



ANÁLISE DAS MICRODELEÇÕES DO CROMOSSOMO Y EM HOMENS INFÉRTEIS COM AZOOSPERMIA OU OLIGOZOOSPERMIA SEVERA IDIOPÁTICA

Y chromosome microdeletions analysis in infertile men with idiopathic azoospermia or severe oligozoospermia

Giovanna Canezin Galletto^[a], Eduardo Galletto^[b], Fabio Rueda Fauz^[a]

^[a] Laboratório de Genética Molecular Humana, NIMA/CCBS, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: giogalletto@hotmail.com; fruedas@onda.com.br

^[b] PhD, Gênesis, Instituto de Reprodução Humana de Cascavel, Núcleo de Investigação Molecular Avançada (NIMA), PPGCS/CCBS, Pontifícia Universidade Católica do Paraná (PUCPR), Curitiba, PR - Brasil, e-mail: edugalletto@hotmail.com

Resumo

As microdeleções do cromossomo Y são a causa genética mais comum da infertilidade masculina e o fator etiológico de 10-15% nos casos de azoospermia ou oligozoospermia severa idiopática. Dezesete amostras de homens com azoospermia ou oligozoospermia severa com infertilidade idiopática foram coletadas e caracterizadas molecularmente com relação às microdeleções no locus AZFc em Yq. O DNA foi extraído a partir de sangue total, amplificado por meio da técnica de PCR utilizando-se marcadores (STS) e visualizado em géis de poliacrilamida. Três pacientes (17,65%) apresentaram microdeleções e eram todos azoospermicos. Com este estudo pode-se confirmar que a infertilidade masculina nos casos de azoospermia ou oligozoospermia severa com uma causa desconhecida está associada à microdeleção do cromossomo Y. Os estudos futuros devem focalizar em compreender a função biológica de genes de AZFc, que é uma etapa essencial para o desenvolvimento de terapias mais apropriadas e na expansão do conhecimento da infertilidade masculina.

Palavras-chave: Infertilidade. Cromossomo Y. Azoospermia. Oligozoospermia severa. Microdeleção.

Abstract

The microdeletions of Y chromosome are the more common genetic cause of the masculine infertility and the etiologic factor of 10-15% in the cases of idiopathic azoospermia or severe oligozoospermia.

Seventeen samples of men with azoospermia or severe oligozoospermia with idiopathic infertility had been collected and characterized molecularly with regard to the microdeletions in locus AZFc in Yq. The DNA was extracted from total blood, amplified by means of the technique of PCR using markers (STS) and visualized in polyacrylamide gels. Three patients (17,65%) had presented microdeletions and were all azoospermics. With this study can be confirmed that male infertility in azoospermia or severe oligozoospermia cases with an unknown cause is associated to the microdeletion of Y chromosome. The future studies must focus in understanding the biological function of genes of AZFc that is an essential stage for the development of more appropriate therapies and in the expansion of the knowledge of the masculine infertility.

Keywords: Infertility. Y chromosome. Azoospermia. Severe oligozoospermia. Microdeletion.

INTRODUÇÃO

A infertilidade conjugal acomete aproximadamente 20% dos casais que mantêm relações sexuais frequentes, sem métodos anticoncepcionais. Em aproximadamente 30% das vezes, encontram-se alterações da parceira (fator feminino), 30% do companheiro (fator masculino), 30% das vezes em ambos os parceiros e em 10% as alterações são idiopáticas.

Pode-se classificar a infertilidade masculina de duas maneiras: em uma delas, a anatômica, pode haver causas pré-testiculares (10,7% dos casos: alterações hormonais, genéticas, distúrbios metabólicos, doenças sistêmicas, etc.), testiculares (75% dos casos: alteração ou falência da espermatogênese) ou pós-testiculares (14,3% dos casos: obstrução congênita ou adquirida das vias eferentes seminiais); a outra classificação divide a infertilidade masculina de acordo com os principais achados: varicocele (20%), infecção (15%), criptorquidía (10%), distúrbio hormonal (8%), hereditário/genético (5%), imunológico (5%), idiopático (20%) e outros (17%) (1).

Os fatores genéticos podem interferir nos processos reprodutivos, afetando o número ou a qualidade (ou ambos) da produção de espermatozoides, e podem também exercer efeitos sobre a estrutura ou a função do trato reprodutivo masculino. Os três fatores genéticos mais frequentemente relacionados à infertilidade masculina são as alterações cromossômicas, mutações gênicas e microdeleções do cromossomo Y. As microdeleções do cromossomo Y são a causa genética mais comum da infertilidade masculina ocasionada pela falha espermatogênica e têm sido relatadas em 2-25% de homens inférteis (2-4). Estudos moleculares sugerem que as

microdeleções em Yq11 sejam o fator etiológico de 10-15% nos casos de azoospermia (ausência de espermatozoides) ou oligozoospermia severa (< 5 milhões de espermatozoides/ml) idiopática (5-6). As grandes microdeleções que incluem as extremidades heterocromáticas em Yq (deleções “terminais”) foram sugeridas como sendo a causa de instabilidade cromossômica apresentando maior predisposição a rearranjos ou até mesmo para perda de partes do cromossomo Y (7-8).

O cromossomo Y é relativamente pequeno (aproximadamente 60 Mb) em relação aos demais e representa 2-3% do genoma haploide. Segundo Quintana-Murci e Fellous (9), observações citogenéticas permitiram a identificação de diferentes regiões: a porção pseudoautosomal e as regiões eucromáticas e heterocromáticas. As regiões pseudoautosomais (PAR) são duas: a PAR1 está localizada na região terminal do braço curto do Y (Yp), e a PAR2 no topo do braço longo do cromossomo Y (Yq). PAR1 e PAR2 cobrem aproximadamente 2.600 e 320 kb de DNA, respectivamente.

As regiões pseudoautosomais, em particular PAR1, são onde o cromossomo Y troca o seu material genético com o cromossomo X durante a meiose masculina (região homóloga). Enquanto PAR1 e PAR2 representam 5% de todo o cromossomo, a maioria do comprimento do cromossomo Y (95%) é composta pela região chamada “Não Recombinante do Y” (NRY), que inclui as regiões heterocromáticas e eucromáticas e sustenta a maioria das regiões específicas codificadoras do cromossomo Y, incluindo o gene determinante da masculinidade SRY e muitos outros genes envolvidos na espermatogênese. Segundo Ali e Hasnain (9), o cromossomo Y contém cerca de 60 milhões de nucleotídeos.

Carvalho et al. (10) observaram o envolvimento das deleções de Yq em homens inférteis pela primeira vez quando analisaram células de homens com infertilidade idiopática. Como as informações do DNA específico do cromossomo Y eram raras em Yq11, esta região foi originalmente subdividida em dois intervalos: 5 e 6 (11). O mapa mais detalhado (14 intervalos) em Yq11 foi, então, estabelecido por Ma et al. (12), com 30 investigações específicas do DNA do cromossomo Y. Este mapa foi suficiente para indicar pela primeira vez que pelo menos duas regiões AZF existem em Yq11 (Figura 1) (13).

Graças ao desenvolvimento da tecnologia da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), foi possível aumentar exponencialmente o número de fragmentos específicos de DNA genômico do cromossomo Y, detectar a presença e mapear a extensão das microdeleções utilizando-se marcadores monomórficos moleculares específicos chamados STSs (*sequence tagged sites*) (14). Os STS são sequências de 100 a 500 pares de bases que podem ser facilmente amplificadas por PCR, que marcam uma determinada posição no cromossomo.

O mapeamento da deleção dirigiu à descoberta de genes relacionados à espermatogênese e definiu três regiões como fatores de azoospermia (AZFa, AZFb e AZFc) mapeados no Yq11.23 (14-15). O primeiro desses fatores de azoospermia, AZFa, está localizado na porção proximal do braço longo do cromossomo, dentro do intervalo 5 da deleção. AZFb se estende desde a porção distal do intervalo 5 e a porção proximal do intervalo 6 da deleção. A estimativa do tamanho dessas regiões varia entre 1 e 3 Mb, com uma definitiva avaliação não devida aos blocos de várias sequências repetitivas que, consistentemente, conduzem a uma estimativa (16). AZFc está localizada na proximidade da região da heterocromatina do cromossomo Y, entre os subintervalos 6C e 6E, e possui, aproximadamente, um tamanho de 1,4 Mb, embora uma concisa caracterização dessa região seja outra vez escondida pelas repetições de sequências. Uma quarta subregião AZF, posicionada entre AZFb e AZFc, foi também recentemente proposta e nomeada AZFd (2). Essas regiões contêm uma grande densidade de genes responsáveis pela falha espermatogênica (17). As deleções AZF são devidas a diferentes recombinações entre grandes sequências palindrômicas durante a meiose (18).

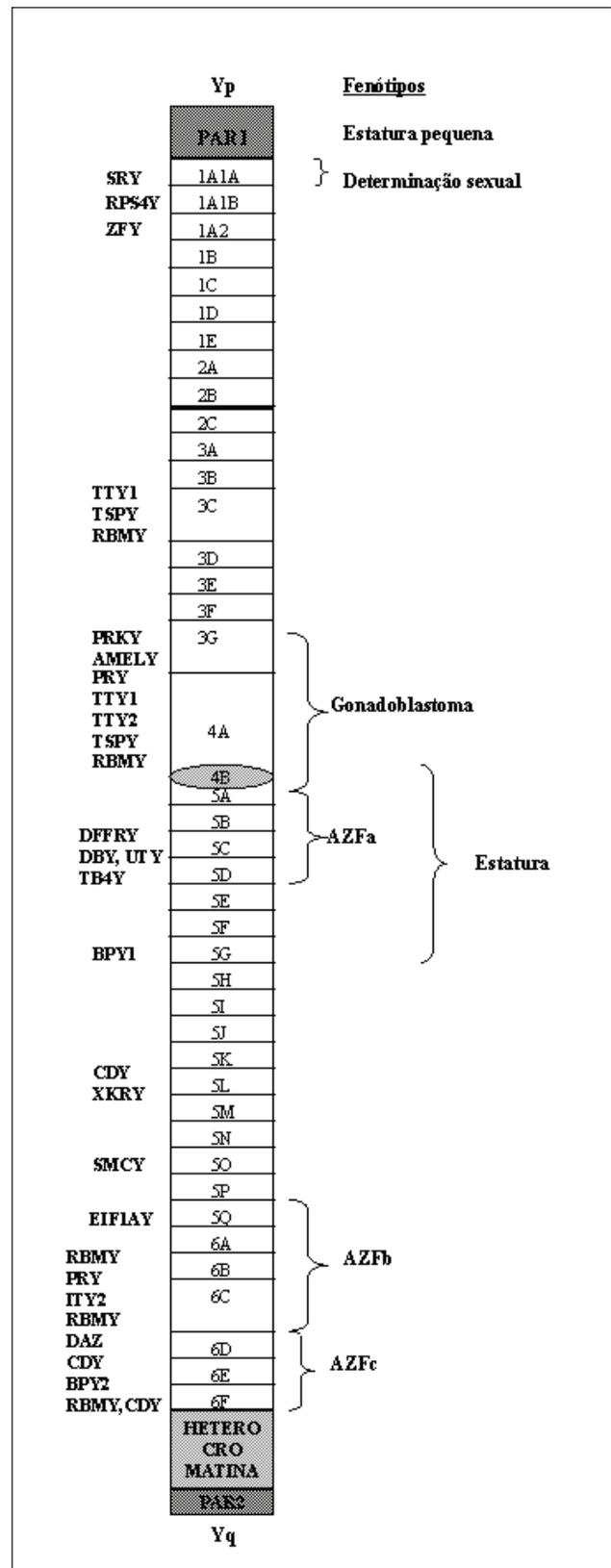


FIGURA 1 - Genes e fenótipos mapeados do cromossomo Y

Fonte: Adaptado de Yen (1999) (15).

AZFc representa a região deletada mais frequente entre os homens inférteis (6, 19). O principal gene candidato em AZFc é o grupo DAZ (deletado em azoospermia), um grupo de genes transcritos em testículos de adultos e expressos exclusivamente em células germinativas, aparentemente codificando uma proteína ligante de RNA (20).

A deleção completa da região AZFc é o tipo mais comum e é frequentemente associada com o dano espermatogênico (de oligozoospermia severa à azoospermia com poucas espermátides maduras ou células de Sertoli no tecido testicular) (19, 21). A possibilidade de transmissão da deleção AZFc do pai para o filho foi demonstrada (22-23).

Este projeto visa a coletar amostras de homens no Estado do Paraná com azoospermia ou oligozoospermia severa com infertilidade de etiologia desconhecida e caracterizá-los molecularmente com relação às microdeleções no locus AZFc do cromossomo Y, com o intuito de identificar as relações existentes entre a infertilidade idiopática e essas microdeleções.

MATERIAIS E MÉTODOS

Dezessete amostras de sangue de indivíduos com infertilidade idiopática foram obtidas para o desenvolvimento deste trabalho. Os pacientes foram contatados via seus médicos, e todos apresentavam azoospermia ou oligozoospermia severa com causa desconhecida. Todos foram avaliados por urologistas e/ou especialistas em reprodução humana, tendo sido submetidos a exames físicos e análise do sêmen. Todos os participantes leram e assinaram o Termo de Consentimento Informado (TCI).

A extração de DNA das amostras foi realizada a partir de sangue total baseando-se nas seguintes etapas: lise das hemácias, lise dos núcleos dos linfócitos, retirada das proteínas por meio de precipitação, precipitação do DNA, lavagem do DNA e diluição do DNA em tampão.

O sangue coletado com EDTA, 5-10 mL, foi transferido para um tubo falcon de 15 mL, completando-se o volume com solução TKM1 (solução TRIS-EDTA) e 125 µL de Nonidet P-40 (Sigma). Inverteu-se o tubo várias vezes para homogeneizar e centrifugou-se por 10 minutos a 4.000 rpm. O sobrenadante foi desprezado e repetiu-se a operação mais duas vezes para lavar o sedimento. Após a última lavagem, o sedimento foi

ressuspendido em 800 µL de solução TKM2 (solução TRIS-EDTA-NaCl). Transferiu-se a suspensão para um microtubo cônico, tipo eppendorf, e adicionou-se 50 µL de Dodecil Sulfato de Sódio (SDS) 10%. Incubou-se a 55 °C por 30 minutos. Retirou-se do Banho-Maria e centrifugou-se por 10 minutos a 12.000 rpm. Transferiu-se o sobrenadante para um tubo de ensaio e adicionaram-se dois volumes de Etanol 100% a -20 °C. Tampou-se o tubo, que foi invertido várias vezes para formação do agregado de DNA. O DNA extraído foi transferido para um microtubo cônico e lavou-se com Etanol 70% a 4 °C. Retirou-se o Etanol, deixando secar em temperatura ambiente. Adicionou-se o tampão TE (TRIS-HCl-EDTA pH 8,0) e manteve-se a temperatura ambiente por dois dias antes de realizar a reação de amplificação do material.

ODNA extraído foi submetido ao processo de amplificação por meio da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR). Esta técnica multiplica milhões de vezes um fragmento gênico específico de DNA diluído juntamente com água (sem nuclease), PCR Master Mix, proveniente da empresa Promega, que é composto por: *Taq* DNA Polimerase (50 unid/ml), dNTP (com 400 µM cada dATP, dGTP, dCTP e dTTP) e MgCl₂ (3 mM), e com um multiplex de primers.

Os STS escolhidos para a análise dos candidatos às microdeleções do cromossomo Y estão localizados no grupo de genes DAZ em AZFc (sY254, sY258=sY255, 50f2/C). O locus Amel (amelogenina) foi usado como controle nas reações de multiplex, amplificado com cada par de marcadores. DNA feminino foi usado como controle negativo (Tabela 1).

As reações foram realizadas em um termociclador, responsável por variar as temperaturas nos seguintes passos: 1) 96 °C por 3 minutos para que haja uma pré-desnaturação; 2) 94 °C por 30 segundos para desnaturar a cadeia dupla de DNA; 3) 55 °C por 30 segundos para promover o anelamento dos primers; e 4) 72 °C por 30 segundos para síntese de uma nova cadeia de DNA, fechando assim um ciclo. Esse ciclo (passos 2 a 4) foi repetido 40 vezes em cada reação de amplificação.

As microdeleções foram detectadas pela ausência ou presença da banda resultante de amplificação, visualizadas em géis de poliacrilamida a 10% com glicerol (utiliza-se água destilada, TBE, acrilamida, APS e TEMED) por eletroforese durante 3 horas a 20 mA e corados com nitrato de prata. Para cada amostra do paciente foi adicionado corante

TABELA 1 - Marcadores utilizados para a análise das microdeleções do cromossomo Y, bem como as suas localizações, sequência de primers e tamanho dos produtos de amplificação

MARCADOR	LOCALIZAÇÃO NO Y	INICIADORES DIRETO E REVERSO (5'è 3')	TAMANHO DA BANDA
AMEL	Yp / Amelogenina	Forward – 5' CCCTGGGCTCTGTAAAGAATAGTG 3' Reverse – 5' ATCAGAGCTTAAACTGGGAAGCTG 3'	106-112pb
sY254	AZFc / DAZ	Forward – 5' GGGTGTACCAGAAGGCCAAA 3' Reverse – 5' GAACCGTATCTACCAAAGCA 3'	382pb
sY258 (=sY255)	AZFc / DAZ	Forward – 5' GTTACAGGATTCGGCGTGAT 3' Reverse – 5' CTCGTATGTGCAGCCAC 3'	125pb
MSY1/50f2/C	MSY1/Yp AZFc / DAZ	Forward – 5' ACAGAGGTAGATGCTGAAGCGGTATAGC 3' Reverse – 5' GCAACTCAAGCTAGGACAAAGGAAAGG 3'	203pb

Fonte: Elaboração dos autores.

padrão, à base de azul de bromo-fenol, xileno cianol e glicose.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A PCR é uma técnica bastante sensível para detectar as microdeleções em Yq. O conjunto de marcadores foi proveitosamente utilizado por diferentes laboratórios na detecção da deleção da região AZFc, que incluem esses primers STS como primeira opção.

Um total de 17 amostras foram coletadas e extraídas de homens inférteis; dentre esses, 6 eram azoospermicos e 11 tinham oligozoospermia severa. Três pacientes de um total de 17 apresentaram microdeleções na região AZFc do cromossomo Y, baseados na análise por PCR, correspondendo a uma proporção de 17,65%, 100% atribuídos aos indivíduos com azoospermia e nenhum com oligozoospermia severa, podendo esse resultado ser justificado pelo fato da frequência da deleção em Yq aumentar com a severidade do dano espermato gênico (24).

Os três pacientes apresentaram deleção dos marcadores sY254, sY258 (= sY255) e 50f2/C (Figura 2). Esta última foi relatada como uma deleção polimórfica (25) que não está diretamente associada com a infertilidade. Assim, foi considerada sua presença nos pacientes inférteis uma coincidência de não significância clínica.

Song et al. (6) detectaram, em seus pacientes, as microdeleções do cromossomo Y em 14,5% de azoospermicos e 4,8% dos que tinham oligozoos-

permia. A região deletada mais frequente foi a AZFc, incluindo o gene candidato para azoospermia DAZ. Já no estudo feito por Raicu et. al (3), 33,34% das deleções encontradas foram atribuídas a indivíduos com azoospermia, sendo que a maior frequência de deleções (66,66%) corresponde aos pacientes com oligozoospermia severa. Esta variação de frequência encontrada no presente estudo e na literatura pode ser justificada pelo critério de inclusão desses pacientes, podendo ter um papel importante na frequência variada de deleção, sendo que Raicu et al. (3) selecio-

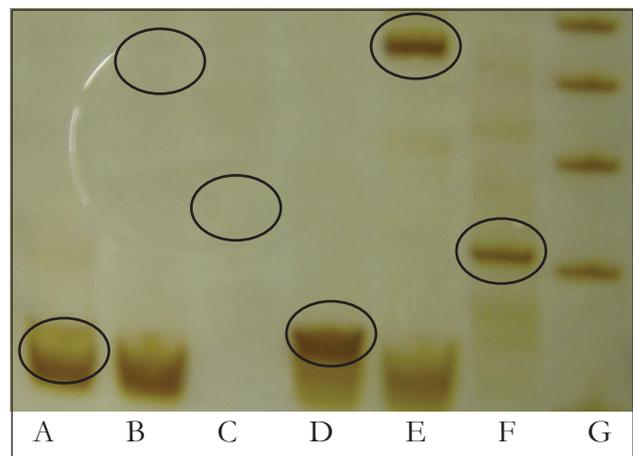


FIGURA 2 - Gel de eletroforese mostrando as três microdeleções encontradas nas três regiões em comparação com indivíduos normais

Legenda: Pacientes: A (sY258), B (sY254) e C (50f2/C); Indivíduos normais: D (sY258), E (sY254) e F (50f2/C); G: marcador de peso molecular

Fonte: Elaboração do autor.

naram 28 indivíduos com infertilidade idiopática e dois casos com varicocele e que apresentavam um número de até 10 milhões de espermatozoides/ml no ejaculado; e no presente estudo e de Song et al. (6) foram selecionados apenas indivíduos com infertilidade idiopática e que apresentavam número igual ou menor que 5 milhões de espermatozoides/ml no ejaculado, ou ausência destes.

De acordo com a literatura, a prevalência de microdeleções do cromossomo Y no locus AZFc em homens inférteis abrange 2% (4), 5,3% (5), 10% (3), até 25% (6). A ampla escala de deleções encontradas em diferentes publicações foi justificada na composição étnica das populações estudadas em vários trabalhos (4, 26-27).

Em um estudo, 38 anormalidades genéticas foram identificadas em 36 homens de uma população total de 150 homens com infertilidade masculina severa (5), mostrando a necessidade de se oferecer testes genéticos e aconselhamentos a homens com oligozoospermia severa e azoospermia, antes de serem aplicadas técnicas de Reprodução Assistida.

Com este estudo pode-se confirmar que a infertilidade masculina nos casos de azoospermia ou oligozoospermia severa com uma causa desconhecida está associada a um fator de risco genético: a microdeleção do cromossomo Y. Entretanto, os outros pacientes que não apresentaram essas deleções provavelmente estão associados a outros fatores locais, genéticos, epigenéticos, nutricionais, entre outros, que devem ser investigados na etiologia da oligozoospermia severa e azoospermia idiopáticas.

As técnicas de Reprodução Assistida representam uma terapia sintomática eficiente para os homens que carregam microdeleções do Y e têm estimulado muitos investigadores a explorar ainda mais as bases genéticas da infertilidade masculina. Entretanto, este defeito genético é transmitido à prole masculina, afetando sua fertilidade. A classificação para deleções de Yq transformou-se em um teste de diagnóstico rotineiro em alguns locais, que fornece uma etiologia para distúrbios espermatozoides e avalia o prognóstico para a recuperação de espermatozoides testiculares de acordo com o tipo de deleção.

Os estudos futuros devem focalizar em compreender a função biológica de genes de AZFc, que é uma etapa essencial para o desenvolvimento de terapias mais apropriadas e na expansão do conhecimento da infertilidade masculina.

AGRADECIMENTOS

Aos pacientes que voluntariamente aceitaram participar do presente estudo, aos médicos urologistas (Dr. Alessandro Afornali, Dr. Gilberto Dobler, Dr. Clécio Fidalski e Dr. Carlos Barreira) e especialistas em Reprodução Humana que auxiliaram na seleção e identificação dos pacientes.

REFERÊNCIAS

1. Cavalcante MB, Rocha MP, Dias ML, Dias OJ, Souza DO, Roberto IG. Interference of age on semen quality. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2008;30(11):561-5.
2. Kent-First M, Muallem A, Shultz J, Pryor J, Roberts K, Nolten W, et al. Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev.* 1999;53(1):27-41.
3. Raicu F, Popa L, Apostol P, Cimponeriu D, Dan L, Ilinca E, et al. Screening for microdeletions in human Y chromosome--AZF candidate genes and male infertility. *J Cell Mol Med.* 2003;7(1):43-8.
4. Hellani A, Al-Hassan S, Iqbal MA, Coskun S. Y chromosome microdeletions in infertile men with idiopathic oligo- or azoospermia. *J Exp Clin Assist Reprod.* 2006;3:1.
5. Dohle GR, Halley DJ, Van Hemel JO, van den Ouwel AM, Pieters MH, Weber RF, et al. Genetic risk factors in infertile men with severe oligozoospermia and azoospermia. *Hum Reprod.* 2002;17(1):13-6.
6. Song S, Xu H, Fan C. Potential diagnostic applications of biosensors: current and future directions. *Int J Nanomedicine.* 2006;1(4):433-40.
7. Krausz C, Quintana-Murci L, Barbaux S, Siffroi JP, Rouba H, Delafontaine D, et al. A high frequency of Y chromosome deletions in males with nonidiopathic infertility. *J Clin Endocrinol Metab.* 1999;84(10):3606-12.
8. Kirsch S, Weiss B, de Rosa M, Ogata T, Lombardi G, Rappold GA. FISH deletion mapping defines a single location for the Y chromosome stature gene, GCY. *J Med Genet.* 2000;37(8):593-9.

9. Quintana-Murci L, Fellous M. The Human Y Chromosome: The Biological Role of a "Functional Wasteland". *J Biomed Biotechnol.* 2001;1(1):18-24.
10. Carvalho CM, Fujisawa M, Shirakawa T, Gotoh A, Kamidono S, Freitas Paulo T, et al. Lack of association between Y chromosome haplogroups and male infertility in Japanese men. *Am J Med Genet A.* 2003;116A(2):152-8.
11. Vergnaud G, Page DC, Simmler MC, Brown L, Rouyer F, Noel B, et al. A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am J Hum Genet.* 1986;38(2):109-24.
12. Ma K, Sharkey A, Kirsch S, Vogt P, Keil R, Hargrave TB, et al. Towards the molecular localisation of the AZF locus: mapping of microdeletions in azoospermic men within 14 subintervals of interval 6 of the human Y chromosome. *Hum Mol Genet.* 1992;1(1):29-33.
13. Vogt PH, Falcao CL, Hanstein R, Zimmer J. The AZF proteins. *Int J Androl.* 2008;31(4):383-94.
14. Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown LG, Beer-Romero P, Bogan JS, et al. The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science.* 1992;258(5079):52-9.
15. Yen PH. A long-range restriction map of deletion interval 6 of the human Y chromosome: a region frequently deleted in azoospermic males. *Genomics.* 1998;15;54(1):5-12.
16. Huynh T, Mollard R, Trounson A. Selected genetic factors associated with male infertility. *Hum Reprod Update.* 2002;8(2):183-98.
17. Sadeghi-Nejad H, Farrokhi F. Genetics of azoospermia: current knowledge, clinical implications, and future directions. Part II: Y chromosome microdeletions. *Urol J.* 2007;4(4):192-206.
18. Wang WP, Cui YX. Clinical significance and relevant laboratory techniques of detecting azoospermia factors of the Y chromosome. *Zhonghua Nan Ke Xue.* 2007;13(12):1117-20.
19. Ravel C, Chantot-Bastaraud S, McElreavey K, Siffroi JP. Molecular anomalies of the Y chromosome: Consequences on male fertility. *Gynecol Obstet Fertil.* 2006;34(10):885-93.
20. Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet.* 1995;10(4):383-93.
21. Kleiman SE, Yogev L, Gamzu R, Hauser R, Botchan A, Lessing JB, et al. Genetic evaluation of infertile men. *Hum Reprod.* 1999;14(1):33-8.
22. Chang PL, Sauer MV, Brown S. Y chromosome microdeletion in a father and his four infertile sons. *Hum Reprod.* 1999;14(11):2689-94.
23. Patsalis PC, Sismani C, Quintana-Murci L, Taleb-Bekkouche F, Krausz C, McElreavey K. Effects of transmission of Y chromosome AZFc deletions. *Lancet.* 2002;360(9341):1222-4.
24. Lee SH, Ahn SY, Lee KW, Kwack K, Jun HS, Cha KY. Intracytoplasmic sperm injection may lead to vertical transmission, expansion, and de novo occurrence of Y-chromosome microdeletions in male fetuses. *Fertil Steril.* 2006;85(5):1512-5.
25. Jobling MA, Samara V, Pandya A, Fretwell N, Bernasconi B, Mitchell RJ, et al. Recurrent duplication and deletion polymorphisms on the long arm of the Y chromosome in normal males. *Hum Mol Genet.* 1996;5(11):1767-75.
26. Krausz C, Rajpert-De Meyts E, Frydelund-Larsen L, Quintana-Murci L, McElreavey K, Skakkebaek NE. Double-blind Y chromosome microdeletion analysis in men with known sperm parameters and reproductive hormone profiles: microdeletions are specific for spermatogenic failure. *J Clin Endocrinol Metab.* 2001;86(6):2638-42.
27. Plaseski T, Novevski P, Kocevaska B, Dimitrovski C, Efremov GD, Plaseska-Karanfilska D. AZF deletions in infertile men from the Republic of Macedonia. *Prilozi.* 2006;27(1):5-16.

Recebido: 10/08/2008
Received: 08/10/2008

Aprovado: 14/10/2008
Approved: 10/14/2008