

**Universidade Católica de Goiás
Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa
Programa de Mestrado em Genética**

**MICRODELEÇÕES DA REGIÃO AZF (YQ11) DE DESCENDENTES POR
PATRILINHAGEM DE HOMENS INFÉRTEIS**

Goiânia • 2008

**Universidade Católica de Goiás
Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa
Programa de Mestrado em Genética**

**MICRODELEÇÕES DA REGIÃO AZF (YQ11) DE DESCENDENTES POR
PATRILINHAGEM DE HOMENS INFÉRTEIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Mestrado em Genética da Pró-Reitoria de Pós-graduação e Pesquisa da Universidade Católica de Goiás – UCG, como requisito para obtenção do título de Mestre.

Orientando: Ricardo Goulart Rodovalho, B.Sc.

Orientadora: Dra. Kátia Karina Verolli de O. Moura, Dr.

AGRADECIMENTOS

A Deus agradeço por minhas características que possibilitaram a realização dessa meta.

Agradeço de coração aos meus pais, Auro Antônio Rodovalho e Luciana Maria Goulart Rodovalho, pela confiança, amor, dedicação total e por nunca terem medido esforços para a concretização dos meus sonhos.

Aos meus queridos irmãos e amigos, Aurélio Goulart Rodovalho, Luciano Goulart Rodovalho e Murilo Goulart Rodovalho, pelo carinho especial que manifestaram diariamente, pelas inúmeras contribuições para realização desse trabalho, e, também, pelos oportunos momentos de descontração e felicidade que com certeza me fortaleceram bastante para a conclusão de mais uma etapa da minha vida.

À Professora Dr^a. Kátia Karina Verolli de O. Moura, pelo auxílio na orientação, pela dedicação demonstrada ao longo desses anos e, acima de tudo, por sua disponibilidade e enorme atenção nos vários momentos de dificuldade. E, ainda, pela feliz oportunidade de integrar seu círculo de amizade.

Ao Professor e amigo, Dr. Aparecido Divino da Cruz (Peixoto), por toda influência em minha formação e por criar condições para que eu pudesse concluir mais essa importante etapa e subir mais um degrau da minha vida. Por seu companheirismo e afeto e por todas as contribuições que me possibilitaram desenvolver meus próprios valores e características sem, contudo, deixar de refletir suas nobres e inumeráveis qualidades.

À Professora Dr^a. Daniela de Melo e Silva pela colaboração na avaliação desse estudo e pela amizade.

Ao Professor Dr. Antônio Henrique Garcia pela manifestação carinhosa diante do convite para participar deste trabalho, acrescentando-lhe sua inestimável experiência e conhecimento reconhecidos por toda a comunidade científica.

À Professora Dr^a. Rosália Santos Amorim Jesuíno por atenciosamente acolher o pedido para compor a banca examinadora como membro externo ao programa, e também, pela valiosa contribuição que dá a esse trabalho.

À colega Jalsi Tacon Arruda pela contribuição no desenvolvimento de todas as etapas do projeto.

Ao especial amigo Frederico Augusto Cardoso Borges, pelo intenso apoio, pelo grande incentivo na contínua busca de algo melhor para minha vida e formação e, finalmente, pelo prazer de desfrutar de sua valiosa amizade.

Ao meu grande e bom amigo, Eduardo Rocha Pedrosa, pelos ensinamentos e conselhos e, principalmente, por sua disponibilidade em me orientar nos meus momentos de “turbulência”. Agradeço também pelos ensinamentos quanto à utilização dos instrumentos e ferramentas de genética molecular, pois esses conhecimentos adquiridos ampliaram minha formação. Mas acima de tudo, agradeço pelo prazer inimaginável de conviver com sua sinceridade, competência e amizade.

À minha namorada, Andréia Álvares Jácome, pelo enorme carinho, incentivo, auxílio, sensibilidade e pela tolerância nos momentos em que estive ausente.

Aos meus amigos e colegas do Núcleo de Pesquisas Replicon pelo apoio, compreensão e amizade.

A todos os demais amigos, parentes, colegas e professores que, direta ou indiretamente, me ajudaram ou me estimularam na concretização desse projeto.

A todas as pessoas que fizeram parte deste estudo, pacientes portadores de infertilidade masculina e indivíduos saudáveis, que doaram, voluntariamente, amostras biológicas e responderam, pacientemente, ao extenso questionário de coleta de dados.

SUMÁRIO

Agradecimentos	iii
Lista de Figuras	vi
Lista de Tabelas	vii
Lista de Abreviaturas	viii
Resumo	ix
Abstract	x
INTRODUÇÃO	10
INFERTILIDADE	10
CROMOSSOMO Y	13
OBJETIVO	22
MATERIAL E MÉTODOS	23
CASUÍSTICA	23
EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO	23
REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)	24
RESULTADOS	29
DISCUSSÃO E CONCLUSÃO.....	33
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	39

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Ilustração do processo ICSI de reprodução assistida.....	13
Figura 2. Região Pseudo-autossômica entre os cromossomos Y e X.....	14
Figura 3. Esquema do cromossomo Y com as sub-regiões AZF – AZFa, AZFb e AZFc – e os respectivos STS utilizados nesse estudo (AZFa – sY84/86; AZFb – sY127/134 e AZFc – sY254/255.....	16
Figura 4. A: Cromossomo Y normal mostrando as regiões AZF e os genes representantes da espermatogênese. B: Diferentes tipos de supressão no cromossomo Y.	17

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. STS utilizados no estudo molecular das microdeleções da região AZF do cromossomo Y.....	25
Tabela 2. Protocolo para amplificação dos STS em estudo (SRY-ZFX/Y; sY84/86; sY127/134; sY254/255).....	26
Tabela 3. Parâmetros das termociclagens dos STS em estudo (SRY-ZFX/Y; sY84/86; sY127/134; sY254/255).....	27
Tabela 4. Dados clínicos dos probandos da 1 ^a a 6 ^a família e seus respectivos parentes com análise da região AZF.....	30
Tabela 5. Dados clínicos dos probandos da 7 ^a a 13 ^a família e seus respectivos parentes com análise da região AZF.....	32

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- TRA** – Técnicas de Reprodução Assistida
- FIV** – Fertilização *in vitro*
- ICSI** – Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide
- PZD** – Dissecção Parcial da Zona Pelúcida
- SZI** – Inserção do espermatozóide abaixo da zona pelúcida
- DNA** – Ácido Desoxirribonucléico
- SRY** – Sex-Determining Region of de Y Chromosome
- AZF** – Fator de azoospermia
- SCO** – Sertoli Cell Only
- USP9Y** – Ubiquitin-specific protease 9 Y
- DFFRY** – Drosophila fat facets related Y
- DBY** – Dead-box Y RNA helicase
- RNA** – Ácido Ribonucléico
- HERV** – Endogenous retrovirus
- RBM** – RNA binding motif
- DAZ** – Deleted in Azoospermia
- RBM1Y** – RNA binding motif on the Y
- EIF1AY** – Translation-initiation factor 1 A, Y isoform
- DAZL1** – Deleted in Azoospermia Like
- RRM** – Recognition RNA motif
- STS** – Sequence tagged
- PCR** – Reação em cadeia da polymerase

RESUMO

A infertilidade masculina é considerada uma condição de difícil tratamento, o que ocorre pelo fato dela não ser uma entidade única, mas refletir uma variedade de diferentes condições patológicas, dificultando uma estratégia única de tratamento. Alterações estruturais no cromossomo Y têm sido o principal responsável pela infertilidade masculina. Nós investigamos 26 familiares de 13 pacientes portadores de infertilidade masculina que apresentaram deleções na região AZF. Na família 01, o pai e um irmão não apresentaram microdeleção. Entretanto um filho apresentou microdeleção em AZFa (sY84) e espermograma azoospérmico, mas o outro filho apresentou microdeleção em AZFa (sY84) e AZFb (sY127) e um espermograma normal. O pai da família 02, oligozoospérmico severo, apresentou microdeleção na região AZFa (sY84) e seu filho, gerado através da ICSI, também apresentou a mesma microdeleção. Nas outras famílias, apenas os homens com espermograma alterado apresentaram a microdeleção. Provavelmente, na família 01, o pai e o irmão sem microdeleção podem apresentar microdeleções em regiões anteriores ou posteriores àquela analisada. O tratamento com ICSI pode levar à transmissão vertical de microdeleções da região AZF e também pode ocasionar na expansão da mutação “de novo”. Este resultado reforça a necessidade de uma investigação de microdeleção do cromossomo Y em indivíduos candidatos a reprodução assistida, assim como um acompanhamento e aconselhamento genético.

Palavras-chave: infertilidade masculina, cromossomo Y, transmissão vertical.

ABSTRACT

Male infertility is under a difficult condition of treatment, because it is not a single entity, but reflecting a variety of different pathological conditions, preventing a unique strategy of treatment. Structural changes in Y chromosome have been responsible for male infertility. We examined 26 family members of 13 patients with male infertility and had deletions in the AZF region. In the family 01, a father and a brother did not present a microdeletion. However, one son present a microdeletion in AZFa (sY84) and spermogram azoospermic but the another son present a microdeletion in AZFa (sY84) and AZFb (sY127) and a normal spermogram. The father of the family 02, a severe oligozoospermic man, presented a microdeletion in AZFa (sY84) and his son, conceived by ICSI process, also presented the same microdeletion. In the other families, only the men with changed spermogram had presented the microdeletion. Probably, in family 01, the father and the brother without microdeletions can to present microdeletions of previous or posterior regions to that one analyzed. The treatment with ICSI can lead to the vertical transmission of microdeletions in AZF region and also it can cause in the expansion of the mutation “de novo”. This result reinforces the need for an investigation of Y chromosome microdeletion in individual candidates for assisted reproduction, as well as a tracking genetic counseling.

Key words: *male infertility, Y chromosome, vertical transmission.*

INTRODUÇÃO

INFERTILIDADE

Cerca de 8 a 15% dos casais apresentam problemas fisiopatológicos de fertilidade reprodutiva, compreendendo-se por infertilidade o período de insucesso relativo às tentativas de engravidamento natural que excede, por completo, um ano (NIEDERBERGER & MEACHAM, 2003; PASQUALOTTO 2007). Considerada a situação de infertilidade do casal, é necessário sempre realizar uma avaliação do fator masculino e feminino, que compreende basicamente a elaboração de um histórico prévio de fertilidade, o exame físico detalhado, diversos testes laboratoriais para investigar possíveis disfunções orgânicas e, para os homens, a realização de um espermograma (MAEGAWA & CENTA, 2000).

Segundo MAEGAWA & CENTA (2000) as principais causas da infertilidade masculina estão associadas a diversos fatores, entre eles: anormalidades genéticas, fisio e anatomopatológicas, exercícios físicos intensos e prolongados, envelhecimento, uso de drogas, e, até mesmo, tempo excessivo de abstinência. Já para as mulheres as principais causas para a infertilidade, ou mesmo para subfertilidade, se relacionam principalmente com a ocorrência de ciclos menstruais irregulares, desequilíbrio hormonal, bloqueio das tubas de Falópio, alterações fisiológicas das secreções vaginais e da cérvix e a administração indevida de drogas, (LEWIS 2004).

Em cerca de 20%, dos casos a infertilidade masculina não pode ser atribuída a qualquer outra causa. Nestas situações, o papel das alterações genéticas vem sendo cada vez mais investigado (OSELEN *et al.*, 2001; SIMONI *et al.*, 1999). A forma de infertilidade que pode ser classificada como uma desordem genética inclui alterações cromossômicas estruturais, adquiridas ou congênitas, como a principal causa etiológica. (STANKIEWICZ & LUPSKI, 2002; MAEGAWA & CENTA, 2000; TIEPOLO & ZUFFARDI, 1976).

Tradicionalmente, a infertilidade masculina é considerada uma condição de difícil tratamento, que ocorre pelo fato da infertilidade não ser uma entidade única, mas refletir uma ampla variedade de diferentes condições patológicas, dificultando uma abordagem estratégica única para o tratamento. Por outro lado, o intenso avanço tecnológico e terapêutico intensos parecem, cada vez mais, contribuir para ampliar o sucesso no tratamento dessa enfermidade (ABDELMASSIH, 2001).

As técnicas que auxiliam no processo de reprodução humana (TRA – Técnicas de Reprodução Assistida), dividem-se em técnicas de baixa e alta complexidade. Os exemplos dos métodos de baixa complexidade incluem o *coito programado* e as *técnicas de inseminação intra-uterina*, que não apresentam necessidade de serem realizados em centros de reprodução assistida, as técnicas de baixa complexidade são métodos de baixo custo. Por outro lado, a *Fertilização in vitro* (FIV) e a *injeção intracitoplasmática de espermatozóide* (ICSI), se enquadram na categoria dos métodos de alta complexidade (ABDELMASSIH, 2001).

A FIV apresentou seus primeiros resultados no início da década de 70 quando foi descrita pelo grupo de Bourn Hall na Inglaterra (STEPTOE, *et al.*, 1976). Em 1978, o grupo inglês apresentou a primeira gestação de sucesso utilizando a FIV, que resultou no nascimento de um bebê do sexo feminino, registrada como Louise Brown. Nos Estados Unidos, a primeira gravidez foi apresentada um pouco mais tarde, em 1982 (JONES, *et al.*, 1982), enquanto que no Brasil, o primeiro nascimento a partir de FIV ocorreu em 1984. Em 1989, os procedimentos passaram a ser realizados a nível ambulatorial. Porém, a disseminação da metodologia provocou diminuição do seu custo e a estratégia passou a ser oferecida para uma maior parcela da população de casais com infertilidade conjugal (ABDELMASSIH, *et al.*, 1992).

Os procedimentos envolvendo ICSI só foram relatados no início da década de 90, pelo grupo de Van Steirteghem (ABDELMASSIH, 2001). No entanto, a primeira gravidez alcançada por ICSI só ocorreu em 1992, sendo divulgado por Palermo e colaboradores. Atualmente, a ICSI tem sido usada mundialmente no tratamento de homens com problemas de infertilidade resultantes de oligozoospermia severa, teratozoospermia e, até mesmo, azoospermia. Como consequência de uma revolução tecnológica na TRA, houve um aumento significativo das taxas de gravidez por ciclo, que passaram de 5%, em meados de 1970, à cerca de 50% nos dias atuais (ABDELMASSIH, 2001).

Em decorrência da consequente fertilização com amostras seminais ruins, foram desenvolvidas as técnicas de micro-manipulação do óvulo (GLINA *et al.* 2001). A primeira técnica desenvolvida foi a *dissecção parcial da zona pelúcida* (PZD), que consiste basicamente na abertura de uma barreira celular que envolve esse óvulo, denominada zona pelúcida. Posteriormente utilizou-se a inserção do espermatozóide abaixo desta zona (SZI) e finalmente a ICSI.

Segundo TAMANINE (2004), a ICSI consiste na escolha pelos melhores espermatozoides, através de critérios morfológicos, numéricos e da motilidade dos mesmos. Segundo CHANG *et. al.*, (1999), a utilização das técnicas de reprodução assistidas, como a injeção intracitoplasmática de espermatozóide e fertilização *in vitro* podem resultar em gravidez. Mas há risco subsequente de transmissão da infertilidade à prole (LEE *et. al.*, 2006; OLIVA, 2004).

Para PASQUALOTTO (2007), a ICSI representou uns dos principais avanços na abordagem da infertilidade. Porém, existem considerações e amplas discussões a cerca do potencial de transmissão de anormalidades genéticas para os descendentes masculinos (VOGT, 2004).

MALTER & COHEN (2001) ressaltam que a injeção intracitoplasmática de espermatozóide é a alternativa mais segura para o tratamento de infertilidade severa. Conseqüentemente, a maioria dos casais com microdeleção do cromossomo Y optam por ICSI.

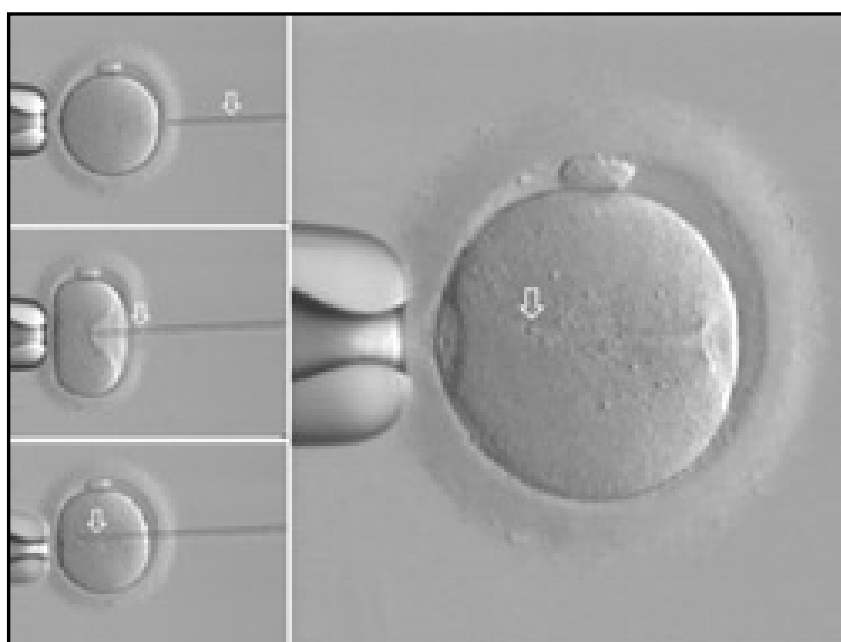


Figura 1. Ilustração do processo ICSI de reprodução assistida. O processo detalhado é observado à esquerda. Fonte: gynekologická praxe --- www.pp-gyn.cz/repromeda.htm.

CROMOSSOMO Y

O conhecimento do genoma associado ao cromossomo Y proporciona uma oportunidade singular para se estudar as mutações de importância médica associadas aos genes mapeados em Y. Por ser haplóide, o cromossomo Y não se recombina durante a meiose, sendo modificados apenas por mutações, correspondendo a um ótimo sistema para se estudar a herança patrilinhar (BLANCO et al., 2000; KRAUSZ et al., 2001). A maior parte desse cromossomo (41Mb do total de 63Mb) é composta por seqüências satélites e por outras repetições. Os 23Mb de região eucromática possuem uma estrutura genética não usual muito rica em seqüências palindrômicas e seqüências duplicadas, que estão perfeitamente próximas destes genes preservando a integridade estrutural de conversões gênicas (KIRSCH et al., 2004).

Da seqüência total do cromossomo Y, 95% constituem uma região não-recombinante contendo eucromatina e heterocromatina, enquanto que os 5% restantes se encontram em ambas as extremidades nas regiões pseudoautosômicas - **PAR1 e PAR2** -. Os genes pseudo-autossômicos apresentam contrapartes no cromossomo X e codificam uma variedade de proteínas que funcionam em ambos os sexos, participando ou controlando atividades tais como crescimento ósseo, transdução de sinal, síntese de hormônios e receptores e metabolismo energético (LEWIS, 2004).

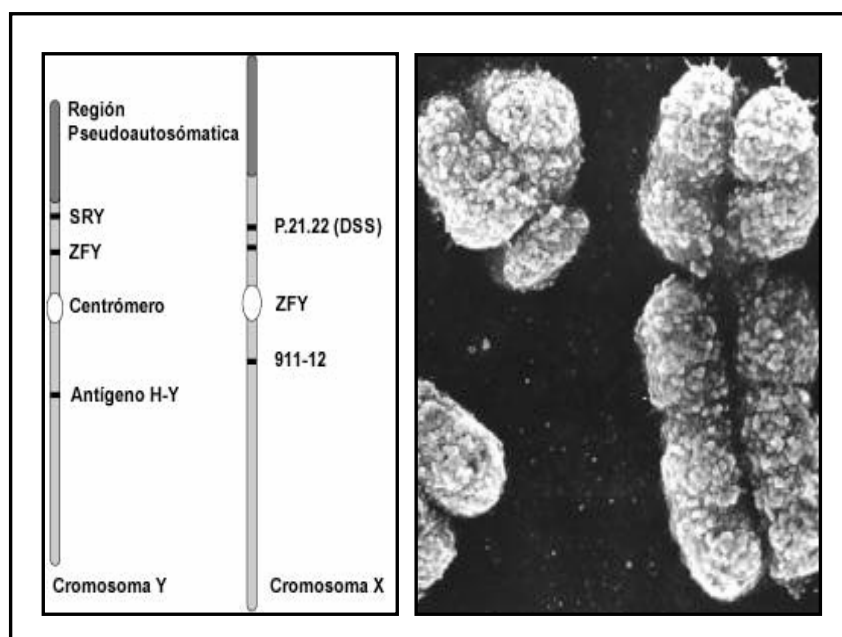


Figura 2. Região pseudo-autossômica entre os cromossomos Y e X. Modificado de: -- www.herbario.com.br/cie/universi/teoria/img0024.jpg.

Nas regiões pseudoautosômicas do Y ocorre o fenômeno do *crossing-over* genético - evento explicado pelo pareamento ocasional entre cromossomos homólogos na meiose e permutas de fragmentos correspondentes - entre os cromossomos X e Y. (ROZEN et al., 2003; GRIFFITHS et al., 2002).

O segundo grupo funcional de genes do cromossomo Y inclui os homólogos X-Y. Esses genes são muito semelhantes em seqüências de DNA a alguns genes no cromossomo X. Os homólogos X-Y são expressos em quase todos os tecidos, inclusive os encontrados apenas em homens. A existência de genes pseudo-autossômicos e homólogos X-Y podem ser evidência de que o cromossomo Y é uma versão simplificada de um cromossomo ancestral semelhante ao X (LEWIS, 2004).

Por último, o terceiro grupo funcional inclui genes exclusivos ao cromossomo Y. Sendo assim, o principal determinante da diferenciação sexual masculina, postulando a existência de um fator determinante testicular, descrito como gene *SRY*, que está localizado próximo a região pseudoautosomal do braço curto do cromossomo Y (Yp11.3). O produto de *SRY* age como um indutor na determinação sexual masculina (DOMENICE et al., 2002).

A translocação do gene *SRY* com o cromossomo X explica o hermafroditismo, no qual os indivíduos apresentam fenótipo masculino, cariótipo 46, XX e são positivos para o gene *SRY* (ARNEDO et al., 2004). Ocorre uma recombinação perto do limite pseudoautosomal do gene *SRY*, de tal forma que este fica translocado no cromossomo X. Aproximadamente 10% dos homens com cariótipo 46,XX, não apresentam *SRY* detectável. A maioria com genitália externa ambígua, embora um fenótipo masculino completo possa ser observado. Estudos indicam que pode haver o desenvolvimento testicular mesmo na ausência do *SRY* (ERDAL & BARLAS, 2000).

Alterações estruturais no cromossomo Y tem sido a principal etiologia da infertilidade masculina (VOGT, 2004; CHANG et al., 1999; TIEPOLO & ZUFFARDI, 1976). Comumente, as modificações estruturais do Y são representadas por deleções, inversões, expansões e/ou duplicações de seqüências contidas nos braços longo e curto deste cromossomo. Em geral, as aberrações envolvem seqüências de DNA relacionadas com o fator para azoospermia, que regula os processos da espermatogênese (TSUJIMURA, et al., 2004; NAKAHORI, et al., 1996).

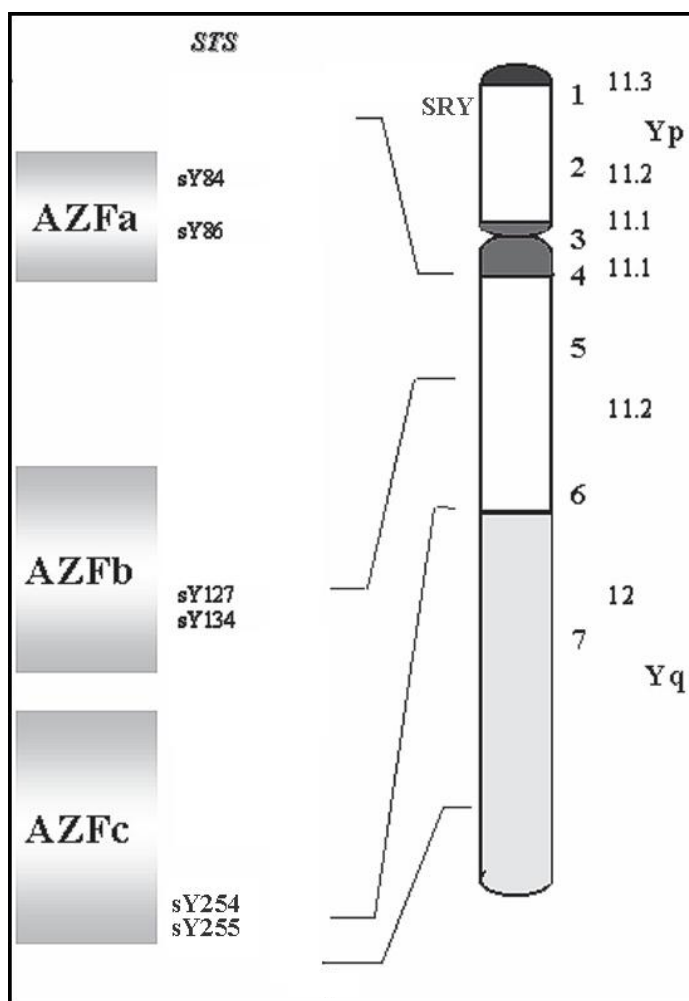


Figura 3. Esquema do cromossomo Y com as sub-regiões AZF – AZFa, AZFb e AZFc – e os respectivos STS utilizados nesse estudo (AZFa – sY 84/86; AZFb – sY 127/134; AZFc – sY 254/255). Modificado de: *Braz J Med Biol Res* 39(4) 2006.

Segundo LANDUYT (2000), a região AZF (Yq11) do cromossomo Y possui genes envolvidos na regulação da espermatogênese. A região AZF foi primeiramente descrita a partir de estudos citogenéticos realizados por TIEPOLO e ZUFFARDI (1976), que identificaram homens inférteis com deleções submicroscópicas, cujos pais possuíam pais com um Y normal, caracterizando, portanto, como mutações *de novo* na prole (KÜHNERT *et. al.*, 2004).

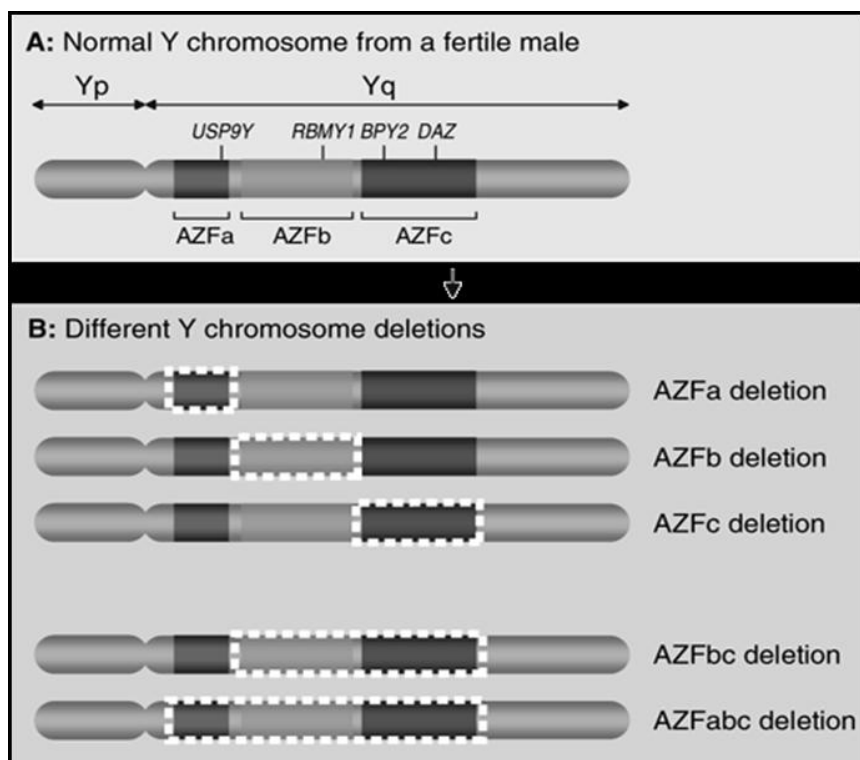


Figura 4. A: Cromossomo Y normal mostrando as regiões AZF e genes relacionados com a espermatogênese. **B:** Diferentes tipos de supressão no cromossomo Y. As linhas pontilhadas indicam as regiões suprimidas. Fonte: *The Medical Journal of Austrália*. --- www.mja.com.au/public/issues/185_08_161006/cra10835_fm-1.gif.

A região AZF foi dividida em três sub-regiões não sobrepostas denominadas AZFa, AZFb e AZFc com tamanho estimado de 1Mb, 1.5Mb e 3Mb, respectivamente (GATTA *et al.*, 2002; BRITON-JONES & HAINES, 2000; LANDUYT *et al.*, 2000; SEIFER *et al.*, 1999). Recentemente, uma quarta subdivisão denominada AZFd foi sugerida (FORESTA *et al.*, 2001).

Microdeleções intersticiais em AZF representam o fator etiológico em 10 a 15% dos casos idiopáticos de azoospermia e oligozoospermia severa (ATHALYE, *et al.*, 2004; DADA *et al.*, 2004; CHANG *et al.*, 1999), onde são encontradas em 38% e 23% respectivamente dos homens portadores de infertilidade (MURCI & FELLOUS, 2001; RAICU *et al.*, 2003). Em alguns subgrupos animais, NAP *et al.* (1999) observou ainda uma incidência superior a 10% de deleções no cromossomo Y.

A literatura relata uma variação na incidência de 1 a 55,5% de microdeleções no Yq relacionada à infertilidade masculina (VOGT, 2005; KRAUSZ *et al.*, 2001; FARGELI *et al.*, 1999), porém, estudos realizados em nosso país por SÃO PEDRO *et al.* (2003) detectaram 6,7% de microdeleções nos pacientes da cidade de São Paulo,

sendo 6,8% azoospermicos e 6,4% oligozoospermicos severos. CARRARA et al. (2004) apontam também a prevalência de 5,3% de microdeleções somente em AZFc de homens brasileiros inférteis, mas PINA-NETO et al. (2006) encontraram 7,5% de microdeleções em todas as três regiões AZF. Todos estes estudos foram realizados na região do sudeste brasileiro.

ARRUDA et al. (2007) realizaram o estudo das microdeleções de homens inférteis na região do centro-oeste brasileiro e encontraram em pacientes com azoospermia 43,4% de microdeleções na região AZFa, 8,6% na região AZFb e 17,4% na região AZFc. Nos oligozoospermicos severos houve 40% na região AZFa, 5% na região AZFb e 5% na região AZFc.

As microdeleções de AZF não estão associadas apenas à azoospermia, mas com uma variedade de perfis histopatológicos testiculares, desde a síndrome da célula única de sertoli (SCO – do inglês, *Sertoli Cell Only*) a hipoespermatogênese (VOGT et al., 1996).

Os genes USP9Y (*Ubiquitin-specific protease 9 Y*) encontram-se na região AZFa também conhecido como DFFRY (*Drosophila fat facets related Y*), e o DBY (*Dead-box Y RNA helicase*), que possuem homólogos no cromossomo X, e quando deletados levam ao fenótipo da síndrome de células únicas de Sertolli mostrando envolvimento na espermatogênese e provável efeito sinérgico (KAMP et al., 2000; SUN et al., 2000; KRAUSZ et al., 2006). As microdeleções das regiões AZFb e AZFc provocam, respectivamente, interrupção em meiose I e hipoespermatogênese (FERRÁS et al., 2004)

As microdeleções em AZFa são causadas por recombinações não-alélicas entre duas seqüências de retrovírus endógenos humanos (HERV) de ~10kb que flanqueiam 780Kb desta região, sendo que o HERV distal possui um fragmento L1 inserido com ~1.5Kb (BOSCH & JOBLNG, 2003). HERV são integrações estáveis no genoma humano, e consequentemente, são transmitidas por herança mendeliana. Embora tenha sido reportado várias seqüências altamente variáveis no número de cópias (1 a >100 por genoma haplóide) em diferentes indivíduos (KAMP et al., 2001; HAN et al., 2004; ANDERSSON et al., 2005; PARSEVAL & HEIDMANN, 2005; HUH et al., 2006).

Dois genes ou famílias, *RBM* e *DAZ/SPGY1* tem sido isolados proveniente do Yq11. Ambos mostram a expressão testicular específica e codificam proteína com domínios de “ligante ao RNA” (VOGT et al, 1996; YEN et al, 1996). O gene *RBM* (*RNA binding motif on the Y*), esta localizado na região AZFb, junto com outro gene o

EIFIAY (*translation-initiation factor 1 A, Y isoform*), mas até agora apenas o primeiro foi relacionado com infertilidade. O *RBMV* pertence a uma família de 20-50 genes e pseudo-genes (FORESTA *et al.*, 2001). Este gene está expresso apenas nas células germinativas do tipo espermatogônia, espermátocitos e espermátides redonda (VOGT *et al.*, 1996).

O número exato de genes da família do gene *DAZ* (*Deleted in azoospermia*) ainda não foi elucidado. A família gênica está localizada na região AZFc e microdeleções nesta região estão correlacionadas com defeitos severos na espermatogênese (KÜHNERT *et al.*, 2004; VOGT, 2004; CHANG *et al.*, 1999). *DAZ* é encontrado apenas no cromossomo Y em humanos, macacos do velho mundo e chimpanzés. E todos os outros mamíferos, *DAZ* está localizada apenas em cromossomos autossômicos (YEN *et al.*, 1996). O homem possui uma cópia autossômica deste gene localizado em 3p24, chamado de *DAZLI* (*DAZ like*) (FORESTA *et al.*, 2001). Os genes de *DAZ* são expressos exclusivamente em tecido testicular e codificam proteínas que contêm o sítio RRM (*Recognition RNA Motif*), sugerindo que os produtos dos genes *DAZ* tenham algum papel no metabolismo de RNAs (BRITON-JONES & HAINES, 2000).

O homólogo autossomal *DAZLI* tem 83% de similaridade na região codificante do cDNA e também codifica proteínas ligantes a RNA. Acredita-se que o gene *DAZ* apareceu há 40 milhões de anos atrás durante a evolução dos primatas, proveniente de eventos randômicos de transposição e amplificação. TENG *et al.* (2002), relataram que o polimorfismo T54A no exon 3 é prevalente em pacientes com falha na espermatogênese, e esta região se localiza dentro do domínio RRM.

Apesar de uma porcentagem significativa de indivíduos inférteis com deleções no Y não terem filhos (sob mecanismos naturais de reprodução) alguns trabalhos especulam sobre a possibilidade da transmissão de uma predisposição à infertilidade de pai para filho devido, por exemplo, a eventos de deleção ocorrendo mais frequentemente associados a certos tipos de haplótipos específicos do cromossomo Y (FORESTA *et al.*, 2001). Assim como a predisposição de infertilidade ligada a microdeleções do cromossomo Y ser acentuada com a idade, ocasionando alterações progressivas na produção de espermatozoide, onde um homem jovem oligozoospermico leve se tornaria com a idade em um azoospermico (GATTA *et al.*, 2002; FORESTA *et al.*, 2001).

Segundo FERRÁS *et al.* (2004), as microdeleções no cromossomo Y resultam de processos de recombinação homóloga entre seqüências de DNA repetitivas que ocorrem anormalmente dentro do mesmo braço longo. As

alterações estruturais do Y decorrem da meiose paterna, mesmo sem história familiar prévia, e constituem mutações *de novo*, que podem ser transmitidas à prole masculina produzida a partir de ICSI (SOUZA *et al.*, 2000).

Uma hipótese que tenta explicar a origem das alterações moleculares da região AZF, levando em conta os processos envolvidos nos padrões de hereditariedade, associados à gametogênese, é a transmissão paterna do cromossomo Y para prole masculina (transmissão vertical). Portanto, em casos de TRA cujo pai é oligozoospermico severo ou azoospermico, a probabilidade destes passarem suas alterações genéticas aos filhos é alta. Uma vez que a mutação em AZF é a principal causa do problema de infertilidade o nascimento de prole masculina perpetua o problema nas gerações subseqüentes na família (KIHAILE *et al.*, 2005; ATHALYE *et al.*, 2004).

MALTER & COHEN (2001) ressaltam um ligeiro aumento nas anomalias congênitas, particularmente relacionadas às desordens genéticas dos cromossomos sexuais. Por outro lado, relatos na literatura revelam que a transmissão vertical de microdeleções do cromossomo Y através de ICSI mostra que várias características embrionárias não foram afetadas adversamente pela deleção (CHOI *et al.*, 2004; OATES *et al.*, 2002; MULHALL *et al.*, 1997). O interesse central era se a microdeleção através de ICSI poderia ser passada de pai para filho ou por natural concepção (LANDUYT *et al.*, 2000; PAGE *et al.*, 1999).

O objetivo deste estudo foi realizar o rastreamento de mutações em AZF do cromossomo Y na patrilinhagem dos indivíduos portadores de infertilidade masculina e que apresentaram deleções na região AZF do cromossomo Y.

MATERIAL E MÉTODOS

CASUÍSTICA

A partir dos resultados encontrados por ARRUDA *et al.* (2007), foram selecionados 13 pacientes portadores de infertilidade masculina que apresentaram deleções na região AZF. Dos quais, 8 (61,6%) apresentaram mutação apenas em AZFa, 3 (23%) mostraram alteração tanto para AZFa quanto para AZFb e 2 (15,4%) apenas em AZFb. Dos participantes foi obtido um espermograma, a fim de se saber o número de espermatozóides por ejaculado revelando uma proporção de 61,6% (08) indivíduos azoospermico e 38,4% (04) com oligozoospermia severa.

Vinte e seis parentes desses pacientes, todos do sexo masculino, sendo estes obrigatoriamente ligados por patrilineagem, foram analisados no Núcleo de Pesquisas Replicon da Universidade Católica de Goiás, para a triagem da possível transmissão vertical referente às alterações do cromossomo Y. Destes indivíduos foram coletadas amostras de sangue periférico logo após à submissão do Termo de Consentimento Livre Esclarecido, aprovado pelo CEP/UCG (Nº1640/2005).

EXTRAÇÃO DE DNA GENÔMICO

Para a extração de DNA genômico foi utilizado o Kit GFXTM (Amersham Pharmacia Biotech, EUA). As amostras foram homogeneizadas em agitador por 30 segundos e 300µL de sangue foram separados em novo microtubo. Posteriormente foi adicionado 900µL da solução de lise celular, para rompimento das estruturas membranosas da célula. A seguir, os tubos foram incubados à temperatura ambiente por 5 minutos e centrifugados à 14.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante, contendo as hemácias e restos celulares, foi desprezado e o precipitado, contendo os linfócitos, células nucleadas de onde foi extraído o DNA genômico foi armazenado. Ao precipitado foi adicionado 500µL da solução de extração, com propriedade detergente para promover a emulsificação dos componentes lipídicos e protéicos da célula. O sistema foi homogeneizado em agitador por 30 segundos e as amostras incubadas à temperatura ambiente por mais 5 minutos. O conteúdo do microtubo foi transferido para a coluna do GFX sobre o tubo coletor. O conjunto foi centrifugado à 8.000 rpm por 1 minuto e a solução do tubo coletor desprezada. Subsequentemente, adicionou-se 500µL de solução de extração na coluna GFX sobre o tubo coletor. A etapa de centrifugação foi repetida à 8.000 rpm por mais 1 minuto. Desprezou-se a solução do tubo coletor. À coluna do GFX foi adicionado 500µL da solução de lavagem, para precipitar o DNA na coluna do GFX. Centrifugou-se à 14.000 rpm por 3 minutos. A coluna foi transferida para um novo microtubo de 2mL devidamente identificado. Adicionou-se 100µL de Água Miliq, livre de íons e DNase, previamente aquecida à 70° C para a eluição do DNA do filtro da coluna para o microtubo. Logo após, incubou-se por 1 minuto à temperatura ambiente e centrifugou-se por mais 1 minuto à 8.000 rpm. A coluna do GFX foi descartada. Após o processo finalizado a solução de DNA isolado foi armazenada em

freezer a -20°C . Para o uso desse DNA, realizou-se corrida eletroforética em gel de agarose para se verificar a integridade do DNA.

REAÇÃO EM CADEIA DA POLIMERASE (PCR)

A Reação em Cadeia da Polimerase seguiu o protocolo proposto por ARRUDA et al. (2007) para análise da região AZF do cromossomo Y. Foram analisadas as três sub-regiões: AZFa, AZFb e AZFc, sendo utilizados primers STS (*Sequence Tagged Sites*) para estas devidas análises (Tabelas 1, 2 e 3) respectivamente. Como controle positivo foi utilizado DNA homens férteis com filhos concebidos naturalmente. Como marcador para o cromossomo Y foi utilizado o gene SRY (*Sex determining Region of the Y*) e o gene ZFX/Y para DNA genômico humano. Os conjuntos de primers STS para a identificação de microdeleções de AZF em humanos foram sugeridos pela Academia Européia de Andrologia e são capazes para detectar 90% das deleções nos loci de AZF.

Tabela 1. STS utilizados no estudo molecular das microdeleções da região AZF do Cromossomo Y.

STS	Locus	Região	Sequencia 5' para 3'	bp
sY84	DYS273	AZFa	F5' - AGAAGGGTCTGAAAGCAGGT	326
			R5' - GCCTACTACCTGGAGGCTTC	
sY86	DYS148	AZFb	F5' - GTGACACACAGACTATGCTTC	320
			R5' - ACACACAGAGGGACAACCCT	
sY127	DYS218	AZFc	F5' - GGCTCACAAACGAAAAGAAA	274
			R5' - CTGCAGGCAGTAATAAGGGA	
sY134	DYS224	AZFc	F5' - GTCTGCCTCACCATAAAACG	301
			R5' - ACCACTGCCAAAACCTTTCAA	
sY254	DAZ	AZFc	F5' - GGGTGTACCAGAAGGCAAA	400

			R5' - GAACCGTATCTACCAAAGCAGC	
sY255	DAZ		F5' - GTTACAGGATTTCGGCGTGAT	126
			R5' - CTCGTCATGTGCAGCCAC	
sY14	SRY	Yp11.3	F5' - GAATATTCCCCTCTCCGGA	472
			R5' - GCTGGTGCTCCATTCTTGAG	
ZFX/ZFY		Xq34	F5' - ACCRCTGTA CTGACTGTGATTACAC	
	ZFX/ZFY			495
		Yp22.3	R5' - GCACYTCTTTGGTATCYGAGAAAGT	

Tabela 2. Protocolo para amplificação dos STS em estudo (SRY-ZFX/Y; sY84/86; sY127/134; sY254/255).

Fonte: Simoni <i>et al.</i> , 2004.	REAGENTES	[] UTILIZADA	VOL. P/ 1 AMOSTRA
SRY - ZFX/Y			
Tampão		1X	5 µL
MgCl ₂ (50mM)		1,5 mM	3 µL
DNTPs		1,25 mM de cada	1 µL de cada = 4 µL
Taq polimerase 5 U/µL		2,5 U/µL	0,5 µL
Primer sense		20 pMol	1 µL
Primer antisense		20 pMol	1 µL
H ₂ O Mili Q		---	8,5 µL
DNA amostra		200 ng/µL	2 µL
Volume final			25 µL
AZF_a			
Tampão		1X	5 µL
MgCl ₂ (50mM)		1,5 mM	3 µL
DNTPs		1,25 mM de cada	1 µL de cada = 4 µL
Taq polimerase 5 U/µL		2,5 U/µL	0,5 µL
Primer sense		20 pMol	1 µL
Primer antisense		20 pMol	1 µL
H ₂ O Mili Q		---	8,5 µL
DNA amostra		200 ng/µL	2 µL
Volume final			25 µL
AZF_b			
Tampão		1X	5 µL
MgCl ₂ (50mM)		1,5 mM	6 µL
DNTPs		1,25 mM de cada	1 µL de cada = 4 µL
Taq polimerase 5 U/µL		2,5 U/µL	0,5 µL
Primer sense		20 pMol	1 µL
Primer antisense		20 pMol	1 µL
H ₂ O Mili Q		---	5,5 µL

DNA amostra	200 ng/ μ L	2 μ L
Volume final		25 μL
<i>AZFc</i>		
Tampão	1X	5 μ L
MgCl ₂ (50mM)	1,5 mM	1,5 μ L
dNTPs	1,25 mM de cada	1 μ L de cada = 4 μ L
Taq polimerase 5 U/ μ L	2,5 U/ μ L	0,5 μ L
Primer sense	20 pMol	1 μ L
Primer antisense	20 pMol	1 μ L
H ₂ O Mili Q	---	10 μ L
DNA amostra	200 ng/ μ L	2 μ L
Volume final		25 μL

As reações para cada sub-região e controles internos foram padronizadas para 25 μ L de volume final, contendo 1X PCR buffer, 1.5mM MgCl₂, 1.25mM dNTP e 0,5U Taq DNA polimerase *Platinum High Fidelity*® (Invitrogen, EUA) com 200ng de DNA genômico (Tabela 5)

Tabela 3. Parâmetros das termociclagens dos STS em estudos (SRY-ZFX/Y; sY84/86; sY127/134; sY254/255).

<i>TEMPERATURA</i>	<i>TEMPO</i>	<i>Nº. CICLOS</i>
<i>SRY – ZFX/Y</i>		
95°C	5 minutos	1
95°C	1 minuto	
55°C	30 segundos	35
72°C	1 minuto	
72°C	7 minutos	1
4°C	∞	---
<i>AZFa</i>		
94°C	5 minutos	1
94°C	1 minuto	
56°C	90 segundos	35
72°C	1 minuto	
72°C	7 minutos	1
4°C	∞	---
<i>AZFb</i>		
94°C	5 minutos	1
94°C	1 minuto	
56°C	30 segundos	35
72°C	1 minuto	
72°C	10 minutos	1
4°C	∞	---
<i>AZFc</i>		
94°C	5 minutos	1

94°C	1 minuto	
56°C	30 segundos	35
72°C	1 minuto	
72°C	7 minutos	1
4°C	∞	---

As condições para termociclagem foram específicas para cada sub-região, de acordo com a Tabela 3, utilizando-se um termociclador *GeneAmp PCR system 9700*® (Perkin-Elmer, EUA). Para a análise dos produtos obtidos pela PCR, o material amplificado foi submetido à eletroforese em gel de agarose a 1,5% em solução tampão Tris-borato de EDTA (TBE) a 1x. O gel foi submetido a um campo elétrico constante de 8 V/cm por um período de 3 horas. Os géis foram corados com brometo de etídio a 5µg/mL, por um período de 20 minutos. O registro visual do gel foi feito com o auxílio de um sistema de vídeo-documentação (*Image Master VDS*® - Amersham Pharmacia Biotech, EUA).

RESULTADOS

Na família 1, cujo probando foi gerado por concepção natural, observou-se, a partir do estudo anterior, a presença de uma microdeleção na região AZFa (sY84) e um espermograma azoospérmico. Neste estudo, verificou-se que, seu pai e um irmão, os quais apresentaram espermograma normal e oligozoospérmico severo, respectivamente, não apresentaram a microdeleção da região AZF. Porém, um outro irmão – 1Ib, com espermograma normal, apresentou além da deleção em AZFa (sY84), também em AZFb (sY127) [Tabela 4].

Na 2ª família, o pai, oligozoospérmico severo, apresentou uma microdeleção na região AZFa (sY84) (ARRUDA *et al.*, 2007) e seu filho, gerado através da ICSI, também apresentou a mesma microdeleção, observando assim a transmissão vertical dessa microdeleção neste processo de reprodução assistida [Tabela 4].

Já nas famílias 03 e 05, os probandos revelaram no estudo anterior a microdeleção da região AZFa (sY86 e sY84 respectivamente), sendo portanto, azoospérmico e oligozoospérmico severo. No entanto, neste estudo, não foram observadas microdeleções nas sub-regiões estudadas de AZF em seus pais [Tabela 4].

Nas famílias 04 e 06, os probandos são azoospérmicos, sendo que o primeiro apresenta microdeleções nas regiões AZFa e AZFb (sY84, sY86 e sY134), enquanto o segundo apresenta apenas a microdeleção em AZFa (sY84), conforme o estudo anterior. Nestas duas famílias foi realizado o rastreamento das microdeleções em AZF. Tanto o pai e um irmão do probando da família 04, quanto o pai, um irmão e dois sobrinhos do probando da família 06, não apresentaram as microdeleções na região AZF [Tabela 4].

Tabela 4. Dados clínicos dos probandos da 1ª a 6ª família e seus respectivos parentes com análise das regiões AZF. Marcadores STS: (-) deletado; (+) presente. Fonte: ARRUDA *et al.*, 2007.

Família	Indivíduo	Parentesco	AZFa	AZFb	AZFc
---------	-----------	------------	------	------	------

			sY84	sY86	sY127	sY134	sY254	sY255
	169	Probando*	-	+	+	+	+	+
F-01	1 P	Pai	+	+	+	+	+	+
Rep. Natural	1 Ia	Irmão	-	+	-	+	+	+
	1 Ib	Irmão	+	+	+	+	+	+
F-02	266	Probando	-	+	+	+	+	+
Rep. Assistida	2 F	Filho	-	+	+	+	+	+
F-03	240	Probando	+	-	+	+	+	+
	3 P	Pai	+	+	+	+	+	+
F-04	303	Probando	-	-	+	-	+	+
	4 P	Pai	+	+	+	+	+	+
	4 I	Irmão	+	+	+	+	+	+
F-05	251	Probando	-	+	+	+	+	+
	5 P	Pai	+	+	+	+	+	+
	222	Probando	-	+	+	+	+	+
	6 P	Pai	+	+	+	+	+	+
F-06	6 I	Irmão	+	+	+	+	+	+
	6 Sa	Sobrinho	+	+	+	+	+	+
	6 Sb	Sobrinho	+	+	+	+	+	+

Não foi possível coletar amostra biológica do pai dos probandos das famílias de 07 a 13, pois alguns já são falecidos e outros residem muito distante da cidade onde o probando é residente.

A partir do estudo passado, verificou-se que nas famílias 07 e 12 os probandos apresentaram microdeleções tanto na região AZFa (sY84, sY86; sY84), quanto em AZFb (sY127, sY134; sY127). Já nas famílias 10 e 11, os probandos apresentam alterações apenas em AZFa (sY86) e AZFb (sY134) respectivamente. O estudo também revelou que esses probando das duas primeiras famílias são azoospermicos, enquanto os dois últimos são oligozoospermicos severo. No irmão do probando da família 07 não foi encontrada nenhuma microdeleção para esta região, sendo o mesmo resultado observado nos dois irmãos do probando da família 10, no irmão do probando da família 11 e nos três irmãos do probando da família 12 [Tabela 5].

Nas famílias 08 e 09, ambos probandos são azoospermicos e apresentaram microdeleções na região AZFa (sY84 e sY86 respectivamente) (ARRUDA et al., 2007). Neste estudo foi realizado um rastreamento em parentes de 1º, 2º e 3º grau dos probandos, porém, não foi verificada nenhuma microdeleção nas regiões de estudo. O irmão e o sobrinho do probando da primeira família, não apresentaram microdeleções em AZF, assim como, no irmão e no tio do outro probando em estudo não foi encontrada nenhuma alteração genética nesta região [Tabela 5].

Por último, a partir dos dados analisados no estudo anterior, observa-se que na 13ª família o probando é oligozoospermico severo e apresenta microdeleção da região AZFb (sY134). Neste estudo, verificou-se que o sobrinho, parente de 3º do probando, não apresentou mutações em todas as sub-regiões – AZFa, AZFb e AZFc – analisadas [Tabela 5].

Tabela 5. Dados clínicos dos probandos da 7ª a 13ª família e seus respectivos parentes com análise das regiões AZF. Marcadores STS: (-) deletado; (+) presente. Fonte: ARRUDA *et al.*, 2007.

Família	Individuo	Parentesco	AZFa		AZFb		AZFc	
			sY84	sY86	sY127	sY134	sY254	sY255
F-07	295	Probando	-	-	-	-	+	+
	7 I	Irmão	+	+	+	+	+	+
F-08	296	Probando	-	+	+	+	+	+
	8 I	Irmão	+	+	+	+	+	+

	8 S	Sobrinho	+	+	+	+	+	+
	259	Probando	+	-	+	+	+	+
F-09	9 I	Irmão	+	+	+	+	+	+
	9 T	Tio	+	+	+	+	+	+
	286	Probando	+	-	+	+	+	+
F-10	10 Ia	Irmão	+	+	+	+	+	+
	10 Ib	Irmão	+	+	+	+	+	+
	208	Probando	+	+	+	-	+	+
F-11	11 I	Irmão	+	+	+	+	+	+
	34	Probando	-	+	-	+	+	+
	12 Ia	Irmão	+	+	+	+	+	+
F-12	12 Ib	Irmão	+	+	+	+	+	+
	12 Ic	Irmão	+	+	+	+	+	+
	197	Probando	+	+	+	-	+	+
F-13	13 S	Sobrinho	+	+	+	+	+	+

DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

O cromossomo Y proporciona uma oportunidade para estudar as mutações no genoma com importância médica. Esse cromossomo haplóide não se recombina durante a meiose, sendo uma herança patrilinear modificados apenas por mutações, facilitando assim, os estudos dos rearranjos genômicos, tais como as duplicações e deleções de regiões ou conversão gênica intacromossomal entre repetições parálogas (BOSCH *et al.*, 2003). Conversão gênica entre seqüências parálogas no cromossomo Y representa uma forma de recombinação exclusiva deste cromossomo (ROZEN *et al.*, 2003). O material genético deste cromossomo é jovem, provavelmente devido à tolerância para

ganho de material novo por inserções e perda de velhos por deleções, mantendo uma aparência “jovem” devido as suas rápidas mudanças. O estudo de STS presentes no cromossomo Y possibilita a detecção dos mecanismos moleculares que atuam sobre os *hotspots* desta região os quais são prováveis responsáveis pela ocorrência dos rearranjos (KAMP *et al.*, 2001).

A inserção de DNA exógeno no genoma do hospedeiro pode resultar em rejeição ou retenção da seqüência, rearranjos (duplicação ou deleção) ou silenciamento de genes do genoma hospedeiro por metilação de citosinas em regiões promotoras. Por outro lado, a hipometilação do DNA pode ser responsável pela transcrição do HERV (JANUCHOWSKI *et al.*, 2004).

Segundo LEE *et al.*, (2006), o tratamento com ICSI para homens inférteis pode levar à transmissão vertical de microdeleções da região AZF. Esta terapia também pode ocasionar em expansão e mutação “*de novo*”, como observado por CRAM *et al.*, (2000).

A partir dos resultados obtidos, observa-se que na 1ª família o pai e um irmão (IIb) do probando não apresentaram microdeleção da região estudada, mas poderiam no entanto, apresentar microdeleções de regiões anteriores ou posteriores àquela analisadas. Portanto, não se pode afirmar que esses dois indivíduos não são portadores de microdeleções, uma vez que nesta circunstância a metodologia utilizada pode não ser precisa o bastante, sugerindo-se assim, um sequenciamento de toda a região para um melhor aprofundamento e análise. Caso se confirme essa provável possibilidade, a região não seria essencial à fertilidade, visto ter o pai teve três filhos por concepção natural (SAMLI *et al.*, 2006; KÜHNERT *et al.*, 2004; GATTA, *et al.*, 2002; FORESTA *et al.*, 2001).

Nesse sentido, acredita-se que nos outros dois filhos, portadores da mutação em AZF, exista uma maior susceptibilidade com o aumento da região microdeletada. Assim, a possível microdeleção do pai, mesmo não detectada, se expandiu durante a gametogênese, originando filhos com diferentes perfis genotípicos (GATTA *et al.*, 2002). Provavelmente, essa hipótese explicaria o fato de um filho apresentar a deleção em AZFa e o outro tanto em AZFa quanto AZFb, pois no segundo haveria uma expansão maior do que no primeiro filho. Observa-se, ainda, que o filho que apresenta AZFa e AZFb deletados também apresenta um espermograma normal, o que explicaria o fato do prognóstico piorar com o aumento da idade.

Numa segunda hipótese, o fenômeno da mutação “*de novo*” poderia esclarecer essa situação, pois esses indivíduos poderiam, talvez em uma exposição à fontes mutagênicas ou mesmo por eventuais processos esporádicos,

gerar alterações em sua constituição genética, surgindo no entanto, micodeleções por todo o genoma e manifestando fenótipos ainda não registrados (AMOS *et. al.*, 2003; KÜHNERT *et. al.*, 2004). Possivelmente, esses fatores podem estar ligados a eventos epigenéticos, o que poderia ser esclarecido em um estudo mais específico a partir do mRNA e das proteínas formadas pelos genes desse *locus*.

O fenômeno da transmissão vertical foi observado na família 02, onde o pai, portador da deleção em AZFa, a transmitiu para seu filho através da ICSI, processo de reprodução assistida, conforme observado em CHANG *et. al.*, (2000) e LEE *et. al.*, (2006). Este resultado reforça a necessidade de uma investigação de microdeleção do cromossomo Y em indivíduos candidatos a reprodução assistida, assim como um acompanhamento e aconselhamento genético.

Nas famílias de 03 a 06 pode-se verificar que nas regiões estudadas não foi observada a transmissão vertical, mas uma provável mutação “*de novo*” dos probandos.

Nas famílias de 07 a 13, por sua vez, não foi possível coletar material biológico do pai dos respectivos probandos, pois alguns já são falecidos e outros residem muito longe da cidade do filho. Porém, nesses casos também não foi observada a transmissão vertical, e sim, uma provável deleção “*de novo*”, visto os outros indivíduos das famílias não apresentarem.

Os rearranjos genômicos (deleções e duplicações) são igualmente prováveis de ocorrer durante a meiose; e as duplicações em AZFa suportam também a idéia de que os homens que as carregam podem gerar crianças igualmente portadoras (STANKIEWICZ & LUPSKI, 2002).

A deleção completa da região AZFa causa a infertilidade masculina manifestada com a ausência de células germinativas (*Sertoli-cell only syndrome*). O fenótipo espermatogênese-específico da deleção em AZFa pode ser consequentemente baseado na dosagem da expressão dos genes USP9Y e DBY testículo-específicos (KUCHERIA *et al.*, 2003).

Um crescente número de desordens genéticas têm chamado a atenção por resultar de defeitos de recombinação entre seqüências repetitivas flanqueadas (STANKIEWICZ & LUPSKI, 2002). Microdeleções são o produto de recombinações recíprocas e as duplicações têm sido reportadas como relevantes por causar doenças genéticas (LU, *et. al.*, 1999; HUH *et. al.*, 2006). Trocas desiguais entre repetições em cromossomos homólogos (*Unequal Chromosome Exchange*) ou entre cromátides irmãs (*Unequal Sisters Chromatids Exchange*) são

mecanismos propostos como prováveis responsáveis pela ocorrência destes rearranjos (BLANCO *et. al.*, 2000). O papel patogênico de repetições dispersa é responsável por recombinações ilegítimas e tem sido obscurecido por regiões específicas de duplicações parálogas (EICHER, 2001).

Recombinações homólogas entre seqüências de alelos ou não-alelos parálogos não ocorrem uniformemente, mas se concentram nos *hotspots* com alta taxa de recombinação (LUPSKI, 2003). Isso ocorre durante a meiose por *crossing-over* entre alelos (recombinação homóloga alélica) e durante o reparo de quebras na dupla fita do DNA por recombinação entre seqüências parálogas (recombinação homóloga não-alélica também conhecida como recombinação ectópica). Os intermediários da recombinação não-alélica podem gerar vários produtos, incluindo deleções, duplicações, rearranjos por inversão, ou como no caso da recombinação alélica, por reposição de uma seqüência por uma homóloga (conversão gênica). Quando a recombinação não-alélica resulta em um produto duplicado, este é usualmente acompanhado de uma deleção recíproca em outro local. Cerca de 5 a 10% do genoma humano possui regiões de poucas cópias de repetições que induzem a recombinação não-alélica (EICHLER, 2001), sendo que arranjos entre estas podem resultar na classe de doenças conhecidas como desordens genéticas (LUPSKI, 2003).

O grande número de divisões celulares na espermatogênese e, portanto a alta taxa de replicação do DNA, aumenta as chances de mutações (JOBILING & TYLER-SMITH, 2003). Mutações nos marcadores microsatélites do cromossomo Y podem ser larga ou completamente intra-alélicas e isto confirma a idéia amplamente difundida de que a replicação *slippage* seja o mecanismo responsável pelas mutações que podem surgir de trocas desiguais entre cromátides irmãs ou por ser facilitada pela estrutura secundária das repetições (JOBILING & TYLER-SMITH, 2003).

Mutações são igualmente passíveis de ocorrer durante a meiose, a alta frequência relativa de duplicações em AZFa também suporta a idéia de que homens portadores possam ser pais (HORVATH, 2000). A fertilidade em portadores é completamente normal. Cerca de 5% do genoma humano consiste de seqüências duplicadas e o tamanho e o grau de identidade destas seqüências são únicas desse genoma (INTERNATIONAL, 2001). Análises destas regiões têm mostrado que elas são compostas por DNA contendo seqüências gênicas completas ou parciais de exons e introns. Essas, altamente ativas, têm sido demonstradas por ser local de nascimento para novos genes (KIRSCH *et al.*, 2004).

Segmentos duplicados do genoma humano são uma característica importante. Tais duplicações envolvem transferências de blocos com seqüências genômicas de 1 a 200 Kb para uma ou mais localizações no genoma. A localização de ambas as regiões doadoras e receptoras frequentemente não são arranjadas em tandem, sugerindo desiguais mecanismos de *crossing over* (PICKERAL *et al.*, 2000). Duplicações intercromossômicas são definidas como segmentos duplicados entre cromossomos não-homólogos (MI *et al.*, 2000). Observações indicam que muitas dessas duplicações intercromossômicas estão mapeadas próximo a regiões centroméricas e teloméricas de cromossomos humanos (MAZZARELLA & SCHLESSINGER, 1998). Também conhecidas como seqüências *low copy repeats*, que medeiam rearranjos estruturais recorrentes nos cromossomos associados com doenças genéticas, essas duplicação são flanqueados por uma repetição longa, direta e terminal que contém todos os elementos necessários para a regulação transcricional.

A relação das deleções do cromossomo Y e outras lesões genéticas à infertilidade masculina continuarão a ser uma área de interesse ativa dado o uso difundido da ICSI à resolução da infertilidade masculina. É importante que estas pesquisas sejam traduzidas rapidamente e apropriadamente na prática clínica, e que os casais em perspectiva sejam favorecidos com a informação essencial permitindo fazer esta decisão crucial da vida.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABDELMASSIH R (2001). Revista de Bioética e Ética Médica publicada pelo conselho Federal de Medicina 9(2).

ABDELMASSIH R, SALGUEIRO LL, SAYTO MY, PASSOS JP, DOTTAVIANO EJ, MARIANO RM *et al.* (1992) **Resultados laboratoriais da FIVETE: análise em 382 ciclos.** Reprodução 7(11):13-8.

AMOS CI, SHETE S, CHEN J and YU RK (2003) **Positional identification of microdeletions with genetic markers.** Hum Hered 56:107-118.

ANDERSSON AC, YUN Z, SPERBER GO, LARSSON E and BLOMBERG J (2005) **ERV3 and related sequences in humans: structure and RNA expression.** Journal of Virology 9270-9284.

ARNEDO N, NOGUÉS C, BOSCH M and TEMPLADO C (2005) **Mitotic and meiotic behaviour of a naturally transmitted ring Y chromosome: reproductive risk evaluation.** Human Reproduction 20(02):462-468.

ARRUDA JT, BORDIN BM, SANTOS PR, MESQUITA WEJC, COSTA E SILVA RCP, MAIA MCS *et al.* (2007) **Y chromosome microdeletions in Brazilian fertility clinic patients.** Genetics and Molecular Research 6(2):461-469.

ATHALYE SA, MADON PF, NAIK NJ, NAIK DJ, GAVAS SS, DHUMAL SB *et al.* (2004) **A study of Y chromosome microdeletions in infertile Indian males.** Int J Hum Genet 4(3):179-185.

BLANCO P, SHLUMUKOVA M, SARGENT MA, AFFARA N and HURLES ME (2000) **Divergent outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism.** J Med Genet 37:752-758.

BOSCH E and JOBLNG MA (2003) **Duplications of the AZFa region of the human Y chromosome are mediated by homologous recombination between HERVs and are compatible with male fertility.** Hum Mol Genet 12:341-347.

BRITON-JONES C and HAINES CJ (2000) **Microdeletions on the long arm of the Y chromosome and their association with male-factor infertility.** HKMJ 6:184-189.

CARRARA RCV, YAMASAKI R, MAZUCATTO LF, VELUDO MAL *et al.* (2004) **Somatic and germ cell cytogenetic studies and AZF microdeletion screening in infertile men.** Gent Mol Biol 27:477-482.

CHANG PT, SAUER MV and BROWN S (1999) **Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons.** Human Reproduction 14(11):2689-2694.

CHOI JM, CHUNG P, VEECK LA, MIELNIK LA, PALERMO GD and SCHLEGEL PN (2004) **AZF microdeletions of the Y chromosome and in vitro fertilization outcome.** Fertil Steril 81:337-341.

CRAM DS, MA K, BHASIN S, ARIAS J, PANDJAITAN M, CHU B *et al.* (2000) **Y chromosome analysis of infertile men and their sons conceived through intracytoplasmic sperm injection: vertical transmission of deletions and rarity of de novo deletions.** Fertil Steril 74(5):909-15.

DADA R, GUPTA NP and KUCHERIA K (2004) **Yq microdeletions – azoospermia factor candidate genes and spermatogenic arrest.** J Biomol Tech 15:176-183.

DOMENICE S, COSTA EMF, CORRÊA RV and MENDONÇA BB (2002) **Aspectos moleculares da determinação e diferenciação sexual.** Bras Endocrinal Metab 46(4).

EICHER ES (2001) **Segmental duplications: what's missing, misassigned, and misassembled – and should we care?** Genome Res 11:653-656.

ERDAL ME and BARLAS I (2000) **Detection of the SRY gene in 46XX phenotypic female by the PCR-SSCP method.** Turk J Med Sci 30:501-503.

FAGERLI J, SCHNECK FX, LEE PA, BELLINGER MF and WITCHEL SF (1999) **Absence of microdeletions in the Y chromosome in patients with a history of cryptorchidism and azoospermia or oligospermia.** Fertil Steril 71(4):697-700.

FERRÁ, C, FERNANDES S, MARQUES CJ, CARVALHO F, ALVES C, SILVA J *et al.* (2004) **AZF and DAZ gene copy specific deletion analysis in maturation arrest and Sertoli cell only syndrome.** Mol Hum Reprod 10:755-761.

FORESTA C, MORO E and FERLIN A (2001) **Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis.** Endocr Rev 22:226-239.

GATTA V, STUPPIA L, CALABRESE G, MORIZIO E, GUANCIALI-FRANCHI P and PALKA G (2002) **A new case of Yq microdeletion transmitted from a normal father to two infértil sons.** Journal of Medical Genetics 39:27-27.

GLINA DMR, ROCHA LE, BATISTA ML AND MENDONÇA MG (2001) **Saúde mental e trabalho: uma reflexão sobre o nexu com o trabalho e o diagnóstico, com base na prática.** Cad Saúde Pública Rio de Janeiro 17(3).

GRIFFITHS AJF, MILLER JH, SUZUKI DT, LEWONTIN RC AND GELBART WM (2002) **Introdução à genética.** Editora Guanabara Koogan S. A. 7ª Edição.

HAN JS, SZAK ST and BOEKE JD (2004) **Transcriptional disruption by the L1 retrotransposon and implications for mammalian transcriptomes.** Nature 429:268-274.

HORVATH JE, SCHWARTZ S and EICHLER EE (2000) **The mosaic structure of human pericentromeric DNA: A strategy for characterizing complex regions of the human genome.** Genome Res 10:839-852.

HUH JW, KIM DS, HA HS, KIM TH, KIM W and KIM HS (2006) **Formation of a new solo-LTR of the human endogenous retrovirus H family in human chromosome 21.** Mol Cells 22:360-363.

IHGSC - INTERNATIONAL HUMAN GENOME SEQUENCING CONSORTIUM. (2001) **Initial sequencing and analysis of the human genome.** Nature 409:860-921.

JANUCHOWSKI R, BREBOROWICZ AK, OFORI H, JEDRZEJCZAK P, PAWELCZYK L and JAGODZINSKI AP (2004) **Detection of a short CCR5 messenger RNA isoform in human spermatozoa.** Journal of Andrology 25(5):757-760.

JONES JR.HW, JONES GS, ANDREWS MC, ACOSTA AA, BUNDREN C, GARCIA JE *et al.* (1982) **The program of in vitro fertilization at Norfolk.** Fertil Steril 38:14-21.

JOBLING MA and TYLER-SMITH C (2003) **The human Y chromosome: an evolutionary marker comes of age.** Nature 4:598-612.

KAMP C, HIRSCHMANN P, VOSS H, HUELLEN K and VOGT PH (2000) **Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events.** Hum Mol Genet 9:2563-2572.

KAMP C, HUELLEN K, FERNANDES S, SOUSA M, SCHLEGEL PN, MIELNIK A *et al.* (2001) **High deletion frequency of the complete AZFa sequence occurs only in men with Sertoli-cell-only syndrome.** Mol Hum Reprod 7:987-994.

KIHAILE PE, YASUI A and SHUTO Y (2005) **Prospective assessment of Y-chromosome microdeletions and reproductive outcomes among infertile couples of Japanese and African origin.** Journal of Experimental & Clinical Assisted Reproduction 2:9.

KIRSCH S, WEI B, MINER TL, WATERSTON RH, CLARK RA, EICHLER EE *et al.* (2004) **Interchromosomal segmental duplications of the pericentromeric region on the human Y chromosome.** Genome Res 15:195-204.

KRAUSZ C, RAJPERT-DE-MEYTS E, FRYDELUND-LARSON L, QUINTANA-MURCI L, MCELREAVEY K and SAKAKKEBAEK NE (2001) **Double-blind Y chromosome microdeletion analysis in men with known sperm parameters and reproductive hormone profiles: microdeletions are specific for spermatogenetic failure.** J Clin Endocrinol Metab 86:2638-2642.

KRAUSZ C, DEGL'INNOCENTI S, NUTI F, MORELLI A, FELICI F, SANSONE M *et al.* (2006) **Natural transmission of USP9Y gene mutations: a new perspective on the role of AZFa genes in male fertility.** Human Molecular Genetics 15:2673-2681.

KUCHERIA K, JOBANPUTRA V, TALWAR R, AHUMAD ME, DADA R and SIVAKUMARAN TA (2003) **Human molecular cytogenetics: diagnosis, prognosis and disease management.** Teratog Carcinog Mutagen 1:225-33.

KÜHNERT B, GROMOLL J, KOSTOVA E, TSCHANter P, LUETJENS CM, SIMONI M *et al.* (2004) **Case Report: Natural transmission of an AZFc Y-chromosomal microdeletion from father to his sons.** Human Reproduction 19(4):886-888.

LANDUYT LV, LISSENS W, STOUFFS K, TOURNAYE H, LIEBAERS I and STEIRTEGHEM AV (2000) **Validation of a simple Yq deletion screening programme in an ICSI candidate population.** Molecular Human Reproduction 6(4):291-297.

LEE S, AHN S, LEE K, KWACK K, JUN H and CHA K (2006) **Intracytoplasmic sperm injection may lead to vertical transmission, expansion, and de novo occurrence of Y-chromosome microdeletions in male fetuses.** Fertility and Sterility 85(5):1512-1515.

LEWIS R (2004) **Genética Humana: conceitos e aplicações**. Quinta edição. Editora Guanabara Koogan S. A.

LU JEN-HER, CHUNG MING-YI, HWANG B and CHIEN HSIEH-PING (1999) **Prevalence and parental origin in tetralogy of fallot associated with chromosome 22q11 microdeletion**. *Pediatrics* 104:89-90.

LUPSKI JR (2003) **Genomic disorders recombinations-based disease resulting from genomic architecture**. *Am J Hum Genet* 72:246-252.

MAEGAWA GHB and CENTA LJR (2000) **Aspects of the masculine factor in the infertility**. *Fam Saúde Desenv Curitiba* 2(1):7-12.

MALTER H and COHEN J (2001) **Intracytoplasmic sperm injection: technical aspects. Gamete source, manipulation and disposition**. *Medical, Ethical and Social Aspects of Assisted Reproduction*. Switzerland September 17-21.

MAZZARELLA R and SCHLESSINGER D (1998) **Pathological consequences of sequence duplications in the human genome**. *Genome Res* 8:1007-1021.

MI S, LEE X, LI X, VELDMAN GM, FINNERTY H, RACIE L *et al.* (2000) **Syncytin is a captive retroviral envelope protein involved in human placental morphogenesis**. *Nature* 403:785-789.

MULHALL JP, REIJO R and ALAGAPPAN (1997) **Azoospermic men with deletion of the DAZ gene cluster are capable of completing spermatogenesis: fertilization, normal embryonic development and pregnancy occur**

when retrieved testicular spermatozoa are used for intracytoplasmic sperm injection. Hum Reprod 12:503-508.

MURCI LQ and FELLOUS M (2001) **The human Y chromosome: the biological role of a “functional wasteland”.** J Biomed Biotech 1(1):18-24.

NAKAHORI Y, KUROKI Y, KOMAKI R, KONDOH N, NAMIKI M, IWAMOTO T *et al.* (1996) **The chromosome region essential for spermatogenesis.** Hormone Research 46(1):20-3.

NIEDERBERGER CS and MEACHAM RB (2003) **Male Infertility.** Rev Urol 5(3):200-203.

OATES RD, SILBER S, BROWN L and PAGE DC (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.** Hum Reprod 17:2813-2824.

OLIVA R (2004) **Genes del cromosoma Y: significado clínico.** Disponível em: [www.sabadelluniversitat.org/cat/sbduniversitat\(cat\)/documents/roliva-58.pdf](http://www.sabadelluniversitat.org/cat/sbduniversitat(cat)/documents/roliva-58.pdf). Acessado em: fevereiro de 2004.

OLESEN C, HANSEN C, BENDSEN E, BYSKOV AG, SCHWINGER E, *et al.* (2001) **Identification of human candidate genes for male infertility by digital diferencial display.** Mol Human Reprod 7(1):11-20.

PAGE DC, SILBER S and BROWN LG (1999) **Men with infertility caused by AZFc deletion can produce sons by intracytoplasmic sperm injection, but are likely to transmit the deletion and infertility.** Human Reprod 14:1722-1726.

PARSEVAL N and HEIDMANN T (2005) **Human endogenous retroviruses: from infectious elements to human genes.** Cytogenetic and Genome Research 110:318-332.

PASQUALOTTO FF (2007) **Investigation and assisted reproduction in the treatment of male infertility.** Rev Bras Ginecol Obstet 29(2).

PICKERAL OK, MAKALOWSKI W, BOGUSKI MS, BOEKE JD (2000) **Frequent genomic DNA transduction driven by LINE-1 retrotransposition.** Genome Res 10:411-415.

PINA-NETO JM, CARRARA RC, BISINELLA R, MAZZUCATTO LF *et al.* (2006) **Somatic cytogenetic and azoospermia factor gene microdeletion studies in infertile men.** Braz J Med Biol Res 39(4).

RAICU F, POPA L, APOSTOL P, CIMPONERIU D, DAN L, ILINCA E *et al.* (2003) **Screening for microdeletions in human Y chromosome-AZF candidate genes and male infertility.** J Cell Mol Med 7(1):43-8.

ROZEN S, SKALETSKY H, MARSZALEK JD, MINX PJ, CORDUM HS, WATERSTON RH *et al.* (2003) **Abundant gene conversion between arms of palindromes in human and ape Y chromosomes.** Nature 423:873-876.

SAMLI H, MURAT SM and SOLAK M (2006) **Natural transmission of AZFb Y-Chromosomal microdeletion from father to his three sons.** Arch Androl 52(6):423-426.

SÃO PEDRO SL, FRAIETTA R, SPAINE D, PORTO CS *et al.* (2003) **Prevalence of Y chromosome deletions in a Brazilian population of non-obstructive azoospermic and severely oligozoospermic men.** Braz J Med Biol Res 36:787-793.

SEIFER I, AMAT S, DELGADO-VISCOGLIOSI P, BOUCHER D and BIGNON YJ (1999) **Screening for microdeletions on the long arm of chromosome Y in 53 infertile men.** Int J Androl 22(3):148-54.

SIMONI M, BAKKER E and EURLINGS MC (1999) **Laboratory guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions.** Int J Androl 22:292-299.

SIMONI M, BAKKER E and 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.

a) SOUSA M, FERNANDES S, BARROS A (2000) **Os genes e o homem infértil.** Andrologia Clínica. 1ª Edição. Porto: Sociedade Portuguesa de Andrologia 195-222.

b) SOUSA M, FERNANDES S and BARROS A (2000) **Prognostic factors for successful testicle spermatid retrieval.** Mol. Cell Endocrinol 166:37-43.

SKALETSKY H, KURODA-KAWAGUCHI T, MINX PJ, CORDUM HS, HILLIER L, BROWN LG *et al.* (2002) **The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes.** Nature 423:[825-837](#).

STANKIEWICZ P and LUPSKI JR (2002) **Genome architecture, rearrangements and genomic disorders.** Trends Genet 18:74-82.

STEPTOE PC and EDWARDS R (1976) **Reimplantation of a human embryo with a subsequent tubal pregnancy.** Lancet 1:880-882.

SUN C, SKALETSKY H, ROZEN S, GROMOLL J, NIESCHLAG E, OATES R *et al.* (2000) **Deletion of azoospermia factor a (AZFa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses.** Hum Mol Genet 9:2291-2296.

TAMANINI M (2004) **Novas tecnologias reprodutivas conceptivas: bioética, controvérsias.** Revista Estudos Feministas, Florianópolis 12(1):73-107.

TENGY, LINYM, LIN YH *et al.*(2002) **Association of a single-nucleotide polymorphism of the deleted in azoospermia-like gene with susceptibility to spermatogenic failure.** J Clin Endoc Metab 87(11):5258-5264.

TIEPOLO L and ZUFFARDI O (1976) **Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the Y chromosome long arm.** Hum Genet 34:119-224.

TSUJIMURA A, MATSUMIYA K, TAKAO T, KOGA M, TAKEYAMA M, FUJIOKA H *et al.*(2004) **Clinical analysis of patients with azoospermia factor deletions by microdissection testicular sperm extraction.** Int J Androl 27:76-81.

VOGT PH, 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.** Hum Mol Genet 5: 933-943.

VOGT PH (2004) **Molecular genetic of human male infertility: from genes to new therapeutic perspectives.** Current Pharmaceutical Design 10.

VOGT PH (2005) **AZF deletions and Y chromosomal haplogroups: history and update based on sequence.** Human Reproduction Update 11:319-336.

YEN PH, CHON NN and SALIDO EC (1996) **The Human Autosomal gene DAZLA test specificity and a candidate for male infertility human male.** Genet 12:2013-2017.