sunkara, S.K., El-Toukhy, T., Khalaf, Y. (2012). Meta-analysis of GnRH antagonist protocols: Do they reduce the risk of OHSS in PCOS? *Reproductive BioMedicine Online*, 24(1), 6–22.
- Quintana-Murci, L. & Fellous, M. (2001). The Human Y Chromosome: The Biological Role of a “Functional Wasteland.” *Journal of biomedicine & biotechnology*, 1(1), 18–24.
- Ramalho-Santos, J. (2012). Meiose e Gametogénese, In: *Biologia Celular e Molecular*, Cap. 23, (Azevedo, C., Sunkel, C. E., eds.), 5ª edição, LIDEL, Lisboa, 417-435
- Ramalho-Santos, J., Amaral, A., Sousa, A. P., Rodrigues, A. S., Martins, L., Baptista, M., Mota, P. C., Tavares, R., Amaral, S., & Gamboa, S. (2007) Probing the Structure and Function of Mammalian Sperm using Optical and Fluorescence Microscopy. *Modern Research and Educational Topics in Microscopy*, 1, 394-402.
- Redlara – Red Latinoamericana de Reproducción Assistida. (2006). Manual de Procedimentos, Laboratório de reprodução assistida.
- Reijo, R., Alagappan, R.K., Patrizio, P., & Page, D.C. (1996). Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *Lancet*, 347(9011), 1290–1293.
- Reijo, R., Lee, T.Y., Salo, P., Alagappan, R., Brown, L.G., Rosenberg, M., *et al.* (1995). Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genetics*, 10(4), 383–393.
- Repping, S., Skaletsky, H., Brown, L., van Daalen, S.K., Korver, C.M., Pyntikova, T., *et al.* (2003). Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. *Nature Genetics* 35(3), 247–251.

- Repping, S., Skaletsky, H., Lange, J., Silber, S., Van Der Veen, F., Oates, R.D., *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(4), 906–922.
- Repping, S., van Daalen, S.K., Korver, C.M., Brown, L.G., Marszalek, J.D., Gianotten, J., *et al.* (2004). A family of human Y chromosomes has dispersed throughout northern Eurasia despite a 1.8-Mb deletion in the azoospermia factor c region. *Genomics*, 83(6), 1046–1052.
- Rooney, D.E., & Czepulkowski, B.H. (1997). Human Chromosome Preparation. Essential Techniques. (Series Editor: B Rickwood). *John Wiley & Sons Ltd, UK*.
- Ruggiu, M. & Cooke, H.J. (2000). In vivo and in vitro analysis of homodimerisation activity of the mouse Dazl1 protein. *Gene*, 252(1-2), 119–126.
- Sá, R., Barros, A., Sousa, M. (2007). Medicina da Reprodução Laboratorial. Manual do Internato Médico.
- Sá, R., Sousa, M., & Barros, A. (2007). Manual do casal infértil. In: Biologia na Noite, Soares A (Ed), *Editora Afrontamento*, Aveiro.
- Sá, R., Sousa, M., Cremades, N., Alves, C., Pinho, M.J., Silva, J., & Barros, A. (2006). Haploidization. *Revista Internacional de Andrologia* 4, 9-24.
- Sadeghi-Nejad, H. & Farrokhi, F. (2007). Genetics of azoospermia: current knowledge, clinical implications, and future directions. Part I. *Urology journal*, 3(4), 193–203.
- Sargent, C.A., Boucher, C.A., Kirsch, S., Brown, G., Weiss, B., Trundley, A., *et al.* (1999). The critical region of overlap defining the AZFa male infertility interval of proximal Yq contains three transcribed sequences. *Journal of Medical Genetics*, 36(9), 670-677.
- Sasso, R.C., Kenneth Burkus, J. & LeHuec, J.C. (2003). Retrograde ejaculation after anterior lumbar interbody fusion: transperitoneal versus retroperitoneal exposure. *Spine*, 28(10), 1023–1026.
- Saxena, R., de Vries, J.W.A., Repping, S., Alagappan, R.K., Skaletsky, H., Brown, L.G., *et al.* (2000). Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome. *Genomics*, 67(3), 256-267.
- Sen, S., Pasi, A.R., Dada, R., Shamsi, M.B., & Modi, D. (2013). Y chromosome microdeletions in infertile men: prevalence, phenotypes and screening markers for the Indian population. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 30(3), 413–422.

- Simoni, M., Bakker, E. & Krausz, C. (2004). EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. *International Journal of Andrology*, 27(4), 240-249.
- Simoni, M., Kamischke, A. & Nieschlag, E. (1998). Current status of the molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions in the work.up of male infertility. Initiative for international quality control. *Human Reproduction*, 13(7), 1764-1768.
- Sin, H.S., Koh, E. Taya, M. Iijima, M. Sugimoto, K. Maeda, Y., *et al.* (2011). A novel y chromosome microdeletion with the loss of an endogenous retrovirus related, testis specific transcript in AZFb region. *Journal of Urology*, 186(4), 1545–1552.
- Skaletsky, H., Kuroda-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 is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*, 423(6942), 825–837.
- Soares, A.R., Costa, P., Silva, J., Sousa, M., Barros, A. & Fernandes, S. (2012). AZFb microdeletions and oligozoospermia-which mechanisms? *Fertility and Sterility*, 97(4), 858–863.
- Sousa, M. (2012) Fertilização Animal, In: *Biologia Celular e Molecular*, Cap. 24, (Azevedo, C., Sunkel, C. E., eds.), 5ª edição, LIDEL, Lisboa, 436-454.
- Sousa, M., Cremades, N., Silva, J., Oliveira, C., Ferraz, L., Teixeira da Silva, J., *et al.* (2002). Predictive value of testicular histology in secretory azoospermic subgroups and clinical outcome after microinjection of fresh and frozen-thawed sperm and spermatids. *Human Reproduction* 17(7), 1800-1810,
- Sousa, M., Cunha, M., Teixeira da Silva, J. T., Oliveira, C., Silva, J., Viana, P., & Barros, A. (2015). Ovarian hyperstimulation syndrome: a clinical report on 4894 consecutive ART treatment cycles. *Reproductive Biology and Endocrinology* 13,1-9.
- StatSoft, Inc. (2013). Electronic Statistics Textbook. Tulsa, OK: StatSoft. WEB: <http://www.statsoft.com/textbook/>.
- Stuppia, L., Gatta, V., Fogh, I., Gaspari, A.R., Morizio, E., Mingarelli, R., *et al.* (2001). Genomic organization, physical mapping, and involvement in Yq microdeletions of the VCY2 (BPY 2) gene. *Genomics*, 72,153–157.
- Suganthi, R., Vijesh, V.V., Vandana, N., & Banazir, J.A.F. (2014) Y chromosomal microdeletion screening in the workup of male infertility and its current status in India. *Int J Fertil Steril* 7(4), 253-266.

- Sutovsky, P., & Manandhar, G. (2006). Mammalian spermatogenesis and sperm structure: anatomical and compartmental analysis, In: *The Sperm Cell*, Cap. 1, (De Jonge, C., Barratt, C., eds), 1st edition, Cambridge University Press, Cambridge, 1-30.
- Tesarik, J., & Sousa, M. (1995). Key elements of a highly efficient intracytoplasmic sperm injection technique: Ca²⁺ fluxes and oocyte cytoplasmic dislocation. *Fertility and sterility*, 64(4), 770-776.
- Tesarik, J., & Sousa, M. (1995). Key elements of a highly efficient intracytoplasmic sperm injection technique: Ca²⁺ fluxes and oocyte cytoplasmic dislocation. *Fertility and Sterility*, 64(4), 770-776.
- Tesarik, J., Sousa, M., & Testart, J. (1994) Human oocyte activation after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, 9(3), 511-518.
- Tessari, A., Salata, E., Ferlin, A., Bartoloni, L., Slongo, M.L. & Foresta, C. (2004). Characterization of HSFY, a novel AZFb gene on the Y chromosome with a possible role in human spermatogenesis. *Molecular Human Reproduction*, 10(4), 253-258.
- Thangaraj, K., Gupta, N.J. Pavani, K., Reddy, A.G., Subramanian, S., Rani, D.S., *et al.* (2003). Y chromosome deletions in azoospermic men in India. *Journal of Andrology*, 24(4), 588-597.
- Tiepolo, L. & Zuffardi, O. (1976). Original Investigations Localization of Factors Controlling Spermatogenesis in the Nonfluorescent Portion on the Human Y Chromosome Long Arm. *Human Genetics*, 34(2), 119-124.
- Tilford, C.A., Kuroda-Kawaguchi, T., Skaletsky, H., Rozen, S., Brown, L.G., Rosenberg, M. *et al.* (2001). A physical map of the human Y chromosome. *Nature*, 409(6822), 943-945.
- Totonchi, M., Meybodi, A.M., Boroujeni, P.B., Gilani, M.S., Almadani, N. & Gourabi, H. (2012). Clinical data for 185 infertile Iranian men with Y-chromosome microdeletion. *Journal of Assisted Reproduction and Genetics*, 29(8), 847-853.
- Tse, J.Y.M., Wong, E.Y.M., Cheung, A.N.Y., Tam, P.C., & Yeung, W.S.B. (2003). Specific expression of VCY2 in human male germ cells and its involvement in the pathogenesis of male infertility. *Biology of reproduction*, 69(3), 746-751
- Van der Ven, K., Montag, M., Peschka, B., Leygraaf, J., Schwanitz, G., Haidl, G., *et al.* (1997). Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Molecular Human Reproduction*, 3(8), 699-704.

- Van Golde, R.J., Wetzels, A.M., de Graaf, R., Tuerlings, J.H., Braat, D.D. & Kremer, J.A. (2001). Decreased fertilization rate and embryo quality after ICSI in oligozoospermic men with microdeletions in the azoospermia factor c region of the Y chromosome. *Human Reproduction*, 16(2), 289-292.
- Van Steirteghem, A. C., Liu, J., Joris, H., Nagy, Z., Janssenswillen, C., Tournaye, H., ... & Devroey, P. (1993). Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. Report of a second series of 300 consecutive treatment cycles. *Human Reproduction*, 8(7), 1055-1060.
- Van Steirteghem, A. C., Nagy, Z., Joris, H., Liu, J., Staessen, C., Smits, J., ... & Devroey, P. (1993). High fertilization and implantation rates after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reproduction*, 8(7), 1061-1066.
- Vandervorst, M., Liebaers, I., Sermon, K., Staessen, C., De Vos, A., Van de Velde, H., *et al.* (1998). Successful preimplantation genetic diagnosis is related to the number of available cumulus-oocyte complexes. *Human Reproduction*, 13(11), 3169–3176.
- Venables, J.P., Elliott, D.J., Makarova, O.V., Makarov, E.M., Cooke, H.J., Eperon, I.C., *et al.* (2000). RBMY, a probable human spermatogenesis factor, and other hnRNP G proteins interact with Tra2 β and affect splicing. *Human Molecular Genetics*, 9(5), 685–694.
- Vogt, P.H. (1998). Human chromosome deletions in Yq11, AZF candidate genes and male infertility: history and update. *Molecular Human Reproduction*, 4(8), 739–744.
- 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(1), 81–93.
- Vogt, P.H., Edelmann, A., Kirsch, S., Henegariu, O., Hirschmann, P., Kiesewetter, F. *et al.* (1996). Human Y Chromosome Azoospermia Factors (AZF) Mapped to Different Subregions in Yq11. *Human Molecular Genetics*, 5(7), 933–943.
- Vollrath, D., Foote, S., Hilton, A. *et al.* (1992). The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science*, 258(5079), 52–59.
- Voorhis, B.J.V. (2007). In Vitro Fertilization. *The New England Journal of Medicine*, 379–386.
- Walker, W.H. (2010). Non-classical actions of testosterone and spermatogenesis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences*, 365(1546), 1557–1569.

- Wei, C.L., Kainuma, M. & Hershey, J.W.B. (1995). Characterization of yeast translation initiation factor 1A and cloning of its essential gene. *Journal of Biological Chemistry*, 270(39), 22788–22794.
- Weinbauer, G. F., Luetjens, C. M., Simoni, M., & Nieschlag, E. (2010). Physiology of Testicular Function, In: *Andrology Male Reproductive Health and Dysfunction*, Cap.2, (Nieschlag, E., Behre, H. M., Nieschlag, S., eds.), 3rd edition, Springer, Verlag Berlin Heidelberg, 11-60.
- WHO (2010) *WHO laboratory Manual fo the Examination and Processing of Human Semen*- 5th ed , Cambridge University Press, Cambridge.
- Wong, E.Y.M. Tse, J.Y.M., Yao, KM., Lui, V.C.H., Tam, PC., & Yeung, W.S.B. (2004). Identification and characterization of human VCY2-interacting protein: VCY2IP-1, a microtubule-associated protein-like protein. *Biology of reproduction*, 70(3), 775–784.
- Witzl, K., Zorn, B. & Peterlin, B. (2006). Preliminary analysis of AZFb region duplication by quantitative real-time PCR. *Human Reproduction*, 21(3), 753–754.
- Xu, E.Y. Lee, D.F., Klebes, A., Turek, P.J., Kornberg, T.B., & Reijo Pera, R.A. (2003). Human BOULE gene rescues meiotic defects in infertile flies. *Human Molecular Genetics*, 12(2), 169–175.
- Zar JH. (2009). *Biostatistical analysis*. 5th edition. 960 pages. Pearson, USA.

8. Anexos

Alterações de espermograma	Tempo de abstinência- 2-5 dias são necessários para que se acumule uma grande quantidade de espermatozoides nos epidídimos.
	Volume- 2-5 ml é o volume normal do sémen. Pode haver hipoespermia (volume reduzido) e hiperespermia (volume aumentado) que indicam poucos ou nenhuns espermatozoides.
	pH- valor de referencia é $\geq 7,2$, se for ácido (>7) indica infecção pelo bacilo da tuberculose ou ausência congénita dos canais deferentes.
	Viscosidade- quando esta está aumentada aliado a um tempo de liquefação também aumentado ($> 30\text{min}$) é indicação para análise do gene da fibrose quística (CFTR).
	Concentração- o valor normal é de ≥ 20 milhões/ml quando há diminuição da concentração temos uma oligozoospermia e a ausência de espermatozoides é intitulada de azoospermia.
	Motilidade- classificação em PR (progressivos rápidos), NP (não progressivos) IM (imóveis) e considera-se haver astenozoospermia quando se verifica um valor de PR $> 32\%$ e necrozoospermia quando é considerada imobilidade total.
	Morfologia- o valor de referência é de $\geq 4\%$ de espermatozoides normais, a diminuição neste número é chamada de teratozoospermia.
	Resistência da membrana- capacidade de mobilidade no trajeto desde o canal vaginal até a extremidade distal da trompa, na fecundação. É calculada pela vitalidade e pelo teste hipo-osmótico, que devem ser $\geq 60\%$.
	Aglutinação- a ocorrência deste fenómeno indica a presença de anticorpos anti-espermatozoides.
	Infeções- a presença de leucócitos, bactérias, fungos ou protozoários é indicativo de infecção, é feita a identificação destes com espermocultura.
Presença de células germinais imaturas- indica descamação do epitélio germinal, característico das infeções e aquando da diminuição da qualidade e número de espermatozoides.	
Criptorquidia	Doença congénita caracterizada pela incompleta descida dos testículos para o escroto, tomando lugar na região abdominal ou no canal inguinal. É uma causa de azoospermia secretora. A ausência congénita do testículo tem o nome de anorquidia.
Anomalias endócrinas	Muitas patologias masculinas como a anorquidia, criptorquidia, diminuição do volume testicular, atraso no crescimento ou atraso no aparecimento dos caracteres sexuais secundários devem ser estudadas em termos endocrinológicos. A testosterona é administrada para tratar défices no desenvolvimento sexual, FSH e LH é usada para a estimulação da produção de espermatozoides.
Anomalias Genéticas	Anomalias cromossómicas: - Estruturais: Translocações robertsonianas (fusão dos braços longos de dois cromossomas acrocêntricos), translocações recíprocas, de normospermia para azoospermia e inversões (Martin <i>et al.</i> , 2008) - Numéricas: Alteração no número de cromossomas. O síndrome de Klinefelter (47,XXY) é caracterizado por estatura elevada e hipogonadismo. A maioria destes casos apresentam azoospermia ou oligozoospermia severa. A diploidia é das anomalias cromossómicas mais frequentes originada a partir de mutações na meiose ou por um ambiente testicular comprometido (Poongothai. <i>et al.</i> , 2009).
	Anomalias génicas: Alterações nos genes, como a uma proteína que codifica o gene CFTR (<i>Cystic fibrosis transmembrane conductance regulator</i>) estando situada no braço longo do cromossoma 7. Afeta os canais iónicos no epitélio da membrana celular levando à fibrose cística e ausência congénita bilateral dos vasos deferentes (CBAVD).

	<p>Microdeleções no cromossoma Y: Causada pelo desaparecimento de genes no cromossoma Y, está presente em homens com fertilidade reduzida. Microdeleções no braço longo do cromossoma Y (Yq) são as mais significativas associadas a azoospermia, oligozoospermia severa e insuficiência testicular primária grave com uma baixa densidade de espermatozoides. Deleções <i>de novo</i> também são microdeleções neste braço longo (Yq) com uma incidência significativa (Poongothai. <i>et al.</i>, 2009).</p>
Azoospermia	<p>Secretora: Esta doença é consequência de lesões ao nível da espermatogénese e tem inúmeras causas tanto genéticas como secundárias. Caracterizada pela não produção de espermatozoides ou produção em número insuficiente. Pode estar associada a vários fatores como criptorquidia, anomalias do cariótipo, mutações genéticas do cromossoma Y, distúrbios endócrinos, infeção testicular ou exposição a tóxicos ou radioterapia e quimioterapia. Associada também a várias síndromes como SCOS (ausência completa de células germinais), MA (paragem da maturação das células germinais em meiose) e HP (hipoespermatogénese).</p>
	<p>Obstrutiva: Há produção de espermatozoides que estão ausentes no ejaculado, causado pela obstrução dos canais deferentes que normalmente os conduzem para o exterior ou ausência congénita dos canais genitais excretores. Se a causa for genética os pacientes devem efetuar ecografia renal e pélvica, assim como o estudo das mutações no gene CFTR. Também pode ser devido a vasectomia. Geralmente é secundária a infeções genitais, a cirurgia escrotal, e a cirurgia de correção de hérnia inguinal.</p>
Distúrbios da ejaculação	<p>Anejaculação: definida como a ausência de ereção e/ou de ejaculação causada por lesões na medula espinhal ou dos nervos pélvicos, ou associada a doenças vasculares, medicamentos e distúrbios do foro psicológico.</p>
	<p>Ejaculação retrógrada: O mecanismo desta disfunção é a incapacidade do esfíncter interno da bexiga, o músculo na base da bexiga, de contrair durante a o ato ejaculatório. A ejaculação retrógrada ocorre, quando o sémen reflui para a bexiga urinária em vez de viajar até a uretra e ser expelido para o exterior (Sasso <i>et al.</i>, 2003).</p>
	<p>Aproximadamente 10% dos homens inférteis apresentam um sistema genital sem quaisquer problemas, sendo diagnosticados como inférteis sem razão aparente, pois há anomalias dos espermatozoides para os quais não há testes de deteção. A incapacidade de ligação ou penetração dos revestimentos externos do ovócito, incapacidade de fusão ou ativação pós-fusão com o ovócito são causas comuns para esta infertilidade “idiopática”.</p>
	<p>Hidrocelo: Acumulação congénita de líquido no escroto, diminui a qualidade do sémen.</p>
	<p>Varicocelo: É uma anomalia vascular do escroto em que há veias espermáticas dilatadas e tortuosas dentro do plexo pampiniforme. Diminui a qualidade do sémen.</p>
	<p>Quistos do epidídimo: É uma causa da azoospermia obstrutiva, pode ser congénito ou secundário a infeções.</p>
	<p>Torção testicular: Ocorre acidentalmente e pode levar á remoção do testículo (orquidectomia).</p>
	<p>Traumatismos escrotais: É uma causa de azoospermia secretora.</p>
Tumores malignos	<p>O tratamento destes casos é sempre muito agressivo, podendo ser necessária intervenção cirúrgica de remoção do órgão (no caso do testículo, orquidectomia), quimioterapia e radioterapia, estes tratamentos causam esterilidade.</p>

<p>Anomalias anatômicas</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Modificação da morfologia dos genitais externos (intersexo); -Modificação do tamanho e forma do pênis (micropênis); -Modificação da localização do meato urinário (hipospádias; epispádias); -Modificação da dimensão e posicionamento dos testículos (hipotrofia: diminuição moderada do volume. Atrofia: diminuição acentuada do volume. Criptorquidia e anorquidia)
<p>Outras causas de infertilidade</p>	<ul style="list-style-type: none"> -Frequência de relações sexuais; -Antecedentes familiares; -Hábitos, alimentação, desporto, profissão e medicamentos (aumento da temperatura escrotal, nicotina, drogas, álcool, obesidade, magreza, sedentarismo, químicos industriais e alimentares, poluição do ar, radiações); -Patologias sistémicas, cardiovasculares, eritrocitárias, da hemoglobina e da coagulação (doenças respiratórias, auto-ímmunes, gastro-intestinais, neurológicas, psiquiátricas e mentais); -Traumatismos e acidentes; -Stress ocupacional e associado á incapacidade de conceber e aos tratamentos de RMA.

Anexo 1: Causas de infertilidade Masculina

Cariótipos Anormais (25)	Microdeleções
46,X,der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.2)	a-b-c
46,XX	a-b-c
46,X der(X), t(X;Y)	a-b-c
46,XX (SRY+)	a-b-c
46,X, der(X)t(X;Y)	a-b-c
46,X,del(Y)	a-b-c
46,X,del(Y)	a-b-c
46,X, der(X)t(X;Y)(p22.3;p11.2)	a-b-c
46,XY(25)/45,X(10)	b-c
46,X,+mar	b-c
46,X,dic(Y;Y)	b-c
45,X(13)/46,X,idic(Y)(q11.2)(16)	b-c
46,XY, del(Y)(q11.23)	b-c
46,X,dic(Y;Y)	b-c
46,X,idic(Y)	b-c
46,X,del(Y)	b-c
46,X,del(Y)q11.22?1?2)	b-c
46,X,idic(Y)	b-c
46,X,del(Y)	b-c
46,X,dic(Y;Y)	b-c
46,XY, t(3;7)	c
46,X,dic(Y;Y)	c
46,X,inv(Y)(p11.2q11.2)	c
46,X,inv(Y)	c
45,XY,der(13;14)	c

Anexo 2: Pacientes com anomalias nos cariótipos e com microdeleções no cromossoma Y.

Anexo 3: Produção Científica

- Apresentação de Poster no Evento UMB Summit realizado no Auditório-salão nobre do ICBAS-UP, dia 24 de Setembro 2015

Centro de Genética da Reprodução

FCT

IS

UNIVERSIDADE DE AVEIRO

UNIVERSIDADE DE COIMBRA

UNIVERSIDADE DE BRAGA

UNIVERSIDADE DE LISBOA

UNIVERSIDADE DE PORTO

UNIVERSIDADE DE TRÁS-OS-MONTES E ALTO ALGARVE

Embryological and clinical outcomes of patients with Y-chromosome microdeletions

¹Carolina Gonçalves, ²Mariana Cunha, ⁴Eduardo Rocha, ⁵Susana Fernandes, ³Josquina Silva, ⁶Paulo Viana, ⁴Luís Ferraz, ³José Teixeira da Silva, ²Cristiano Oliveira, ³Alberto Barros and ³Mário Sousa[✉]

1-Department of Biology, University of Aveiro (UA), Campus Universitário de Santiago, Aveiro, Portugal;

2-Department of Microscopy, Laboratory of Cell Biology, Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar, University of Porto (ICBAS-UP), Porto, Portugal; Multidisciplinary Unit for Biomedical Research-UMIB, ICBAS-UP;

3-Centre for Reproductive Genetics Prof. Alberto Barros (CGR), Porto, Portugal;

4-Department of Microscopy, Laboratory of Histology and Embryology, ICBAS-UP, Porto, Portugal;

5-Department of Gynecology, Faculty of Medicine, University of Porto (FMUP), Porto, Portugal; Institute for Innovation and Health Research (I3S), University of Porto, Portugal;

6-Department of Urology, Hospital Center of Vila Nova de Gaia, Vila Nova de Gaia, Portugal.

Correspondence [✉]: m.sousa@icbas.up.pt

Objectives

The aim of the present work was to present the outcomes of patients with Y-chromosome microdeletions treated by intracytoplasmic sperm injection (ICSI), either using fresh (TESE) or frozen-thawed (TESE-C) testicular sperm, and ejaculated sperm (EJAC). The originality of this work resides in the comparisons between the different types of Y-microdeletions (AZFa, AZFb, AZFc) and treatments, with detailed demographic, stimulation, embryological, clinical and newborn (NB) outcomes.

Methods

- ✓ Selection of Patients
- ✓ Karyotype analysis
- ✓ Y chromosome screening
- ✓ Testicular Biopsy Procedure
- ✓ Testicular Sperm Cryopreservation
- ✓ Stimulation Protocols
- ✓ Oocyte and Embryo Handling
- ✓ Lutal Supplementation
- ✓ Through statistical analysis, we evaluated 128 patients with AZF microdeletions to determine whether there are any significant differences in outcomes between the different types of Y-microdeletions using TESE, TESE-C or EJAC.

Results

Clinical and Embryological Results:

- ✓ In TESE and EJAC cycles there were no significant differences in embryological and clinical parameters.
- ✓ In TESE-C cycles, there was a significant lower oocyte maturity rate, embryo cleavage rate, mean number of day-3 embryos and mean number of embryos transferred in AZFb, and a higher mean number of oocytes and lower fertilization rate in AZFc.
- ✓ There was 1 major malformation (in AZFc/TESE), 1 NB with very preterm delivery (in AZFc/TESE), 2 NB with preterm birth delivery (in AZFc: 1 in TESE-C; 1 in EJAC) and 8 NB with low birth weight (in AZFc: 3 in TESE, 2 in TESE-C and 3 in EJAC).

Genetic Results:

- ✓ Patients with AZFa microdeletions do not present sperm in their seminiferous tubules.
 - Sperm could be retrieved only in the presence of an isolated DBY microdeletion and in this isolated microdeletion associated with a P4/P4 microdeletion.
 - The case with an AZFabc microdeletion and retrieved sperm has an abnormal karyotype and the rare immature testicular sperm found did not fertilize the oocyte.
- ✓ Patients with AZFb microdeletions have no sperm in the seminiferous tubules.
 - Sperm could be retrieved only in the presence of:
 - a P5/proximal P1 microdeletion, with no pregnancy,
 - a IR4/distal P2 microdeletion, with ejaculated sperm and no fertilization,
 - a IR4/proximal P1 microdeletion, with a singleton abortion;
 - a IR4/distal P1 microdeletions (2 cases AZFbc), with ejaculated sperm (triplet abortion) or with testicular sperm (no pregnancy).

Specific cases with Y-chromosome microdeletions in the AZFa and AZFb regions and sperm retrieved.

AZFa	Testicular Phenotype	Localization of deletion	AZFb	Testicular Phenotype	Localization of deletion
AZFa	Mosaic sperm	Cryptic deletion	AZFb	Ejaculated sperm	IR4/distal P1
AZFa	Mosaic sperm	P4/P4 + DBY deletion	AZFb	Bioprospermatogenic	IR4/distal P1
AZFa	Bioprospermatogenic	P4/P4 + DBY deletion	AZFb/DAZ1,2	Bioprospermatogenic	IR4/proximal P1
AZFa	Mosaic sperm	P4/P4 + DBY deletion	AZFb/DAZ1,2	Ejaculated sperm	IR4/distal P1
AZFa	Bioprospermatogenic	Only DBY deletion	AZFb/DAZ1,2	Bioprospermatogenic	IR4/proximal P1

Polimeric structure of AZFa and AZFb regions.

Conclusions

In conclusion, although patients with AZFc microdeletions presented a high testicular sperm recovery rate and acceptable clinical outcomes, cases with AZFa and AZFb microdeletions presented a poor prognosis. Due to the reported heredity of microdeletions, patients should be informed about the infertile consequences on the NB and the possibility of using preimplantation genetic diagnosis for female sex selection.

References

1. Kessler C, Hoffstein V, et al. BAARD/ESHG best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions state of art 2014. *Andrology* 2014; 2: 5-19
2. Sousa M, Cruzado N, et al. Predictive value of testicular histology in secondary azoospermic subgroups and clinical outcome after microaspiration of testis and frozen-thawed sperm and spermatozoa. *Hum Reprod* 2002; 17: 1800-10.
3. Totsuchi M, Miyoshi AM, et al. Clinical data for 185 infertile Japanese men with Y-chromosome microdeletion. *J Assist Reprod Genet* 2012; 29: 401-10.
4. Vogl PK, Sillsom A, et al. Human Y Chromosome Azoospermia Factor (AZF) Mapped to Different Subregions in 7q11. *Hum Mol Genet* 1995; 4: 933-43.

Funding: This work was financed by the institutions of the authors and in part by Multidisciplinary Unit for Biomedical Research-UMIB, ICBAS-UP (National Funds through FCT-Foundation for Science and Technology, under the Part-CE/SAU/10215/2014).

- Submissão e aceitação de resumo intitulado “Patients with Y chromosome microdeletions: embryological and clinical outcomes” para “*Medicine Journal*”.



Covilhã, 27 October 2015

Submitting author:

Mario Sousa, MD, PhD
Department of Microscopy, Laboratory of Cell Biology,
Institute of Biomedical Sciences Abel Salazar,
University of Porto (ICBAS-UP),
Rua Jorge Viterbo Ferreira, 228,
4050-313 Porto,
Portugal;

Ref. Decision regarding the publication of the abstract by Carolina Gonçalves, and colleagues entitled: “Patients with Y chromosome microdeletions: embryological and clinical outcomes” in the form of proceeding

As Academic Editor in *Medicine® Journal* (Impact factor: 5.7), I am pleased to inform you that the above-noted proceeding has been accepted for publication in the journal. It will be published in electronic form, as well as in the traditional print journal in the first available scheduled issue. Shortly, you will receive an acknowledgement letter detailing information regarding proofs, reprints and copyright transfer.

We once again thank you for your contribution to *Medicine® Journal* and hope that you will continue to submit your works to the journal.

Yours sincerely,

Thank you very much

Marco G. Alves, PhD

Academic Editor *Medicine® Journal* (IF=5.7)

Health Sciences Research Center (CICS)
Faculty of Health Sciences, University of Beira Interior
Av. Infante D. Henrique
6201-506 Covilhã
Portugal
Tel: +351 967 245 248
Personal webpage: <https://sites.google.com/site/academic@biologygroup-members/alves-m-g>

- Submissão de artigo científico intitulado: “Y chromosome microdeletions in non-obstructive azoospermia and severe oligozoospermia”, para “*Asian journal of Andrology (AJA)*” (Manuscript ID: AJA-5205.R1)