



UNIVERSIDADE D
COIMBRA

Margarida da Silva Nascimento Teodoro
Serrano

O ESTUDO CITOGENÉTICO E A PESQUISA DE
MICRODELEÇÕES DO CROMOSSOMA Y NA
INVESTIGAÇÃO ETIOLÓGICA DA
INFERTILIDADE PRIMÁRIA MASCULINA

Dissertação no âmbito do Mestrado em Genética Clínica Laboratorial
orientada pela Professora Doutora Eunice Maria Ruas de Campos
Matoso e pela Professora Doutora Isabel Maria Marques Carreira e
apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra

Setembro de 2023

Margarida da Silva Nascimento Teodoro Serrano

O estudo Citogenético e a Pesquisa de Microdeleções do Cromossoma Y na Investigação Etiológica da Infertilidade Primária Masculina

Dissertação no âmbito do Mestrado em Genética Clínica Laboratorial orientada pela Professora Doutora Eunice Maria Ruas de Campos Matoso e pela Professora Doutora Isabel Maria Marques Carreira e apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de Coimbra



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DE
COIMBRA

2023

Agradecimentos

À minha orientadora Professora Doutora Eunice Matoso pela orientação e conhecimento transmitido, pelas oportunidades de aprendizagem que me proporcionou e, em especial, por me introduzir no mundo da Citogenética que tanta paixão me despertou. Agradeço a confiança que depositou em mim e toda a atenção e incentivo no decorrer deste projeto.

À Professora Doutora Isabel Carreira, co-orientadora deste trabalho, pelo conhecimento e experiência partilhados.

À Dra. Alexandra Estevinho que apoiou todo o trabalho laboratorial realizado, agradeço-lhe a atenção, a amabilidade e a disponibilidade. Um especial agradecimento por todo o tempo dispensado no apoio da minha aprendizagem.

A todo o Serviço de Hematologia Clínica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra e a cada uma das pessoas que sempre tiveram a maior disponibilidade para me receber e vontade de ver este projeto concretizado. Ao Serviço de Urologia e Transplantação Renal e Serviço de Genética Médica, particularmente pela colaboração do Dr. Luís Sousa e Dra. Fabiana Ramos sem a qual este trabalho não teria sido possível.

À Dra. Marta Pinto pela disponibilidade no decorrer de todo o Mestrado.

Ao Dr. Miguel Pires pelo conhecimento que com tanta amabilidade me transmitiu e o apoio indispensável na implementação da metodologia de MLPA.

Aos Professores que fizeram parte de todo o meu percurso académico e assim moldaram a pessoa, aluna e profissional que sou hoje.

A todos os meus colegas de Mestrado que me acompanharam neste percurso, em especial à Rita e à Paula pelo apoio, companheirismo e momentos partilhados. Foi um privilégio ter-vos ao meu lado estes dois anos.

À Inês e à Beatriz por todo o incentivo, alegria e amizade com que me acompanham.

O meu profundo agradecimento ao Rafael pelo carinho, apoio constante e a incondicional dedicação em que sempre me apoio.

À minha família, em especial aos meus pais, que me proporcionaram todas as oportunidades para preparar o meu futuro. O maior agradecimento pelo amor, apoio e preocupação com que sempre me acompanham.

“Para ser grande, sê inteiro: nada
Teu exagera ou exclui.
Sê todo em cada coisa. Põe quanto és
No mínimo que fazes.
Assim em cada lago a lua toda
Brilha, porque alta vive.”

- Ricardo Reis

Resumo

A infertilidade masculina é uma patologia de causa multifatorial associada a fatores genéticos e ambientais. Por conseguinte, a sua apresentação fenotípica é altamente heterogênea, incluindo habitualmente disfunção testicular e perturbação da espermatogénese. Quanto mais severo o fenótipo, mais preponderantes são os fatores genéticos na etiologia da patologia. A disfunção da espermatogénese manifesta-se num quadro clínico de azoospermia secretora. Esta é considerada a manifestação mais severa de infertilidade masculina, afetando cerca de 1% da população masculina mundial. Alterações genéticas como as aneuploidias dos cromossomas sexuais, grandes rearranjos estruturais e microdeleções do cromossoma Y têm um papel de relevo na etiologia destes casos.

O cariótipo é o teste genético de primeira linha na pesquisa etiológica da infertilidade masculina. A pesquisa de microdeleções do cromossoma Y é recomendada em casos de perturbação da espermatogénese. Efetivamente microdeleções de genes da região AZF (fator de azoospermia) do braço longo do cromossoma Y comprometem a espermatogénese e estão associadas a casos graves de oligozoospermia e azoospermia. Deste modo, este trabalho teve como objetivo avaliar o impacto do estudo citogenético e da pesquisa de microdeleções do cromossoma Y no diagnóstico clínico da infertilidade primária masculina. No âmbito deste estudo foi realizada a análise citogenética e implementada a técnica de Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) para pesquisa das microdeleções do cromossoma Y em casos de infertilidade primária masculina.

No decorrer deste estudo foram avaliados 111 casos de infertilidade primária masculina e foram identificadas 11 alterações genéticas causais deste fenótipo, maioritariamente por citogenética convencional. Verificou-se que a aplicação simultânea das metodologias de citogenética e genética molecular permite atingir um maior número de diagnósticos, bem como a melhor caracterização das alterações identificadas. O estudo citogenético mantém-se a metodologia mais relevante nestes quadros clínicos, contudo, a pesquisa de microdeleções do cromossoma Y por MLPA complementa-a por aumento da resolução da análise.

Palavras-chave: Cariótipo; Microdeleções do Cromossoma Y; Infertilidade Masculina; Genes AZF; Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification.

Abstract

Male infertility is a pathological condition with multifactorial causes associated with genetic and environmental factors. Therefore, its phenotypic presentation is highly heterogeneous, usually including testicular dysfunction and spermatogenesis disturbance. The more severe the phenotype, the more predominant genetic factors are in the etiology of the infertility. The dysfunction of spermatogenesis results in clinical cases of non-obstructive azoospermia. This is considered the most severe manifestation of male infertility, affecting around 1% of the world's male population. Genetic aberrations such as sex chromosome aneuploidies, large structural rearrangements and Y chromosome microdeletions play an important role in the etiology of these cases.

The karyotype is the first line of genetic testing in the etiological research of male infertility. The screening for microdeletions of the Y chromosome is recommended in cases of spermatogenesis disturbance. Microdeletions of genes in the azoospermia factor region of the long arm of the Y chromosome compromise spermatogenesis and are associated with severe cases of oligozoospermia and azoospermia. Accordingly, this work aims to evaluate the impact of the cytogenetic study and the screening of Y chromosome microdeletions in the clinical diagnosis of primary male infertility. As part of this study, cytogenetic analysis was carried out and the Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA) technique was implemented to screen Y chromosome microdeletions in cases of primary male infertility.

In the course of this study, 111 cases of primary male infertility were assessed and 11 genetic alterations causing this phenotype were identified, most of which by classical cytogenetics. It was found that the simultaneous application of these methodologies allows for a greater number of diagnoses to be made, as well as a better characterization of the identified genetic aberrations. The cytogenetic study remains the most relevant methodology in these conditions, however, the search for Y chromosome microdeletions by MLPA complements it by increasing the resolution of the analysis.

Keywords: Karyotype; Y Chromosome Microdeletions; Male Infertility; AZF Genes; Multiplex Ligation-Dependent Probe Amplification.

Índice Geral

Índice de Figuras	iii
Índice de Tabelas	v
Lista de Abreviaturas	vii
Capítulo I Introdução.....	1
1. A Infertilidade Masculina.....	3
1.1 Definição e Prevalência	3
1.2 Avaliação Clínica	4
1.3 Classificação Etiológica	7
1.3.1 Defeitos espermáticos quantitativos	8
1.3.2 Obstrução ou disfunção de ductos	8
1.3.3 Defeitos espermáticos qualitativos.....	9
1.3.4 Perturbações do eixo hipotalâmico-pituitário	9
1.4 A Espermatogênese.....	10
1.5 A Azoospermia Secretora	12
1.6 O Cromossoma Y	14
2. Alterações Genéticas na Infertilidade Masculina	19
2.1 Aneuploidias	21
2.2 Grandes Rearranjos Estruturais.....	24
2.2.1 Alterações estruturais equilibradas	25
2.2.2 Alterações estruturais desequilibradas.....	28
2.3 Microdeleções do Cromossoma Y	30
2.3.1 AZFa	31
2.3.2 AZFb	31
2.3.3 AZFc	32
2.4 Variantes Genéticas de Sequência.....	32
Capítulo III Materiais e Métodos	39
1. Desenho Experimental	41
2. Citogenética.....	42
2.1 Citogenética Convencional	42
2.2 Citogenética Molecular	46
3. Genética Molecular	47
3.1 Extração de DNA.....	47
3.2 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)	48
Capítulo IV Resultados.....	51

1. Estudo Retrospectivo.....	53
2. Estudo Citogenético e Genético Molecular	59
Capítulo V Discussão	71
1. Estudo Retrospectivo.....	73
Caso Clínico A2	74
Caso Clínico A3	76
Casos Clínicos A4, A5, A6 e A7	77
2. Estudo Citogenético e Genético Molecular	77
Casos Clínicos B1 e B8.....	79
Caso Clínico B2.....	79
Caso Clínico B3.....	81
Caso Clínico B4.....	82
Casos Clínicos B5, B6 e B7	83
3. Considerações Finais	84
Capítulo VI Conclusão e Perspetivas Futuras	87
Capítulo VII Referências Bibliográficas	91

Índice de Figuras

Figura 1: Algoritmo de diagnóstico de infertilidade masculina associada a azoospermia.....	5
Figura 2: Ilustração esquemática da espermatogênese humana.....	11
Figura 3: Genes envolvidos em mecanismos moleculares da espermatogênese humana.....	12
Figura 4: Opções terapêuticas para diferentes quadros clínicos de infertilidade masculina associada a azoospermia.....	13
Figura 5: Idiograma do padrão de bandas por bandagem G do cromossoma Y humano.....	15
Figura 6: Ilustração esquemática do cromossoma Y.....	17
Figura 7: Ilustração esquemática da arquitetura do cromossoma Y, incluindo as regiões AZFa, AZFb e AZFc e os palíndromos a elas associados (P1 a P5).....	18
Figura 8: Ilustração esquemática das regiões deletadas em cada uma das microdeleções do cromossoma Y.....	31
Figura 9: Cariograma de um indivíduo do sexo masculino com cariótipo 46,XY por bandagem GTL.....	45
Figura 10: Bandagem CBG de um indivíduo do sexo masculino 46,XY evidenciando-se a marcação do cromossoma Y.....	46
Figura 11: Distribuição dos casos analisados do estudo retrospectivo por faixa etária.....	53
Figura 12: Distribuição dos casos analisados de acordo com a informação clínica de cada utente.....	54
Figura 13: Cariograma do caso A2 por bandagem GTL.....	56
Figura 14: Estudos complementares para caracterização do cromossoma Y isodicêntrico.....	56
Figura 15: Cariograma do caso A3 por bandagem GTL.....	57
Figura 16: Estudo por FISH para pesquisa do gene SRY no caso A3.....	57
Figura 17: Cariograma de um indivíduo com Síndrome de Klinefelter (caso A3) por bandagem GTL.....	58
Figura 18: Distribuição dos casos analisados na fase experimental por faixa etária.....	59
Figura 19: Distribuição dos casos analisados de acordo com a informação clínica de cada utente.....	60

Figura 20: Cariograma do caso B3 verificando-se uma deleção terminal do cromossoma Y por bandagem GTL.....	61
Figura 21: Estudos complementares para caracterização da deleção terminal do cromossoma Y.....	62
Figura 22: Cariograma do caso B4.....	62
Figura 23: Cariograma da linha celular 47,XYY do caso B2 por bandagem GTL.....	66
Figura 24: Análise do software Coffalyser.Net™ do resultado do estudo de MLPA do caso B2.....	65
Figura 25: Análise do software Coffalyser.Net™ do resultado do estudo de MLPA do caso B3.....	66
Figura 26: Análise do software Coffalyser.Net™ do resultado do estudo de MLPA do caso B5.....	68
Figura 27: Análise do software Coffalyser.Net™ do resultado do estudo de MLPA do caso B6.....	69
Figura 28: Análise do software Coffalyser.Net™ do resultado do estudo de MLPA do caso B7.....	70
Figura 29: Ilustração esquemática de um cromossoma Y isodicêntrico com ponto de quebra na heterocromatina DYZ18/DYZ1/DYZ2.....	75

Índice de Tabelas

Tabela 1: Quadro resumo dos casos com alterações cromossômicas identificadas por citogenética convencional.....	55
Tabela 2: Quadro resumo dos casos com alterações cromossômicas identificadas por citogenética convencional.....	61
Tabela 3: Quadro resumo dos casos com alterações cromossômicas identificadas por estudo genético molecular.....	64
Tabela 4: Sondas que apresentaram um rácio alterado no caso B2.....	65
Tabela 5: Sondas que apresentaram um rácio alterado no caso B3.....	66
Tabela 6: Sondas que apresentaram um rácio alterado no caso B5.....	68
Tabela 7: Sondas que apresentaram um rácio alterado no caso B6.....	69
Tabela 8: Sondas que apresentaram um rácio alterado no caso B7.....	70

Lista de Abreviaturas

AR: Gene Recetor de Androgénios

AZF: Fator de azoospermia

ASRM: Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva

AUA: Associação Americana de Urologia

CBG: Bandas C (bário e corante de Giemsa)

CBAVD: Ausência congénita bilateral dos canais deferentes

CFTR: Gene regulador da condutância transmembranar da Fibrose Quística

CNV: “Copy Number Variants”

DAZ: “Gene deleted in azoospermia”

DNA: Ácido desoxirribonucleico

EAA: Academia Europeia de Andrologia

EAU: Associação Europeia de Urologia

EDTA: Ácido Etilenodiamino Tetra-acético

EMQN: European Molecular Genetics Quality Network

FISH: Fluorescent *in situ* hybridization

FIV: Fertilização *in vitro*

FSH: Hormona folículo-estimulante

GnRH: Hormona libertadora de gonadotrofinas

GTL: Banda G (tripsina e corante Leishman)

ICSI: Injeção intracitoplasmática

Idic: Cromossoma isodicêntrico

ISCN: International System for Human Cytogenomic Nomenclature

LH: Hormona luteinizante

NAHR: Recombinação homóloga não alélica

NGS: Sequenciação de nova geração

MLPA: Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification

MMAF: Múltiplas anomalias morfológicas do flagelo

mTESE: “Microdissection TESE”

OAT: Oligoastenoteratozoospermia

OMS: Organização Mundial de Saúde

PAR: Regiões Pseudoautosómicas
PCD: Discinesia ciliar primária
PCR: “Polymerase chain reaction”
PMA: Procriação medicamente assistida
RNA: Ácido ribonucleico
ROS: Espécies reativas de oxigénio
SCOS: Síndrome de Células de Sertoli
SHOX: “Gene short stature homeobox”
SK: Síndrome de Klinefelter
sSMC: Small Supernumerary Marker Chromosomes
SRY: “Gene sex-determining region Y”
TESE: Extração testicular de espermatozoides

Capítulo I

Introdução

1. A Infertilidade Masculina

1.1 Definição e Prevalência

A Organização Mundial de Saúde (OMS) define infertilidade como “doença do sistema reprodutivo caracterizada pela incapacidade de alcançar uma gravidez clínica após 12 meses de relações sexuais regulares desprotegidas”^{1,2}. Esta é uma patologia de manifestação heterogénea, englobando tanto quadros clínicos com redução da probabilidade de conceção espontânea, como casos de esterilidade total e irreversível³. Efetivamente, a infertilidade é classificada como primária quando nunca foi estabelecida uma gravidez clínica e como secundária em casos de incapacidade de conceber subsequentemente a uma gravidez clínica, independentemente do resultado dessa gestação^{2,4}.

O relatório da OMS relativo à prevalência mundial da infertilidade de 2023 estima que 17.5% dos casais seja infértil⁵. O primeiro estudo epidemiológico sobre infertilidade em Portugal, AFRODITE em 2009, concluiu que 9 a 10% dos casais portugueses sofre de infertilidade ao longo da vida⁶. Tradicionalmente, considera-se que 20 a 30% dos casos de infertilidade se devem exclusivamente a fatores masculinos, 50% apenas a fatores femininos e os restantes a uma combinação de ambos⁴. No entanto, uma revisão recente dos dados disponíveis na literatura conclui que a infertilidade masculina contribui para 20 a 70% dos casos de infertilidade⁷. O mesmo estudo estima que 2.5 a 12% da população masculina mundial seja infértil, com especial prevalência em África e na Europa Central e do Leste. Não obstante, considera-se que estas taxas são subestimadas devido à inconsistência na aplicação dos conceitos de infertilidade e às crenças culturais que constroem a procura de cuidados médicos por parte destes indivíduos⁷.

A infertilidade masculina é uma patologia de causa multifatorial associada tanto a fatores genéticos como ambientais⁸. Por conseguinte, a sua apresentação fenotípica é altamente heterogénea, incluindo habitualmente disfunção testicular e perturbação da espermatogénese⁹. Quanto mais severo o fenótipo, mais preponderantes são os fatores genéticos na etiologia da patologia⁹. Atualmente, graças à evolução das tecnologias de diagnóstico, é possível identificar uma causa genética em 15% dos casos de infertilidade de fator masculino¹⁰. O diagnóstico etiológico é crucial para a decisão terapêutica com vista à

procriação, bem como para o acompanhamento clínico das comorbilidades associadas à infertilidade masculina¹¹.

1.2 Avaliação Clínica

Após o diagnóstico de infertilidade, conforme os critérios da OMS anteriormente referidos, ambos os membros do casal devem ser submetidos a uma avaliação clínica. Esta avaliação é igualmente recomendada após seis meses de relações sexuais desprotegidas sem concepção se a mulher tiver mais de 35 anos e a indivíduos com história clínica relevante^{11,12}. A avaliação clínica tem como principal objetivo identificar condições patológicas que possam ser tratadas ou minimizadas, possibilitando assim estabelecer uma gravidez espontânea. Pretende-se também identificar quadros clínicos que, sendo irreversíveis, possam ainda assim beneficiar de tecnologias de procriação medicamente assistida (PMA). Finalmente, deve ser avaliado o estado de saúde geral do paciente de modo a identificar potenciais patologias subjacentes à infertilidade ou comorbilidades desta^{11,13}. O prognóstico do indivíduo infértil depende da duração da infertilidade; se esta é primária ou secundária; da qualidade espermática; da idade do indivíduo e da fertilidade da parceira^{4,11}.

As diretrizes da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM), Associação Europeia de Urologia (EAU) e Associação Americana de Urologia (AUA) estabelecem que a avaliação clínica inicial do homem deve incluir a recolha da história reprodutiva e o espermograma^{4,13}. Caso seja identificada história clínica relevante e/ou alterações dos parâmetros espermáticos é então realizada uma avaliação clínica mais extensa¹². O estudo completo do homem infértil deve incluir¹¹:

- I. História clínica e reprodutiva;
- II. Espermograma;
- III. Exame físico;
- IV. Estudo endócrino;
- V. Estudos genéticos;
- VI. Exames de imagiologia;
- VII. Outros testes especializados.

A história clínica e reprodutiva, o espermograma e o exame físico avaliam os mesmos parâmetros em todos os pacientes e permitem estabelecer uma orientação inicial do estudo clínico. Deste modo, é possível que os estudos endócrinos e genéticos, os exames de imagiologia e outros testes especializados sejam adaptados à apresentação clínica de cada indivíduo^{4,11}. Efetivamente, o estudo endócrino inicial compreende o doseamento da hormona folículo-estimulante (FSH) e testosterona total e caso sejam detetadas anomalias, é alargado a outras hormonas como a hormona luteinizante (LH), testosterona livre, estradiol e/ou inibina B¹². Relativamente ao estudo genético, este é direcionado à apresentação clínica do indivíduo, uma vez que diferentes etiologias genéticas terão consequências fenotípicas distintas¹¹. A Figura 1 apresenta um possível algoritmo de diagnóstico de infertilidade masculina após o diagnóstico de azoospermia pelo espermograma¹⁴.

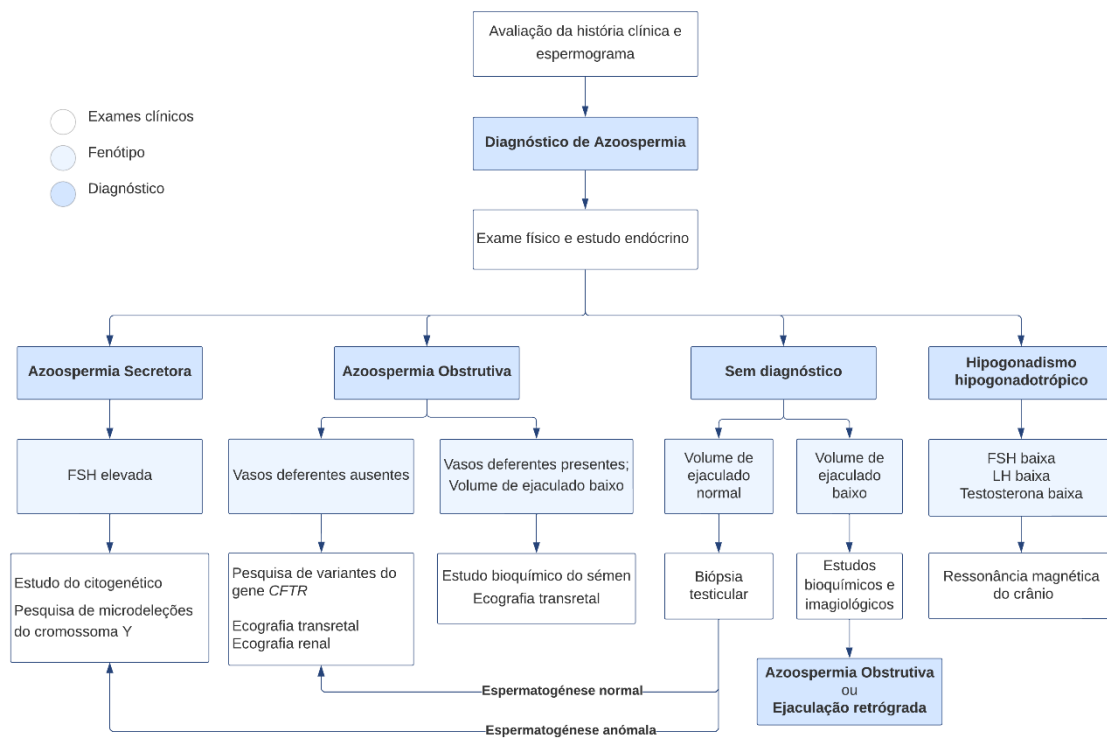


Figura 1: Algoritmo de diagnóstico de infertilidade masculina associada a azoospermia. FSH: hormona folículo-estimulante; LH: hormona luteinizante. Adaptado de Esteves et al., 2021.

O estudo da qualidade espermática pelo espermograma é fundamental no estudo do homem infértil. O espermograma analisa o ejaculado através de parâmetros macroscópicos – aparência, volume, pH e viscosidade – e microscópicos – concentração, motilidade, morfologia, aglutinação e vitalidade dos espermatozoides^{11,15}. Assim, permite avaliar a

capacidade de produção de espermatozoides e do seu transporte nos ductos pós-testiculares, bem como a atividade das glândulas secretoras anexas¹⁵. Efetivamente, o espermograma permite identificar vários defeitos espermáticos associados à infertilidade. Estas alterações não são diagnósticas por si só, visto que são manifestações de uma patologia subjacente, no entanto a sua identificação permite informar o processo clínico diagnóstico⁴. Os valores de referência do espermograma baseiam-se em dados de estudos populacionais e são disponibilizados pela OMS¹⁵. O manual da OMS de 2021 estabelece como valores mínimos de referência: (i) volume total do ejaculado de 1.4mL; (ii) concentração de 16 milhões de espermatozoides por mililitro; (iii) motilidade progressiva em 30% dos espermatozoides; (iv) morfologia normal em 4% dos espermatozoides, entre outros parâmetros. Deste modo, variações destes valores permitem a identificação de quadro de¹⁵:

- Azoospermia: ausência de espermatozoides no ejaculado;
- Oligozoospermia: concentração de espermatozoides inferior a 16×10^6 por mililitro;
- Criptozoospermia: espermatozoides identificados após centrifugação da amostra;
- Astenozoospermia: percentagem de espermatozoides com motilidade progressiva inferior a 30%;
- Teratozoospermia: percentagem de espermatozoides com morfologia normal inferior a 4%;
- Necrozoospermia: número reduzido de espermatozoides vivos e elevada percentagem de espermatozoides imóveis.

Recentemente, foram propostos novos parâmetros para avaliação da qualidade seminal: o stress oxidativo seminal e a fragmentação do DNA dos espermatozoides. Em ambos os casos, as causas podem ser intrínsecas, como anomalias endócrinas, varicocele e infeções, ou extrínsecas, devido à exposição à poluição e radiação ou consumo de álcool e tabagismo^{4,11}.

O stress oxidativo consiste no desequilíbrio entre a produção de espécies reativas de oxigénio (ROS) e as defesas antioxidantes do organismo. A concentração excessiva destes compostos resulta em danos a nível proteico, lipídico e do DNA¹¹. A ação das ROS tem efeitos negativos na qualidade espermática, função e integridade dos espermatozoides⁴. Efetivamente, em cerca de 50% dos casos de infertilidade masculina é detetado stress oxidativo no plasma seminal¹⁶. Este mecanismo pode danificar a estrutura do DNA, em particular a sua fragmentação pela quebra de uma ou ambas as cadeias nucleotídicas. O aumento da

fragmentação do DNA dos espermatozoides é comum em homens inférteis com ou sem anomalias detetadas no espermograma. Os espermatozoides afetados mantêm a capacidade de fertilização, contudo o desenvolvimento embrionário e implantação podem ser comprometidos, existindo maior probabilidade de aborto espontâneo e malformações congénitas⁴. A implementação da análise destes parâmetros na rotina diagnóstica da infertilidade masculina requer ainda o esclarecimento da sua patofisiologia e impacto na qualidade seminal, bem como a definição das técnicas de estudo mais indicadas, os valores de referência e terapêuticas adequadas.

1.3 Classificação Etiológica

A infertilidade masculina integra um conjunto heterogéneo de patologias de apresentação e etiologia distintas, cuja etiologia pode ser adquirida, congénita ou idiopática^{4,17}. As condições adquiridas podem dever-se a doenças sistémicas, trauma, fatores ambientais ou ao estilo de vida^{4,11}. As patologias congénitas podem ser subdivididas em genéticas ou não genéticas^{4,11}.

São considerados idiopáticos os casos em que a avaliação clínica não identifica anomalias nos parâmetros em estudo que justifiquem a incapacidade de conceber¹¹. Estes quadros clínicos representam cerca de 30 a 40% dos casos de infertilidade masculina. Nestes casos, admite-se que o fenótipo poderá estar associado à ação de ROS, à disrupção endócrina associada à poluição, e/ou a alterações genéticas e epigenéticas⁴. Efetivamente, os processos de desenvolvimento gonadal, atividade testicular e espermatogénese são ativamente regulados por inúmeros genes cuja alteração pode ter efeitos deletérios na fertilidade. A complexidade e o elevado número de genes envolvidos na espermatogénese, cerca de 2000, sugerem que exista elevada heterogeneidade génica e alélica nos quadros clínicos de falha espermatogénica. Contudo, a identificação, o estudo e a classificação de variantes patogénicas nestes genes é dificultado pelo desconhecimento dos mecanismos moleculares em que estão envolvidos, o seu carácter geralmente esporádico e a baixa frequência alélica na população^{9,18,19}.

A classificação etiológica tradicional da infertilidade masculina tem em consideração o processo biológico perturbado e a sua localização anatómica¹⁰. Assim, a infertilidade pode ser pré-testicular, testicular ou pós-testicular, dependendo da existência de alterações a nível

endócrino, testicular ou no transporte do esperma, respectivamente²⁰. Recentemente, foi proposta uma nova classificação em quatro categorias: defeitos espermáticos quantitativos; obstrução ou disfunção de ductos; defeitos espermáticos qualitativos e perturbações do eixo hipotálamo-hipófise⁹. Este sistema considera a apresentação clínica e os mecanismos patofisiológicos na definição das categorias etiológicas^{9,21}. Assim, esta classificação é congruente com a orientação do estudo diagnóstico e da terapêutica de cada patologia^{9,21}.

1.3.1 Defeitos espermáticos quantitativos

Nesta categoria incluem-se quadros clínicos de redução do número de espermatozoides no ejaculado⁹. Estas patologias devem-se à perturbação do processo espermático e são a causa mais frequente de infertilidade masculina⁹. Caracterizam-se pela redução do número de espermatozoides no esperma, níveis de FSH aumentados (>7 IU/L) e volume testicular diminuído (<15mL)²². O fenótipo é variável, desde casos de oligozoospermia, oligozoospermia severa (concentração de espermatozoides inferior a 5×10^6 /mL) e azoospermia^{12,15}.

Inúmeras patologias estão associadas à redução do número de espermatozoides no ejaculado. Nas formas congénitas incluem-se a anorquia, criptorquidia e alterações cromossómicas numéricas e estruturais. As condições adquiridas incluem o varicocele, torção testicular, doenças sistémicas, neoplasias testiculares e quadros clínicos de infeção, trauma ou pós-cirúrgicos^{9,21}.

1.3.2 Obstrução ou disfunção de ductos

Os distúrbios de transporte espermático perturbam a emissão dos espermatozoides para o exterior, podendo ocorrer a qualquer nível do trato urogenital⁹. Assim, a espermatogénese, o volume testicular e os níveis de FSH e LH são normais, mas os indivíduos são oligozoospermicos ou azoospermicos¹⁵. De acordo com a localização da obstrução/disfunção, estas patologias são subdivididas em obstruções intratesticulares; obstruções dos epidídimos; obstruções dos vasos deferentes; obstruções dos ductos ejaculatórios e obstruções dos ductos seminiais distais¹⁵.

As patologias que integram esta categoria resultam de lesões do trato urogenital, infecção, inflamação ou doenças autoimunes. A única forma congénita de causa genética conhecida é a ausência congénita bilateral dos canais deferentes (CBAVD)⁴. Esta está associada a variantes patogénicas em homozigotia no gene regulador da condutância transmembranar da Fibrose Quística (*CFTR*), podendo apresentar manifestações clássicas da fibrose quística. Adicionalmente, variantes deste gene podem estar na base de fenótipos obstrutivos como a obstrução idiopática do epidídimo, obstrução bilateral dos canais ejaculadores associada a anomalias das vesículas seminais^{4,19}.

1.3.3 Defeitos espermáticos qualitativos

Os defeitos espermáticos qualitativos incluem alterações da morfologia e/ou da motilidade e função dos espermatozoides. Estas patologias podem ser classificadas em (i) macrozoospermia; (ii) globozoospermia; (iii) múltiplas anomalias morfológicas do flagelo (MMAF), e (iv) discinesia ciliar primária (PCD)⁹. Estas alterações podem dever-se a fatores congénitos e adquiridos²¹.

Estes fenótipos podem estar associados à perda de competência para a mobilidade, fertilização e, posteriormente, prejudicar o desenvolvimento embrionário. A disfunção a nível da motilidade pode ser ultrapassada através de técnicas de PMA como a injeção intracitoplasmática (ICSI). Contudo, caso a integridade genética se encontre comprometida, os embriões poderão não ser viáveis^{9,21}.

1.3.4 Perturbações do eixo hipotalâmico-pituitário

A espermatogénese é dependente da regulação hormonal estabelecida pelo eixo hipotálamo-hipófise-testicular. Perturbações da atividade do hipotálamo e/ou hipófise podem resultar em hipogonadismo hipogonadotrópico^{4,19}. Esta condição é caracterizada pela diminuição dos níveis de FSH, LH e testosterona. A etiologia pode ser congénita, como é o caso da síndrome de Kallman e do hipogonadismo hipogonadotrópico idiopático normósmico, ou adquirida e associar-se a condições adquiridas como trauma, tumor, doenças infiltrativas ou infeção^{19,23}.

1.4 A Espermatogénese

A espermatogénese é o processo de produção de células sexuais haploides, os espermatozoides, a partir de células germinais, as espermatogónias do tipo A²⁴. Este processo tem duração de cerca de 72 dias e pode ser dividido em três fases: (i) divisão mitótica das espermatogónias; (ii) divisão meiótica dos espermatócitos e produção espermátides e (iii) espermiogénese, diferenciação das espermátides em espermatozoides²².

As espermatogónias do tipo A (2n) são células germinais que se encontram na membrana basal dos túbulos seminíferos²². Aquando da puberdade, estas células proliferam por mitose produzindo a cada divisão uma espermatogónia do tipo A e uma espermatogónia do tipo B (2n), para renovação da população celular e produção de espermatozoides, respectivamente^{21,22,25}. As espermatogónias do tipo B diferenciam-se em espermatócitos primários (2n) que, ao sofrerem a primeira divisão da meiose, dão origem a dois espermatócitos secundários (n)^{21,22,25}. A segunda divisão meiótica produz quatro espermátides (n)^{21,22,25}. A espermiogénese diferencia as espermátides em espermatozoides por alteração da sua forma, dimensão e composição em organelos²⁵. Os espermatozoides formados são constituídos por três estruturas principais: a cabeça, a peça intermédia e a cauda²⁵.

Ao longo da espermatogénese, as células mais diferenciadas afastam-se da zona basal dos túbulos seminíferos e, finalizado este processo, os espermatozoides são libertados pelas células de Sertoli no lúmen dos túbulos^{22,25}. Nos epidídimos os espermatozoides adquirem motilidade, concluindo assim a sua maturação²⁵. Finalmente, a capacidade de fertilizar o ovócito é adquirida no trato reprodutor feminino pelo processo de capacitação²⁵. O processo espermatogénico encontra-se representado esquematicamente na Figura 2²⁸.

A espermatogénese é um processo complexo dependente de regulação precisa dos processos celulares, endócrinos e genéticos²⁴. A nível celular, são secretados fatores parácrinos e autócrinos que estabelecem a comunicação entre células germinais e somáticas²⁶. O controlo endócrino decorre do ciclo de feedback negativo estabelecido no eixo hipotálamo-hipófise-testicular. Efetivamente, o hipotálamo secreta hormona libertadora de gonadotrofinas (GnRH) a qual estimula a hipófise a produzir LH e FSH que

atuam a nível testicular. Esta estimulação induz a espermatogénese, a produção de testosterona e inibina, hormonas estas que inibem a produção de GnRH pelo hipotálamo²⁷.

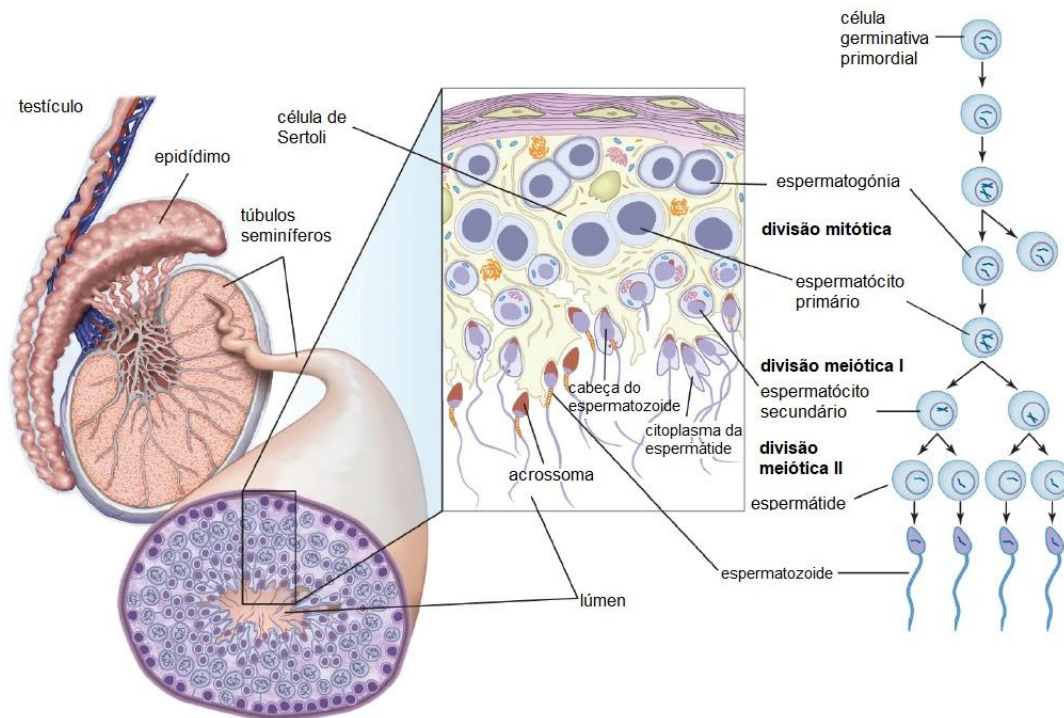


Figura 2: Ilustração esquemática da espermatogénese humana. Adaptado de Encyclopaedia Britannica.

A desregulação da espermatogénese em qualquer das suas fases pode conduzir à produção de espermatozoides anormais, ou mesmo à falha espermatogénica¹¹. Relativamente à regulação genética, estima-se que existam cerca de 2000 genes intervenientes na espermatogénese, predominantemente expressos nos testículos²⁸. A Figura 3 associa alguns dos mecanismos moleculares relevantes em cada estágio da meiose a genes que os regulam³⁰. O estudo de indivíduos inférteis tem permitido expandir o número de genes cuja alteração está associada aos diferentes fenótipos de infertilidade, tendo uma recente revisão sistemática identificado 120 genes associados a estas patologias^{18,19}.

O DNA sofre inúmeras modificações durante a espermatogénese, incluindo alterações epigenéticas, reorganização da estrutura da cromatina e recombinação cromossómica na meiose. Estes processos podem introduzir erros que contribuem para o fenótipo da infertilidade. Efetivamente, foram identificadas alterações ao nível da metilação do DNA e da arquitetura da cromatina dos espermatozoides de homens inférteis^{31,32}. Adicionalmente, verifica-se que homens inférteis com parâmetros seminais alterados, apresentam um

aumento da frequência de espermatozoides aneuploides^{33,34,35,36}. Em qualquer dos casos há um comprometimento da fertilidade e viabilidade dos embriões produzidos^{31,33}.

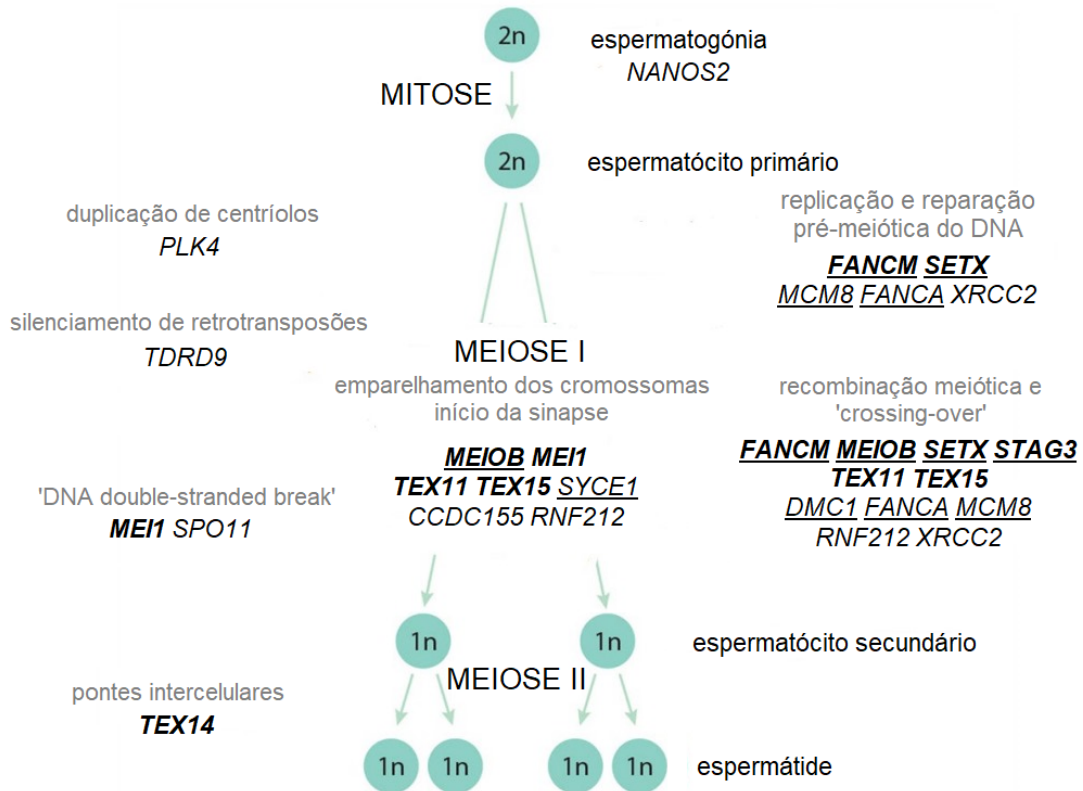


Figura 3: Genes envolvidos em mecanismos moleculares da espermatogénese humana. Estes genes estão implicados nos processos da manutenção da integridade genómica na mitose e meiose (negrito) ou são genes candidatos (sem negrito). Variantes em alguns destes genes (sublinhado) foram também reportados em indivíduos com insuficiência ovárica primária. Adaptado de Kasak et al., 2021.

1.5 A Azoospermia Secretora

A disfunção da espermatogénese pode resultar na produção insuficiente de espermatozoides, que se manifesta num quadro clínico de azoospermia. O fenótipo de azoospermia pode dever-se a diversas causas: falência testicular, obstrução do trato urogenital, ou anomalias endócrinas⁴. Deste modo, a azoospermia pode ser secretora ou obstrutiva. O primeiro caso deve-se à perturbação da espermatogénese por falha testicular primária ou secundária, enquanto os quadros de azoospermia obstrutiva estão associados à oclusão do trato urogenital^{9,28}.

A etiologia da azoospermia pode ser adquirida ou congênita. Patologias adquiridas como o varicocele, a orquite, doenças sistêmicas, cancro testicular e do sistema nervoso central, a perda/remoção bilateral testicular, a exposição a terapêutica citotóxica e/ou radioterapia estão na base de 35 a 40% dos casos de azoospermia secretora^{21,28}. As patologias congênitas incluem a criptorquidia, a obstrução do trato urogenital, a CBVAD, a ejaculação retrógrada, a síndrome de Kallman e síndromes de insensibilidade a androgénios^{4,21,28}. Adicionalmente, as aneuploidias dos heterossomas, alterações cromossômicas estruturais e microdeleções do cromossoma Y têm um papel de relevo em casos de azoospermia secretora^{21,28}.

Indivíduos azoospermicos têm maior probabilidade de ser portadores de uma anomalia genética, sendo este risco superior quanto mais grave o fenótipo⁹. Em 25% dos casos de azoospermia e 10% dos de oligozoospermia é possível diagnosticar uma causa genética do fenótipo³⁷. Após o diagnóstico de azoospermia ou oligozoospermia severa é indicado estudo do cariótipo e pesquisa de microdeleções do cromossoma Y e a pesquisa de variantes do gene *CFTR* em caso de suspeita de CBAVD. A Figura 4 apresenta um algoritmo de intervenção clínica após diagnóstico de azoospermia, incluindo opções terapêuticas para diferentes quadros clínicos¹¹.

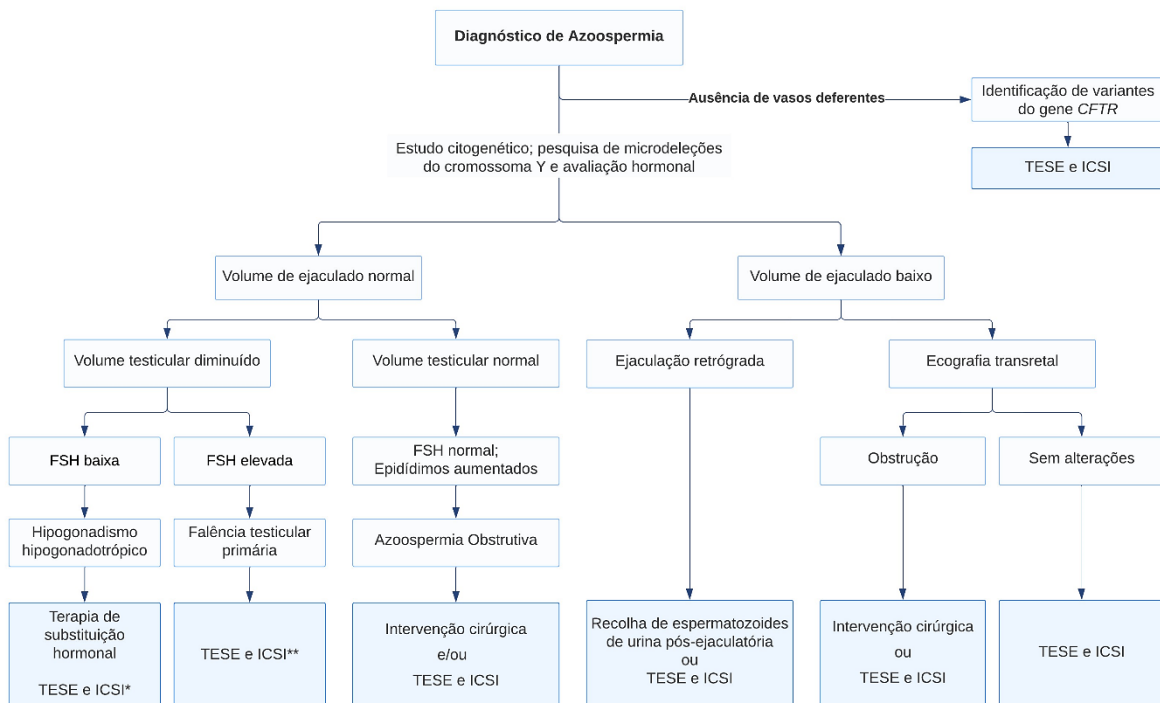


Figura 4: Opções terapêuticas para quadros clínicos de infertilidade masculina associada a azoospermia. FSH: hormona foliculo-estimulante; TESE: extração testicular de espermatozoides; ICSI: injeção intracitoplasmática; *de acordo com a resposta à terapêutica; **de acordo com as alterações genéticas identificadas. Adaptado de Agarwal et al., 2020.

A azoospermia secretora é a forma mais comum de azoospermia e é considerada a manifestação mais severa de infertilidade masculina^{10,38}. Este quadro clínico afeta cerca de 1% da população masculina mundial, sendo responsável por 10% dos casos de infertilidade^{9,28}. Na maioria dos casos a etiologia é a falência testicular primária derivada de erros intrínsecos da espermatogénese²⁸. Na maioria dos casos de azoospermia secretora não são identificadas alterações genéticas responsáveis pela patologia. Considera-se que a classificação de um elevado número de casos como idiopáticos se deve à heterogeneidade genética associada à falência espermatogénica primária^{9,18}. Os defeitos espermáticos quantitativos são frequentemente acompanhados por alterações a nível da morfologia e motilidade dos espermatozoides, denominando-se a esta condição oligoastenoteratozoospermia (OAT)⁴. Atualmente, com recurso às tecnologias de PMA, nomeadamente extração testicular de espermatozoides (TESE) e ICSI, é possível que homens que sofram deste quadro patológico sejam pais biológicos³⁹.

A classificação da azoospermia secretora baseia-se no fenótipo histológico testicular observado através da TESE. Existem três categorias com grau crescente de gravidade: (i) hipoespermatogénese; (ii) paragem da maturação em meiose e (iii) síndrome de células de Sertoli⁹. A hipoespermatogénese é caracterizada pela redução do número de células germinais nos túbulos seminíferos. Deste modo, estão presentes células em todos os estádios da espermatogénese, incluindo espermatozoides maduros, mas em número reduzido. A paragem da maturação em meiose ocorre quando o processo espermatogénico é interrompido na meiose I⁴⁰. Finalmente, na síndrome de células de Sertoli não existem células germinais nos túbulos seminíferos, identificando-se apenas células de Sertoli, logo não há produção de espermatozoides^{4,9}. No entanto, é comum que a histologia seja mista, com a coexistência de túbulos seminíferos com espermatogénese incompleta e outros com espermatozoides³⁹.

1.6 O Cromossoma Y

Os cromossomas sexuais humanos evoluíram a partir dos autossomas²⁴. Relativamente ao cromossoma Y, a primeira fase da sua evolução deu-se pela aquisição do gene de determinação do sexo masculino, o “Sex-determining Region Y” (*SRY*)²⁴. A presença deste

gene no cromossoma Y promoveu a acumulação de genes vantajosos para o sexo masculino por transposição e amplificação. A seleção positiva destes “male-advantage genes” em conjunto com a ocorrência de grandes inversões neste cromossoma levaram à divergência do seu homólogo (cromossoma X). Assim, a recombinação entre os cromossomas foi suprimida, ficando limitada às Regiões Pseudoautosómicas (PAR)^{35,41}. A ausência de recombinação, permitiu a acumulação de erros e perda de genes, com consequente degeneração do cromossoma Y³⁵. Efetivamente, a degradação do cromossoma foi extensa, sendo este atualmente o cromossoma com menor conteúdo génico, apresentando apenas 3% dos genes originais^{35,41}.

Estruturalmente, o cromossoma Y é um cromossoma submetacêntrico (grupo G) com um braço curto (p) e um braço longo (q) separados por um centrómero²⁴. A Figura 5 apresenta o ideograma deste cromossoma, bem como imagens do mesmo obtidas por citogenética convencional⁴². Este cromossoma apresenta cerca de 60 Mb, contudo o seu tamanho varia de acordo com a dimensão da região polimórfica do braço longo⁴³. O seu estudo por bandagem G com resolução de pelo menos 550 bandas permite identificar onze sub-bandas, três delas G-positivas: uma na zona distal do braço curto e duas na zona proximal do centrómero do braço longo⁴².

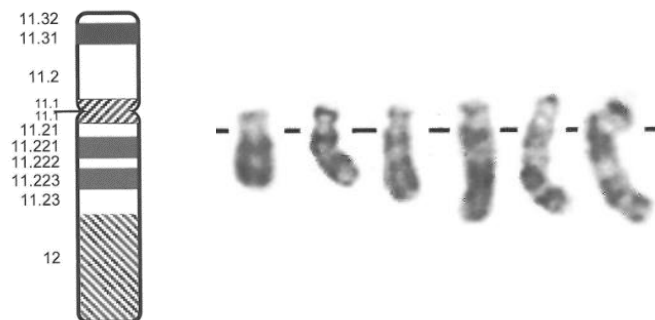


Figura 5: Idiograma do padrão de bandas por bandagem G do cromossoma Y humano com resolução de 500 bandas (esquerda) e cromossomas bandados por bandagem G de resolução de cerca de 500 bandas a 900 bandas (direita). Adaptado de ISCN 2020.

Na extremidade de cada braço encontram-se as regiões pseudoautosómicas, a PAR1 (2.77 Mb) no braço curto e a PAR2 (329.5 kb) no braço longo. Estas são de extrema importância para o emparelhamento dos homólogos X e Y na meiose, sendo a PAR1 vital para a correta segregação dos cromossomas sexuais^{20,44}. Relativamente ao seu conteúdo génico, na PAR1

localizam-se 15 genes codificantes: *PLCXD1*, *GTPBP6*, *PPP2R3B*, *SHOX*, *CRLF2*, *CSF2RA*, *IL3RA*, *SLC25A6*, *ASMTL*, *P2RY8*, *AKAP17A*, *ASMT*, *DHRSXY*, *ZBED1* e *CD99*, cujos homólogos não sofrem inativação do cromossoma X^{45,46}. Na PAR2 estão contidos os genes codificantes *VAMP7* e *IL9R*⁴⁵. Denomina-se “Male Specific region of the Y” (MSY) à região deste cromossoma que exclui as PAR.

Enquanto o braço curto do cromossoma apresenta apenas eucromatina, o braço longo é constituído por eucromatina e heterocromatina⁴⁷. A heterocromatina localiza-se na região centromérica, numa pequena secção que interrompe a região eucromática do braço longo e na sua porção distal⁴⁷. A região distal (Yq12) contém sequências repetitivas organizadas em “tandem arrays”, preponderantemente famílias de sequências “interspersed satellite” *DYZ1* e *DYZ2*^{20,44,48}. Esta é uma região de heterocromatina constitutiva tipicamente de 40 Mb, representando cerca de 50% do cromossoma⁴⁸. Contudo, a Yq12 é uma região de dimensão polimórfica variável entre indivíduos. Deste modo, apesar de a dimensão do cromossoma Y ser geralmente descrita como inferior à dos pequenos cromossomas acrocêntricos, foram já descritos casos em que a sua dimensão se assemelha aos cromossomas dos grupos D e E^{44,49}.

Relativamente à eucromatina, de acordo com a última versão do genoma de referência (T2T CHM13v2.0/hs1), o cromossoma Y contém 693 genes, dos quais se prevê que 107 sejam codificantes⁴⁴. Destes, 63 estão descritos nas bases de dados Ensembl e GenomeBrowser, codificando 42 transcritos distintos. De facto, o cromossoma Y contém oito famílias de genes multi-cópia que codificam transcritos idênticos⁴⁴. O conteúdo génico do cromossoma inclui três classes: X-transpostas (3.4 Mb), X-degeneradas (8.5 Mb) e amplicónicas (10.2 Mb)⁴⁷.

As sequências X-transpostas apresentam 99% de homologia com a banda Xq21, visto que resultam de um evento de transposição de genes entre X e o Y⁴⁷. Esta classe localiza-se em duas regiões no braço curto do cromossoma Y, sendo a classe com menor densidade de genes e contendo apenas dois genes codificantes, *PCDH11Y* e *TGIF2LY*^{47,48}. A classe X-degenerada apresenta 60 a 90% de identidade com as sequências homólogas no cromossoma X^{20,47}. Organizam-se em 8 blocos em ambos os braços do cromossoma e apresentam genes e pseudogenes. Dos genes, 13 são codificantes e têm expressão ubíqua: *SRY*, *RPS4Y1*, *ZFY*, *AMELY*, *TBL1Y*, *USP9Y*, *DDX3Y*, *UTY*, *TMSB4Y*, *NLGN4Y*, *KDM5D*, *EIF1AY* e *RPS4Y2*^{45,47}. As sequências amplicónicas localizam-se na região proximal do Yp e ao longo de todo o braço longo eucromático organizadas em 7 segmentos distintos⁴⁷. Esta classe inclui

oito famílias com múltiplas unidades com elevada identidade nucleotídica entre si e que codificam genes expressos exclusivamente nos testículos e associados à fertilidade⁴⁴. Estas sequências resultam da amplificação de genes originalmente presentes nos cromossomas sexuais e pela transposição e posterior amplificação de genes autossómicos⁴⁸. Na Figura 6 encontra-se esquematizada a estrutura do cromossoma Y e a sua constituição génica subdividida nas classes anteriormente descritas⁴⁸.

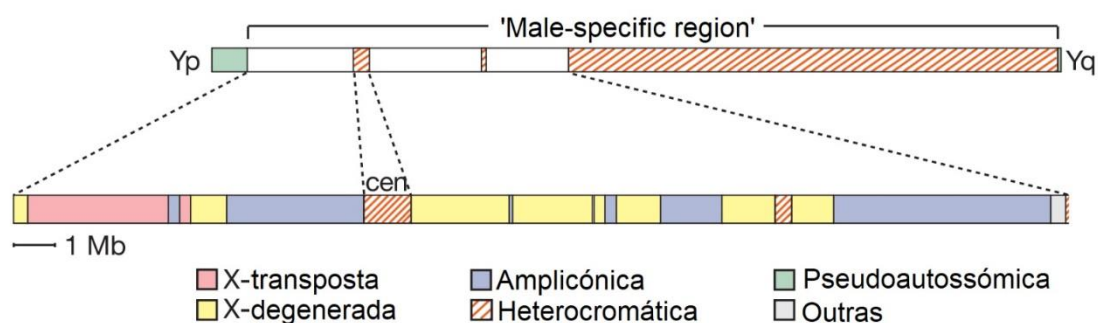


Figura 6: Ilustração esquemática do cromossoma Y, identificando as regiões pseudoautossómicas e heterocromáticas, bem como as classes de sequências euromáticas da “Male Specific Region” (MSY): X-transposta; X-degenerada e amplicónica. A barra a negro de 1-Mb indica a escala do diagrama. Adaptado de Skaletsky et al., 2007.

As regiões amplicónicas organizam-se em palíndromos, os quais conferem ao cromossoma Y uma arquitetura característica de elevada importância para a evolução do seu conteúdo génico. Efetivamente, no braço longo do cromossoma encontram-se oito palíndromos (P1 a P8) que compreendem 5.7 Mb (25%) de toda a MSY^{47,48}. Cada uma destas estruturas é composta por dois braços (de 9 Kb a 1.45 Mb) que contêm sequências amplicónicas idênticas, mas de sentido inverso⁴⁸. A cada família amplicónica foi atribuída uma cor: amarelo (yel); azul (b); turquesa (t); verde (g); vermelho (r) e cinzento (gr), e cada unidade de repetição é identificada por um número²⁴. A Figura 7 esquematiza a estrutura do cromossoma Y, incluindo as regiões AZFa, AZFb e AZFc e os palíndromos a elas associados⁵⁰.

Existem também cinco conjuntos de repetições invertidas (IR1 a IR5) que se localizam em ambos os braços dos cromossomas⁴⁷. Em duas delas, IR1 e IR4, os pares invertidos encontram-se em braços distintos, suspeitando-se assim que a sua recombinação homóloga intracromossómica possa estar na base da ocorrência de inversões pericentroméricas do cromossoma^{47,51}.

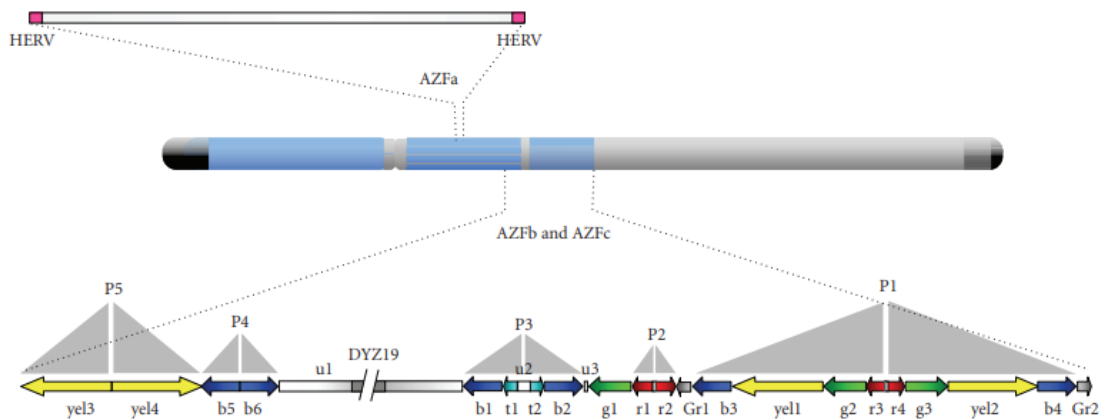


Figura 7: Ilustração esquemática da arquitetura do cromossoma Y, incluindo as regiões AZFa, AZFb e AZFc e os palíndromos a elas associados (P1 a P5). As famílias amplicónicas são identificadas por cor amarelo (yel); azul (b); turquesa (t); verde (g); vermelho (r) e cinzento (gr). Cada unidade de repetição é identificada por um número e a sua polaridade é indicada pelo sentido da seta. Adaptado de Navarro-Costa et al., 2010.

A arquitetura da MSY em estruturas palindrómicas predispõe esta região aos mecanismos de recombinação homóloga não alélica (NAHR) e de conversão génica, os quais têm um papel fundamental na evolução do conteúdo génico do cromossoma Y⁵². A NAHR é uma transferência não recíproca de DNA que resulta na deleção da região intra-palindrómica⁵². As microdeleções geradas resultam em infertilidade associada à falha do processo espermatogénico⁴⁷.

No entanto, a arquitetura desta região tem também efeitos benéficos na manutenção do conteúdo génico. A conversão génica é um mecanismo de recombinação intracromossómica em que ocorre a transferência não recíproca entre sequências duplicadas⁵³. Através deste mecanismo é possível que variantes deletérias sejam repostas pela forma funcional do gene por transferência da sequência original⁵². Assim, considera-se que esta é uma estratégia evolutiva para conservação dos genes que, na ausência de recombinação, acumulariam mutações deletérias e se tornariam inativos ou ineficientes^{24,53}.

O estudo do cromossoma Y em homens inférteis permitiu identificar regiões do seu braço longo que se encontram frequentemente deletadas pelo mecanismo de NAHR em homens azoospermicos⁴⁷. Assim, estas regiões foram denominadas fator de azoospermia (AZF): a mais próxima do centrómero, a AZFa; seguindo-se a AZFb numa posição intermédia e a mais distal a AZFc^{47,48}. A caracterização destas regiões baseia-se em estudos de microdeleções das mesmas, podendo a definição dos seus limites e, conseqüentemente, do seu conteúdo

génico apresentar variações na literatura⁵⁴. Os genes localizados nestas regiões estão envolvidos nos processos de formação das gónadas, regulação da espermatogénese, mas também no desenvolvimento dos rins, cérebro e coração²⁴.

A AZFa apresenta 1100 Kb e contém dois genes codificantes, *USPY9* (ubiquitin specific peptidase 9 Y-linked) e *DDX3Y*⁵⁵. Estes são genes X-degenerados com expressão ubíqua⁴⁷. Esta região não é adjacente à AZFb, assim, no intervalo entre estas localizam-se seis genes codificantes *UTY*, *TMSB4Y*, *VCY*, *VCY1B*, *NLGN4Y* e *CDY2B*⁴⁵.

A região AZFb compreende 3.2 Mb, dos quais os 1.5 Mb terminais são partilhados com a região AZFc⁵⁶. Esta região contém a região proximal do palíndromo P1 e a totalidade dos palíndromos P2 a P5. Neste intervalo incluem-se 14 unidades amplicónicas – *yel3*, *yel4*, *b5*, *b6*, *b1*, *t1*, *t2*, *b2*, *g1*, *r1*, *r2*, *gr1*, *b3* e *yel1* – das quais as sete primeiras são exclusivas desta região e as restantes partilhadas com a AZFc⁵⁶. Entre os palíndromos P4 e P3 localiza-se uma região heterocromática constituída por uma família de DNA em “tandem repeats”, a *DYZ19*⁵⁷. O conteúdo génico da AZFb inclui genes amplicónicos, mas também X-degenerados: *CDY2A*, *HSFY1*, *HSFY2*, *KDM5D*, *EIF1AY*, *RPS4Y2*, *RBMY1B*, *RBMY1A1*, *RBMY1D*, *RBMY1E*, *PRY2*, *RBMY1F*, *RBMY1J*, *PRY*, *BPY2*, *DAZ1*, *DAZ2* e *CDY1B*. A maioria destes genes expressa-se unicamente nos testículos, com exceção dos genes *KDM5D*, *EIF1AY* e *RPS4Y2*⁴⁵.

A AZFc apresenta 4.5 Mb, incluindo a sobreposição com a AZFb referida anteriormente⁵⁵. Nesta região localizam-se os palíndromos P1 e P2 e parcialmente o P3 e as respectivas unidades amplicónicas *b2*, *g1*, *r1*, *r2*, *gr1*, *b3*, *yel1*, *g2*, *r3*, *r4*, *g3*, *yel2*, *b4* e *gr2*⁵⁶. A AZFc compreende exclusivamente genes amplicónicos com expressão testicular: *PRY*, *BPY2*, *DAZ1*, *DAZ2*, *CDY1B*, *BPY2B*, *DAZ3*, *DAZ4*, *BPY2C* e *CDY1*⁴⁵.

2. Alterações Genéticas na Infertilidade Masculina

O estudo genético de homens inférteis permite identificar alterações genéticas que estejam na base do fenótipo de infertilidade. Estes estudos são essenciais pelo seu valor diagnóstico e de apoio à decisão clínica, bem como para o aconselhamento genético dos indivíduos⁴. Os três principais fatores genéticos associados à infertilidade masculina são as anomalias cromossómicas, as microdeleções do cromossoma Y e as variantes do *CFTR*⁹. O estudo destas alterações genéticas está previsto pelas diretrizes da EEA e EAU e é realizado como rotina em

casos de infertilidade masculina primária⁴. O sucesso do estudo genético depende da correta avaliação clínica do indivíduo, identificando-se patologias que orientem o diagnóstico citogenético e/ou genético molecular^{9,11}. Efetivamente, diferentes alterações genéticas requerem metodologias distintas para a sua identificação. Alterações cromossômicas numéricas e estruturais são detetáveis por citogenética convencional, sendo este o teste de primeira linha em casos de infertilidade⁹. A clarificação de rearranjos estruturais complexos, em especial do cromossoma Y, é realizada por técnicas de citogenética molecular com resolução superior à citogenética clássica: a Fluorescence *in situ* Hybridisation (FISH) e o Array-CGH⁵⁸. A detecção de microdeleções do cromossoma Y é possível através de técnicas de PCR multiplex e Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA), sendo a primeira a metodologia recomendada pelas diretrizes da EAA/EMQN^{55,58}. Variantes de sequência são estudadas por tecnologias de sequenciação: sequenciação de Sanger caso exista apenas um gene em estudo de dimensão até cerca de 800pb e sequenciação de nova geração (NGS) para o estudo de múltiplos genes (painel de genes)⁵⁸.

Estima-se que as alterações cromossômicas e variantes de sequência expliquem cerca de 30% dos casos de infertilidade masculina, contudo a taxa diagnóstica é muito inferior, assumindo-se 15%⁹. De acordo com a EAU, a incidência de alterações cromossômicas em homens inférteis é de 5.8%, sendo estas dez vezes mais prevalentes em homens com alterações quantitativas do espermograma do que na população em geral⁴. De facto, indivíduos diagnosticados com azoospermia secretora apresentam maior risco de serem portadores de alterações genéticas^{4,9}. A incidência de alterações genéticas aumenta com a severidade do fenótipo, como se verifica relativamente às microdeleções do cromossoma Y. Estas são mais prevalentes em homens azoospermicos (8-12%) do que oligozoospermicos (3-7%) e não estão presentes em indivíduos normozoospermicos^{4,9}. A patofisiologia das cromossomopatias está associada à perturbação do emparelhamento dos cromossomas na meiose e à presença de desequilíbrios genéticos nos embriões gerados^{43,58}. Relativamente às microdeleções do cromossoma Y, a deleção de genes envolvidos nos vários processos da espermatogénese induz a perturbação e mesmo bloqueio deste processo⁹.

O diagnóstico genético tem um papel elucidativo relativamente à orientação da opção terapêutica e da intervenção no âmbito da PMA. Efetivamente, o diagnóstico de determinadas alterações genéticas pode ser um fator prognóstico do sucesso de terapêuticas

como a TESE e da criopreservação de espermatozoides ou de tecido testicular^{4,55}. Finalmente, a identificação de cromossomopatias ou variantes genéticas hereditáveis permite o correto aconselhamento genético do casal e a oferta de diagnóstico pré-implantatório quando aplicável, diagnóstico pré-natal e realização de estudos familiares para identificação de familiares portadores^{4,9}.

2.1 Aneuploidias

As aneuploidias são alterações cromossômicas numéricas em que o complemento cromossômico ($2n=46$) se encontra alterado por ganho ou perda de um cromossoma^{58,59}. Esta alteração deve-se a erros na disjunção dos cromossomas em divisões meióticas ou mitóticas^{58,59}. A maioria das aneuploidias é letal, uma vez que a sub- ou sobredosagem dos genes dos cromossomas envolvidos não é compatível com a vida^{58,59}. As aneuploidias dos cromossomas sexuais estão associadas a um menor desequilíbrio genético do que as aneuploidias autossômicas, uma vez que o cromossoma Y é pobre em genes e o cromossoma X sofre inativação de grande parte do seu conteúdo génico. Deste modo, estas alterações resultam em fenótipos mais leves e principalmente associados a quadros de infertilidade^{43,58}.

Síndrome de Klinefelter (47,XXY)

A Síndrome de Klinefelter (SK) é uma aneuploidia dos cromossomas sexuais por ganho de um cromossoma X. Esta ocorre por não-disjunção do cromossoma X na meiose I da oogénese ou espermatogénese ou meiose II da oogénese^{43,58}. Mais raramente, a não-disjunção pode ocorrer em mitoses pós-zigóticas dando origem a um quadro de mosaicismo de expressão variável⁶⁰. É a alteração cromossômica sexual mais comum em homens, e também a etiologia genética mais frequente da infertilidade masculina e causa mais comum de azoospermia secretora^{33,39,61}. A SK tem frequência de 1/600 na população em geral e de 1/33 na população masculina infértil (presente em 0.6% dos casos de oligozoospermia e 11% dos de azoospermia)^{47,62}. O fenótipo destes indivíduos é variável, dependendo de fatores hormonais, genéticos e da idade^{4,63}. As características clássicas desta patologia são o hipogonadismo hipergonadotrófico, testículos pequenos, ginecomastia, dificuldades de aprendizagem e infertilidade^{9,63}. A nível testicular ocorre a hialinização progressiva dos túbulos seminíferos e

consequente falha espermatogénica⁶³. Efetivamente, na maioria dos casos os homens são azoospermicos (>90%) e ocasionalmente oligozoospermicos ou criptozoospermicos (~10%)⁹. O diagnóstico é frequentemente realizado em idade adulta em consequência da identificação de um quadro de infertilidade, mas considera-se que a maioria dos casos nunca são identificados⁹. A SK está também associada a comorbilidades a nível de vários sistemas, como a diabetes, doenças cardiovasculares e osteoporose³⁷.

Na generalidade, a SK apresenta-se de forma completa, ou seja, está presente em todas as células com complemento cromossómico 47,XXY. No entanto, cerca de 10 a 20% dos casos apresentam variantes da Síndrome: (i) mosaicos 47,XXY/46,XY; (ii) polissomias 48,XXXY, 48,XXYY e 49,XXXXY; e alterações estruturais do cromossoma Y, o isocromossoma do braço longo do X 47,XY,+i(X)(q10)43^{43,64}. Habitualmente a SK em mosaico está associada a um fenótipo mais ligeiro que a SK constitucional. Porém, a interpretação deste diagnóstico apresenta dificuldades adicionais, devido à dificuldade em estabelecer a prevalência de cada linha celular em diferentes tecidos e, consequentemente, o fenótipo do indivíduo^{43,58}. As variantes polissómicas da SK apresentam um fenótipo variável mais severo que a forma clássica da patologia²⁷.

O principal mecanismo patofisiológico subjacente à SK é a sobredosagem dos genes do cromossoma X que escapam à inativação do mesmo^{65,66}. Contudo, não são claras as vias moleculares através das quais este efeito se traduz no fenótipo da Síndrome^{63,66}. O único gene das regiões PAR cuja relação genótipo-fenótipo se encontra esclarecida é o “short stature homeobox” (*SHOX*), o qual induz crescimento acelerado em SK e, consequentemente, alta estatura e extremidades alongadas⁶³. Estudos recentes indicam que o fenótipo de SK estará também associado a alterações epigenéticas, da expressão génica e da atividade proteica^{9,63}. Adicionalmente, o recetor de androgénios (*AR*) poderá ter um efeito modulador do fenótipo, explicando assim a variabilidade da apresentação desta patologia^{61,63}.

A infertilidade associada a SK deve-se à degeneração das células germinais e das células de Sertoli que se inicia durante o desenvolvimento embrionário e se agrava após a puberdade. Assim, devido à natureza progressiva da patologia, o sucesso das técnicas de extração e criopreservação de gâmetas reduz-se com a idade dos indivíduos^{4,66}. Na maioria dos casos, os espermatozoides são obtidos por via cirúrgica pelas técnicas TESE ou “microdissection TESE” (mTESE) com taxa de sucesso de cerca de 40 a 50%^{4,67}. Todavia, alguns indivíduos

(~10%) apresentam espermatozoides no ejaculado e a criopreservação é possível a partir deste^{4,65}. Apesar de esta Síndrome ser genética, não é hereditável e os descendentes destes indivíduos são saudáveis, existindo apenas um caso reportado de um feto 47,XXY gerado nestas condições⁹. Assim, os descendentes destes indivíduos serão resultado de espermatozoides normais (23,X ou 23,Y) resultantes de uma linha celular 46,XY nos túbulos seminíferos (mosaicismo gonadal não detetável pelo estudo citogenético em linfócitos) ou por perda do cromossoma X supranumerário no decorrer da espermatogênese⁴⁷.

Síndrome de Jacobs (47,XYY)

A Síndrome de Jacobs é uma aneuploidia dos cromossomas sexuais por ganho de um cromossoma Y⁵⁸. Esta ocorre por não-disjunção do cromossoma Y na meiose II da espermatogénese, ou não-disjunção pós-zigótica associada a mosaicismo de expressão variável^{58,59}. Esta patologia tem frequência de 1/1000 nascimentos^{20,59}. A implicação da Síndrome de Jacobs na fertilidade não é clara, tendo sido reportados tanto casos de normozoospermia, como quadros clínicos de azoospermia^{20,39,47}.

Outras variantes dos cromossomas sexuais

As perturbações do desenvolvimento sexual são um conjunto de patologias descritas como “condições congénitas em que o desenvolvimento do sexo cromossómico, gonadal, e anatómico é atípico”⁶⁸. Neste grupo enquadram-se cromossomopatias associadas à infertilidade masculina: a Síndrome de Klinefelter (discutida previamente), o mosaicismo 45,X/46,XY; o quimerismo 46,XX/46,XY e a reversão sexual 46,XX^{43,68}.

O mosaico 45,X/46,XY é uma condição clínica rara que habitualmente se apresenta fenotipicamente como um indivíduo masculino⁴³. No entanto, e dependendo da localização e do grau de expressão de cada linha celular, esta condição pode manifestar-se como Síndrome de Turner, bem como ambiguidade sexual^{27,43}. O diagnóstico desta condição deve também ter em conta que, com o avançar da idade, algumas células podem perder o cromossoma Y, sem que este evento tenha qualquer efeito no fenótipo⁴³. Os indivíduos que apresentam caracteres sexuais primários masculinos ao nascimento tendem a ter um desenvolvimento pubertário adequado sofrendo, contudo, de infertilidade^{43,69}.

A presença de duas linhas celulares 46,XX/46,XY é indicativa de quimerismo, ou seja, a coexistência de linhas celulares provenientes de zigotos distintos⁴³. Nestes casos, os indivíduos podem ter uma apresentação feminina, masculina ou de ambiguidade sexual. O fenótipo dependerá da distribuição tecidual e grau de expressão de cada linha celular. Na generalidade estes indivíduos são inférteis tendo, no entanto, sido registados casos de concepção espontânea e através de técnicas de PMA^{43,69,70}.

A Síndrome de La Chapelle é caracterizada pela ocorrência de reversão sexual num indivíduo com fenótipo masculino e cariótipo 46,XX⁹. Esta patologia tem frequência de 1/20.000 e ocorre maioritariamente (80-90%) por translocação do gene *SRY* no cromossoma X (46,X,der(X)t(X;Y))⁹. No entanto, existem também casos associados a variantes nos genes da cascata de diferenciação sexual (*SOX9*, *DAX1* e *SOX3*) ou à translocação do *SRY* num autossoma^{43,71}. Estes indivíduos apresentam testículos e órgãos sexuais masculinos, contudo são azoospermicos uma vez que não possuem genes das regiões AZF⁹.

2.2 Grandes Rearranjos Estruturais

As alterações cromossómicas estruturais são anomalias cromossómicas em que a estrutura de um ou mais cromossomas é alterada^{58,59}. Estes rearranjos podem ocorrer de forma equilibrada ou desequilibrada em resultado de quebra, recombinação ou troca do material genético⁵⁸. Neste capítulo serão abordados rearranjos de dimensão superior a 3-5 Mb, os quais são identificáveis pelo estudo do cariótipo⁵⁸.

As alterações cromossómicas equilibradas, geralmente, não têm consequências para o portador, uma vez que não há perda ou ganho de informação genética^{58,59}. Contudo, caso um dos pontos de quebra do rearranjo ocorra num gene funcional, perturbando a sua função, o fenótipo será patológico^{58,59}. No caso das alterações desequilibradas, a perda ou ganho de material genético tem consequências nefastas para o portador, de severidade variável de acordo com o tipo de alteração e a sua extensão^{43,59,59}. Algumas alterações cromossómicas desequilibradas podem ser meiotica- e mitoticamente instáveis, perturbando estes processos e podendo apresentar-se sob a forma de mosaico^{43,58}.

2.2.1 Alterações estruturais equilibradas

Incluem-se no grupo das alterações estruturais equilibradas as translocações, inversões e inserções⁴³. Existem rearranjos recorrentes associados a regiões genómicas instáveis, no entanto, a maioria das alterações cromossómicas equilibradas são não-recorrentes e únicas do indivíduo portador e sua família^{28,43}. Geralmente, estes são rearranjos *de novo* que ocorrem durante mitoses pré-meióticas ou no decorrer da meiose²⁸.

Apesar de estes rearranjos não estarem associados a alterações fenotípicas dos seus portadores, implicam a produção de gâmetas com desequilíbrios do material genético⁵⁸. Efetivamente, a hereditariedade de um dos derivativos da alteração equilibrada resultará na monossomia parcial ou trissomia parcial das regiões envolvidas no rearranjo. Assim, os descendentes serão portadores destas “Copy Number Variants” (CNVs) ou a inviabilidade deste arranjo poderá resultar no aborto espontâneo da gravidez^{58,59}. Efetivamente, as alterações cromossómicas equilibradas são oito vezes mais frequentes em casais que tenham sofrido pelo menos duas perdas gestacionais do que na população em geral⁴³. Deste modo, a ocorrência de abortos de repetição (três ou mais) é indicação clínica para o estudo citogenético do casal^{58,59}.

Translocações

As translocações são rearranjos geralmente equilibrados, podendo ser recíprocas ou robertsonianas⁵⁸. Uma translocação recíproca envolve pelo menos duas quebras em dois cromossomas não-homólogos e troca dos seus fragmentos, mantendo-se o complemento cromossómico de 46^{43,58}. Nas translocações robertsonianas ocorre a fusão dos braços longos dos cromossomas acrocêntricos (13, 14, 15, 21 e 22) a nível do centrómero e perda dos braços curtos, com conseqüente redução do complemento cromossómico para 45⁵⁸.

A meiose e segregação dos gâmetas em portadores de translocações recíprocas segue mecanismos específicos. Deste modo, quando (i) a segregação é alternada os gâmetas produzidos podem ser normais ou portadores equilibrados; (ii) quando a segregação é adjacente são desequilibrados com monossomia e trissomia parciais; (iv) quando a segregação é de 3:1 apresentam monossomia ou trissomia; (v) quando a segregação é 4:0 resultam em nulissomia ou tetrassomia^{43,58}. A percentagem de cada tipo de gâmetas será variável de acordo com a translocação em causa: a sua dimensão, composição da heterocromatina, localização dos pontos de quebra e probabilidade de recombinação^{43,72}.

Relativamente às translocações robertsonianas, os gâmetas produzidos serão normais, ou portadores equilibrados, monossômicos ou trissômicos⁴³. Em ambos os tipos de translocações, os desequilíbrios genômicos decorrentes nos descendentes podem estar associados ao nascimento de uma criança com fenótipo patológico variável ou a perda gestacional recorrente⁴³.

Estes rearranjos cromossômicos podem também estar associados a fenótipos de infertilidade masculina por perturbação do emparelhamento cromossômico durante a meiose e, conseqüentemente, da espermatogênese⁴³. Esta é uma consequência menos comum que a perda gestacional recorrente, contudo não negligenciável. Efetivamente, 0.7% dos homens com quadro clínico de azoospermia ou oligozoospermia severa apresentam translocações recíprocas⁷³. As translocações robertsonianas têm prevalência de 0.8% em homens com alterações quantitativas da espermatogênese, representando um aumento do risco de sete vezes em relação à população em geral^{43,73}. No entanto, esta associação não ocorre em todos os casos, considerando-se que o “background” genético de cada indivíduo possa modular o fenótipo⁴³.

Uma translocação que inclua um cromossoma sexual tem recorrentemente efeito patogênico na capacidade reprodutiva do indivíduo⁴³. A translocação X-autossoma está associada ao bloqueio da espermatogênese devido à perturbação do emparelhamento dos cromossomas sexuais⁴³. As translocações Y-autossoma têm pontos de quebra recorrentes no cromossoma Y (q11.2 ou q12) e manifestam-se também como quadros de infertilidade⁴³. As translocações mais frequentes ocorrem entre o braço longo do cromossoma Y e o braço curto dos cromossomas acrocêntricos, em especial o cromossoma 15⁴³. A patofisiologia associa-se à interrupção na meiose por perturbação da vesícula sexual ou pela perda da região AZF⁴³. Finalmente, as translocações X-Y apresentam-se em rearranjos recorrentes envolvendo os pontos de quebra Xp22.3 e Yq11/q12⁴³. A translocação mais comum é a t(X;Y)(p22.3;q11) com translocação do braço longo do Y para o braço curto do cromossoma X⁴³. Frequentemente, ocorre também a translocação críptica entre porções terminais dos cromossomas, a qual está associada à reversão sexual por translocação do gene *SRY* no cromossoma X⁴³.

Inversões

As inversões são rearranjos intracromossômicos em que um segmento do cromossoma sofre uma inversão da sua orientação. Estas resultam de duas quebras no mesmo braço do

cromossoma numa inversão paracêntrica, ou à ocorrência de uma quebra em cada braço do cromossoma, associando-se a uma inversão pericêntrica, sendo estas últimas mais frequentes^{43,58}. Durante a meiose os cromossomas envolvidos nestes rearranjos têm de formar uma alça de recombinação para que ocorra o emparelhamento das regiões homólogas⁵⁸. Esta estrutura possibilita a recombinação entre os cromossomas, podendo formar-se gâmetas recombinantes. Nas inversões paracêntricas podem obter-se gâmetas normais ou portadores, mas também gâmetas com recombinantes dicêntrico e acêntrico, sendo estes dois últimos muito provavelmente inviáveis^{58,59}. Nas inversões pericêntricas podem formar-se gâmetas portadores da inversão e gâmetas recombinantes com deleções e duplicações dos segmentos distais do cromossoma^{58,59}. Neste último caso, a extensão do desequilíbrio é inversamente proporcional à dimensão da inversão e a sua viabilidade depende do conteúdo génico em desequilíbrio^{43,58}.

Nas inversões paracêntricas o número de gâmetas recombinantes é negligenciável, geralmente estas alterações não têm impacto na fertilidade do portador nem estão associadas à transmissão de desequilíbrios à descendência⁴³. As inversões pericêntricas estão associadas a perturbações reprodutivas essencialmente devido à conceção de embriões portadores de deleções e duplicações de material genético⁴³. Em casos raros, a perturbação da sinapse entre homólogos pode ser responsável pelo distúrbio da meiose, particularmente quando a inversão é de grandes dimensões⁴³.

Inserções

As inserções são um tipo particular de translocação que envolve três quebras, duas no cromossoma “dador” e uma no cromossoma “receptor”⁵⁸. Podem ocorrer entre cromossomas homólogos e não-homólogos e podem ser diretas ou invertidas, consoante a orientação do segmento no local receptor relativamente ao original^{43,58}. Os portadores deste rearranjo produzem 50% de gâmetas desequilibrados, metade dos quais com uma duplicação e os restantes com deleção⁵⁸. A associação destas alterações à infertilidade deve-se à conceção de descendentes portadores de desequilíbrios genómicos⁴³. Este é o rearranjo com maior risco de transmissão de CNVs à descendência, sendo a probabilidade inversamente relacionada com a dimensão do segmento inserido⁴³.

2.2.2 Alterações estruturais desequilibradas

As alterações estruturais desequilibradas incluem as deleções, duplicações, isocromossomas, cromossomas em anel, cromossomas marcadores e cromossomas dicêntricos. Destas, as mais frequentemente associadas à infertilidade masculina são a deleção do braço longo do cromossoma Y e o cromossoma Y isodicêntrico ou pseudoisodicêntrico⁴³.

Deleção terminal do cromossoma Y

As deleções são alterações em que ocorre a perda de um segmento cromossómico. Os mecanismos de formação podem ser o “crossing-over” desigual em homólogos desalinhados; quebra cromossómica seguida da perda do fragmento acentromérico; e transmissão de uma alteração desequilibrada de um portador de um rearranjo equilibrado⁵⁸.

O fenótipo dependerá do ponto de quebra da deleção. A del(Y)(q11) implica a perda de todos os genes AZF e inviabiliza a espermatogénese²⁸. Por outro lado, a del(Y)(q12) não está associada a alterações da capacidade reprodutiva, uma vez que o segmento deletado é composto integralmente por heterocromatina. Esta alteração representa 3% das alterações estruturais do cromossoma Y em homens inférteis⁴³.

Isocromossomas, cromossomas dicêntricos e isodicêntrico

Os cromossomas dicêntricos apresentam dois centrómeros e são resultado da fusão de dois segmentos cromossómicos que contenham centrómeros⁴³. Estes podem ser mitoticamente estáveis se um dos dois centrómeros sofrer inativação, denominando-se pseudodicêntricos. Os isocromossomas apresentam um braço duplicado em espelho e perda do outro braço. Resultam de uma divisão transversal no decorrer da meiose II ou da translocação de um braço entre homólogos^{43,58}. Estas alterações tipicamente são mitoticamente instáveis, predispondo para a perda do cromossoma aberrante e, conseqüentemente, para mosaicismo: 46,X,dic(Y)/45,X ou 46,X,i(Y)/45,X⁴³.

Classifica-se como cromossoma isodicêntrico um isocromossoma que apresente dois centrómeros⁴³. Estes rearranjos estão geralmente associados à infertilidade masculina por sua ocorrência no cromossoma Y. De facto, o cromossoma Y isodicêntrico é a alteração cromossómica estrutural mais comum em contexto de infertilidade masculina, representando 15% a 30% dos rearranjos⁵⁴. Os cromossomas isodicêntricos podem ser

constituídos por dois braços curtos, 46,X,idi(Y)(q), ou dois braços longos 46,X,idi(Y)(p)⁴³. No primeiro caso, os pontos de quebra localizam-se no braço longo e há a duplicação do braço curto com perda parcial ou total das regiões AZF. Os isocromossomas com pontos de quebra no braço curto apresentam duplicação do braço longo e das regiões AZF⁴³. As consequências destes rearranjos no fenótipo são variáveis, desde síndrome Turner, ambiguidade genital, baixa estatura e infertilidade masculina⁴³. A sua patofisiologia resulta da perturbação do emparelhamento e segregação dos homólogos na meiose por perda ou alteração da região PAR1 e/ou estrutura anormal do cromossoma Y. A alteração do conteúdo génico por duplicação e deleção de segmentos, em especial a perda dos genes *SRY*, *SHOX* e aqueles associados à espermatogénese, terá também efeitos nefastos. A severidade do fenótipo está também associada à localização, percentagem e expressão do mosaïcismo^{43,74}.

Cromossomas marcadores

Os cromossomas marcadores são pequenos cromossomas (dimensão igual ou inferior ao cromossoma 20), frequentemente supranumerários ao complemento cromossómico de 46, denominando-se “Small Supernumerary Marker Chromosomes” (sSMC). As consequências fenotípicas destes arranjos dependem da dimensão do cromossoma, o seu conteúdo genético e distribuição tecidual. Em 30% dos casos existe um efeito patogénico^{75,76}.

Relativamente ao seu impacto na fertilidade masculina, estes cromossomas podem perturbar a divisão celular por bloqueio da meiose ou reduzir a eficiência da espermatogénese⁷⁷. Efetivamente, a presença de sSMCs é três vezes mais frequente em indivíduos inférteis do que na população em geral, sendo mais prevalentes em homens⁷⁴. Esta alteração está associada à azoospermia e oligozoospermia⁷⁴. Foram já reportados sSMCs de todos os cromossomas, no entanto os mais habitualmente identificados em homens inférteis são os derivados dos cromossomas 14, 15 e 22⁴³.

Cromossomas em Anel

Estes são cromossomas circulares, geralmente formados por quebras terminais e fusão das extremidades do cromossoma. Podem também ocorrer por fusão das extremidades do cromossoma sem que haja perda de material genético⁴³. A estrutura destes cromossomas dificulta o seu emparelhamento em metafase, predispondo-os a serem perdidos no decorrer das divisões celulares. Assim, os cromossomas em anel estão associados a fenómenos de mosaïcismo com perda do cromossoma em causa^{43,58}.

Os cromossomas em anel podem ocorrer em qualquer cromossoma, e o fenótipo dependerá do conteúdo genético afetado e da estabilidade da estrutura. Em relação ao cromossoma Y em anel, este é habitualmente identificado em mosaicismo 46,X,r(Y)/45,X. A fertilidade poderá ser comprometida por deleção das regiões AZF ou por perturbação da meiose durante o emparelhamento cromossómico⁴³.

2.3 Microdeleções do Cromossoma Y

As microdeleções do cromossoma Y representam a segunda causa mais frequente de infertilidade masculina²⁰. Estas alterações estão associadas a quadros clínicos de azoospermia e oligozoospermia, não sendo verificadas em homens normozoospermicos⁴. Têm frequência de 1/4000 na população geral⁵⁵, 5% nos homens oligozoospermicos e 10% nos homens azoospermicos⁹.

Estas deleções ocorrem nas regiões AZF, maioritariamente *de novo*, eliminando múltiplos genes em simultâneo através de mecanismos recorrentes^{4,9}. A perda destes genes induz a falha espermatogénica, contudo é difícil esclarecer a contribuição de cada gene para o fenótipo visto que a sua deleção ocorre em bloco⁴. É possível, no entanto, associar a deleção das diferentes regiões AZF a fenótipos distintos. Efetivamente, a deleção da AZFa está associada à Síndrome de Células de Sertoli (SCOS), a AZFb à paragem da maturação em meiose e a AZFc à hipoespermatogénese, verificando-se, no entanto, variações fenotípicas em especial entre etnias distintas⁵⁵. Assim, admite-se que os genes de cada região possam estar envolvidos em diferentes fases da espermatogénese: a AZFa à diferenciação das células germinais, a AZFb à maturação do espermátócito primário e a AZFc à diferenciação dos espermatozoides⁴⁰. Existem 5 formas recorrentes destas microdeleções, sendo as mais comuns as da AZFc (65-70%), seguindo-se as deleções que incluem a região AZFb (25-30%) – AZFb, AZFb+c e AZFa+b+c – e, finalmente, as deleções da AZFa (5%)^{4,55}. A Figura 8 ilustra as microdeleções recorrentemente reportadas do braço longo do cromossoma Y⁷⁷.

O estudo destas alterações está previsto pelas diretrizes da EAA e EAU por PCR multiplex através de primers STS não-polimórficos distribuídos por todas as regiões AZF^{4,55}. No entanto, também é possível fazer esta análise por MLPA através de um painel de 43 sondas para todo o cromossoma Y⁵⁸. A pesquisa de microdeleções do cromossoma Y permite o

esclarecimento da etiologia da infertilidade, mas também tem valor prognóstico para a TESE. Efetivamente, deleções totais das regiões AZFa e AZFb são incompatíveis com a produção de espermatozoides e não é possível extraí-los por TESE. O fenótipo associado às deleções da AZFc não é tão severo e a TESE tem taxa de sucesso de cerca de 50%^{4,55}.

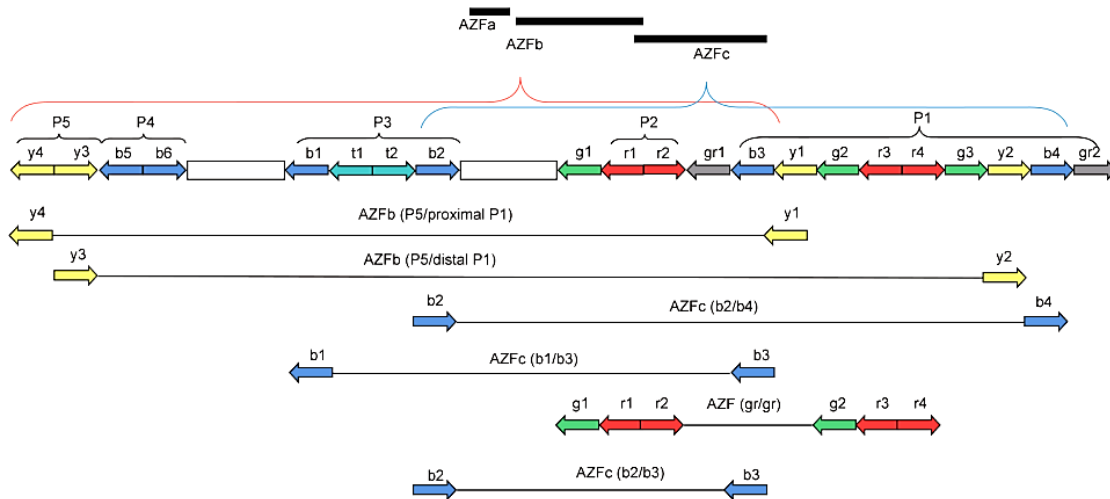


Figura 8: Ilustração esquemática das regiões deletadas em cada uma das microdeleções do cromossoma Y. As famílias amplicónicas são identificadas por cor amarelo (yel); azul (b); turquesa (t); verde (g); vermelho (r) e cinzento (gr). Cada unidade de repetição é identificada por um número e a sua polaridade é indicada pelo sentido da seta. Adaptado de Deng et al., 2023.

2.3.1 AZFa

A microdeleção total da AZFa elimina 792 Kb⁵⁵. A recombinação homóloga das sequências retrovirais HERV15yq1 e HERV15yq2 que flanqueiam esta região é responsável pela microdeleção total da mesma. Atribui-se a esta deleção um fenótipo típico de azoospermia secretora associada a SCOS^{4,55}.

Foram também reportados casos de deleção isolada do gene *USPY9*, as quais estão associadas a um espectro de apresentações distintas, desde SCOS a normozoospermia. Assim, este gene pode atuar como modulador da espermatogénese e será o gene *DDX3Y* o responsável pelo fenótipo da deleção total da AZFa^{4,55}

2.3.2 AZFb

Existem três microdeleções clássicas que incluem a AZFb: a deleção total da região (6.2 Mb) por NAHR entre os palíndromos P5 e P1 proximal; a deleção AZFb+c por recombinação entre

os palíndromos P5 e P1 distal (7.7Mb); e a deleção AZFb+c por recombinação entre os palíndromos P4 e P1 distal (7.0 Mb). Estas deleções estão associadas a um fenótipo de azoospermia secretora associada a paragem da maturação em meiose⁵⁵.

Ocorrem também deleções não recorrentes, as quais não são explicadas por recombinação entre unidades amplicónicas e que apresentam fenótipo variável^{55,56,57}. Em alguns casos estas deleções podem também ser benignas, variando o seu impacto entre grupos étnicos⁵⁵.

2.3.3 AZFc

A região AZFc pode sofrer deleção total (3.5 Mb) por recombinação entre as unidades amplicónicas b2 e b4 dos palíndromos P3 e P1, respectivamente. A deleção parcial gr/gr deve-se à recombinação entre unidades amplicónicas pertencentes aos palíndromos P2 e P1⁵⁵. Foram também já reportadas deleções parciais, AZFc b1/b3 e b2/b3, as quais são consideradas CNVs benignas⁵⁵. As deleções da AZFc podem estar associadas a outras alterações estruturais, podendo ser precedidas por inversões ou predispor para duplicações. No entanto, duplicações que reponham o conteúdo genético deletado não permitem a restituição da normal espermatogénese⁵⁰.

As deleções desta região apresentam um espectro de manifestação clínica desde oligozoospermia a azoospermia associada a diferentes fenótipos histológicos, sendo a apresentação mais comum a de oligozoospermia severa associada a hipospermatogénese⁵⁵. A variação fenotípica poderá estar associada a fatores como o “background” genético e a degeneração progressiva do epitélio germinal⁵⁰. A patogenicidade da deleção gr/gr não é clara, uma vez que, os portadores apresentam fenótipos de infertilidade grave (azoospermia), mas também normozoospermia. A expressão desta alteração é claramente dependente da etnia existindo inclusivamente populações em que a sua presença é fixa⁵⁵.

2.4 Variantes Genéticas de Sequência

Como descrito anteriormente, um elevado número de casos de infertilidade masculina são classificados como idiopáticos⁹. Considera-se que uma percentagem significativa destes se deve a alterações genéticas, em especial quando a infertilidade está associada à perturbação

do processo espermatogénico³⁷. Neste sentido, e acompanhando o desenvolvimento das tecnologias de análise “whole-genome”, têm sido realizados diversos estudos individuais e multicêntricos com o objetivo de identificar e validar genes candidatos associados aos diversos fenótipos de infertilidade masculina⁹. A NGS tem um papel fundamental na identificação de variantes genéticas subjacentes aos fenótipos de infertilidade, em especial relativamente aos defeitos quantitativos da espermatogénese¹¹. Porém, a baixa frequência destas variantes na população inviabiliza a sua testagem em contexto clínico⁷⁸. Efetivamente, existe um número reduzido de patologias cujo diagnóstico é realizado com recurso à pesquisa de variantes em genes. Destas incluem-se a CBVAD associada a variantes no gene *CFTR*, as Síndromes de insensibilidade a androgénios associadas a variantes no gene *AR* e o Hipogonadismo hipogonadotrópico congénito estudado por painel de genes^{4,9}.

De forma a uniformizar o conhecimento adquirido por estes estudos, Houston *et al.* (2021) procederam à validação clínica standardizada de causas monogénicas da infertilidade masculina. Neste estudo foram identificados genes associados a quadros clínicos de infertilidade isolada, infertilidade síndrómica e síndromes do sistema reprodutivo/perturbações endócrinas. Estes genes estão associados a diversos processos desde a espermatogénese, funções celulares ubíquas, desenvolvimento do sistema reprodutor e regulação do sistema endócrino¹⁹.

Entre os genes definitivamente associados a fenótipos de infertilidade masculina destacam-se: *ADGRG2*, *TEX11*, *DPY19L2*, *AURKC*, *DNAH1*, *PLCZ1*, *SUN5*. Variantes do gene *ADGRG2* (Xp22) são responsáveis por 10 a 15% dos casos de CBVAD (OMIM#300985). Variantes do gene *TEX11* (Xq13) explicam alguns casos de azoospermia secretora por bloqueio da meiose (OMIM#309120). O gene *DPY19L2* (12q14) é único gene associado à globozoospermia, uma das formas de teratozoospermia (OMIM#613958). O gene *AURKC* (19q13) está associado a quadros clínicos de teratozoospermia, sendo o único gene candidato para macrozoospermia (OMIM#243060). Variantes do gene *DNAH1* (3p21) estão associadas a cerca de 25% dos casos de MMAF (OMIM#617576). Variantes do gene *PLCZ1* estão associadas à falha de fertilização por incapacidade de ativação do oócito (12p12) (OMIM#617214). Variantes do gene *SUN5* são responsáveis por fenótipos de teratozoospermia por produção de espermatozoides acefálicos (20q11) (OMIM#617187)¹⁹. Não existe, no entanto, um conjunto de genes cujo estudo em rotina diagnóstica seja consensualmente aceite.

Capítulo II

Objetivos

Este trabalho teve como objetivo avaliar o impacto do estudo citogenético e da pesquisa de microdeleções do cromossoma Y no diagnóstico da infertilidade primária masculina. Pretendeu-se determinar a contribuição das tecnologias de citogenética convencional e genética molecular na pesquisa etiológica de casos de infertilidade primária masculina e de patologias a esta associadas.

No âmbito deste estudo foi realizada a análise citogenética em casos de infertilidade primária masculina idiopática; infertilidade primária masculina associada a alterações do espermograma e hipogonadismo. A pesquisa das microdeleções do cromossoma Y por MLPA foi implementada na rotina, para estudo dos quadros clínicos de azoospermia secretora, oligozoospermia e OAT, quando solicitada pelo clínico. O esclarecimento das alterações identificadas por estas tecnologias foi realizado, quando necessário, pela técnica de FISH.

A citogenética convencional, MLPA e FISH, foram realizadas no Laboratório de Citogenética do Serviço de Genética Médica do CHUC, participando na realização das metodologias.

Deste modo, propõe-se neste projeto:

- Avaliar e comparar o potencial diagnóstico das tecnologias de citogenética convencional e de genética molecular;
- Interpretar os resultados obtidos e associá-los aos mecanismos biológicos subjacentes, estabelecendo assim a relação genótipo-fenótipo;
- Avaliar a eficácia da técnica de MLPA na pesquisa de microdeleções do cromossoma Y e identificar as vantagens e desvantagens da aplicação desta técnica no estudo de rotina de casos de infertilidade masculina associada a alterações do espermograma;
- Definir uma estratégia de diagnóstico para casos de infertilidade masculina primária associada a alterações do espermograma, integrando o estudo citogenético e molecular.

Capítulo III

Materiais e Métodos

1. Desenho Experimental

Este estudo foi realizado em contexto de diagnóstico clínico do Laboratório de Citogenética do Serviço de Genética Médica do Centro Hospitalar e Universitário de Coimbra (CHUC). O projeto compreendeu duas fases, a primeira de caracterização do papel da citogenética convencional no diagnóstico da população em estudo e a segunda de integração do estudo genético molecular na estratégia diagnóstica dos casos de infertilidade primária masculina. Deste modo, foi realizado o levantamento retrospectivo dos quadros clínicos de infertilidade primária masculina idiopática; infertilidade primária masculina associada a alterações do espermograma e/ou hipogonadismo estudados por citogenética convencional entre janeiro e agosto de 2022. A avaliação destes casos permitiu estabelecer que quadros clínicos associados à infertilidade primária masculina são referenciados para estudo citogenético e a taxa de diagnóstico desta metodologia.

Na fase experimental, de setembro de 2022 a maio de 2023, os casos clínicos foram referenciados ao Laboratório de Citogenética pelos Serviços de Urologia e Transplantação Renal; Reprodução Humana; Genética Médica; e Endocrinologia, Diabetes e Metabolismo do CHUC. O grupo de estudo incluiu indivíduos do sexo masculino, maiores de idade diagnosticados com infertilidade primária. Os casos foram enquadrados em um de três grupos de estudo de acordo com a indicação clínica associada e estudos genéticos prescritos pelo clínico:

Grupo I. Infertilidade primária idiopática com estudo citogenético;

Grupo II. Infertilidade primária associada a alterações do espermograma com estudo citogenético;

Grupo III. Infertilidade primária associada a alterações do espermograma com estudo citogenético e genético molecular (MLPA);

No grupo III foi implementada a pesquisa de microdeleções do cromossoma Y por MLPA em paralelo com o estudo citogenético. Deste modo, foi possível alargar a investigação etiológica e, assim, complementar o diagnóstico genético.

2. Citogenética

2.1 Citogenética Convencional

A citogenética tem como objeto de estudo do complemento cromossômico, a sua estrutura e hereditariedade. As preparações de citogenética convencional permitem a observação direta de todo o complemento cromossômico. Deste modo, é possível realizar uma avaliação abrangente para detecção de alterações equilibradas e desequilibradas, de dimensão igual ou superior a 3 a 5 Mb.

As amostras de sangue periférico recebidas no Laboratório de Citogenética são colhidas em heparina de sódio. As amostras são acompanhadas da informação clínica relevante para as análises solicitadas. É realizado um registo interno do Laboratório, após confirmação das condições da colheita e informação clínica, em que é atribuído um número interno.

São estabelecidas duas culturas celulares independentes de linfócitos T de cada amostra, uma de cada tubo de sangue, tal como descrito pela *European Cytogeneticists Association*⁷⁹. Na câmara de fluxo laminar, em condições de assepsia, foram adicionados 500µL de sangue periférico a tubos com 5ml de meio de cultura completo PB-MAX™ (Gibco™), o qual contém soro bovino fetal (FBS, Gibco™), L-glutamina e fitohemaglutinina (Gibco™). Os tubos foram homogeneizados e incubados a 37°C com uma inclinação de 45° durante 72 horas.

Após a incubação, procedeu-se à sincronização do ciclo celular por bloqueio das células na fase S do ciclo celular através da adição de 10 µM de metotrexato de uma solução stock de 10⁻⁷ M a cada tubo. Os tubos foram homogeneizados e incubados a 37°C com inclinação de 45° durante 17 horas. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 1200 rpm, possibilitando a remoção do sobrenadante com metotrexato e, conseqüentemente, removendo o seu efeito de bloqueio do ciclo celular. Foi renovado o meio de cultura por adição de 5ml de meio RPMI 1640 (Gibco™) a cada tubo, suplementado com 10% de FBS e 1% de solução de penicilina e estreptomicina (Gibco™). De seguida, foram adicionados a cada tubo 1 mM de timidina de uma solução stock de 10⁻⁵ M, a qual permite retomar o ciclo celular. Os tubos foram homogeneizados e incubados a 37°C com inclinação de 45° durante 5 horas.

Para obter o máximo número possível de células em metafase, foram adicionados 50µl de Colcemid™ (Gibco™) de uma solução stock de 0.05 µg/ml. A colcemida impossibilita a formação do fuso acromático, bloqueando o ciclo celular em metafase. Os tubos foram homogeneizados e incubados a 37°C com inclinação de 45° durante 10 minutos. De seguida, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 1200 rpm e foi removido o sobrenadante. A cada tubo foram adicionados 5mL de solução hipotónica de cloreto de potássio (KCl) a 37°C, induzindo um choque hipotónico das células e consequente aumento do seu volume e dispersão dos cromossomas. Os tubos foram homogeneizados e incubados a 37°C com inclinação de 45° durante 25 minutos. As amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 1200 rpm e foi removido o sobrenadante.

Para preservação da estrutura e morfologia dos cromossomas foram realizadas três fixações das células com uma solução de metanol e ácido acético na proporção de 3:1 (fixador) a -20°C. Na primeira fixação, foram adicionados 4mL de fixador sob agitação contínua no vortex. De seguida, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 1200 rpm e foi removido o sobrenadante, o pellet foi ressuscitado em 4mL de fixador e as amostras foram mantidas a 4°C durante 20 minutos. Finalmente, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 1200 rpm e foi removido o sobrenadante. Realizou-se uma última fixação com a ressuspensão do pellet em 4mL de fixador. As amostras foram conservadas a 4°C até se proceder ao espalhamento.

Para as metafases serem observadas ao microscópio foram preparadas lâminas com espalhamento dos sedimentos celulares e os cromossomas bandados de modo a evidenciar o seu padrão de bandas específico. Para o espalhamento, as amostras foram centrifugadas durante 10 minutos a 1200 rpm e foi removido o sobrenadante até perfazer 1 a 2mL de volume, de acordo com o índice mitótico de cada cultura. O espalhamento foi realizado numa câmara de espalhamento sob condições controladas de temperatura (21°C) e humidade (54%), otimizando a dispersão e estrutura das metafases obtidas. O espalhamento foi avaliado por observação das lâminas ao microscópio de contraste de fase, pretendendo-se obter metafases individualizadas e com cromossomas com o mínimo de sobreposições. A concentração da suspensão celular e o espalhamento foram otimizados de acordo com a avaliação preliminar das lâminas. Geralmente, e dependendo da indicação clínica de cada caso, foram espalhadas quatro lâminas de cada uma das culturas celulares. Após o

espalhamento as lâminas foram envelhecidas: a 80°C durante 4 horas para bandagem G e a 80°C durante 3 horas para bandagem C. As lâminas para bandagem C foram conservadas a -20°C até à bandagem.

A bandagem GTL (Bandagem G por tripsina e leishman) tem como objetivo a produção de um padrão de bandas característico de cada cromossoma por um processo de digestão e coloração diferencial das regiões eucromáticas e heterocromáticas. Deste modo, as regiões heterocromáticas apresentam coloração escura (G positivas) e as regiões eucromáticas apresentam coloração clara (G negativas). A bandagem incluiu a incubação das lâminas numa solução de tripsina (37°C), seguida da lavagem sequencial numa solução de cloreto de sódio (NaCl; 37°C) e em tampão gürr (37°C). Posteriormente, as lâminas foram incubadas à temperatura ambiente em corante de leishman e lavadas sequencialmente em tampão gürr (37°C) e água destilada (37°C). O protocolo de bandagem requer a otimização dos tempos de incubação para cada cultura celular por avaliação da bandagem ao microscópio óptico.

O estudo da estrutura do cromossoma Y é facilitado pela marcação seletiva do centrómero e região polimórfica Yq12, regiões evidenciadas pela bandagem CBG (Bandagem C por bário e giemsa) que cora seletivamente a heterocromatina constitutiva. Esta bandagem foi obtida pela incubação das lâminas em ácido clorídrico (HCl) durante 10 minutos e lavagem em água destilada. De seguida, foram incubadas durante 35 segundos numa solução de hidróxido de bário (BaOH₂) a 40°C e lavadas em água destilada. As lâminas foram reincubadas numa solução de 2xSSC a 60°C durante uma hora. Finalmente, as lâminas foram coradas numa solução de giemsa durante 15 minutos e lavadas em tampão gürr.

A análise de citogenética convencional é realizada ao microscópio óptico pela contagem, captura e análise das metafases obtidas. O estudo citogenético consistiu na contagem do complemento cromossómico em 15 a 20 metafases, captura de metafases de alta resolução (700 a 850 bandas) e construção dos respectivos kariogramas e análise da estrutura, morfologia e padrão de bandas dos cromossomas no sistema informático Cytovision®. O estudo da estrutura dos cromossomas foi realizado a cada par de homólogos em pelo menos duas metafases, analisando-se os braços curtos, braços longos, regiões centroméricas e teloméricas. O resultado da análise citogenética foi reportado seguindo as regras do International System of Chromosome Nomenclature 2020 (ISCN 2020).

A citogenética tem como objeto de estudo os cromossomas, a sua estrutura e hereditariedade. Nesta análise são avaliadas alterações do número, morfologia e estrutura dos cromossomas. Efetivamente, os cromossomas são classificados segundo vários parâmetros: o seu tamanho, posição do centrómero e padrão de bandas. Quanto ao centrómero, este tem uma posição central em cromossomas metacêntricos, os quais apresentam dois braços de igual dimensão; terminal em cromossomas acrocêntricos; e encontra-se numa posição intermédia em cromossomas submetacêntricos, com braços de dimensões distintas. O padrão de bandas característico de cada cromossoma permite o estudo comparativo do par. Nesta análise procura-se identificar alterações da dimensão, coloração e posição das bandas e centrómero indicativas de um rearranjo cromossómico. O normal complemento cromossómico masculino 46,XY encontra-se representado na Figura 9.

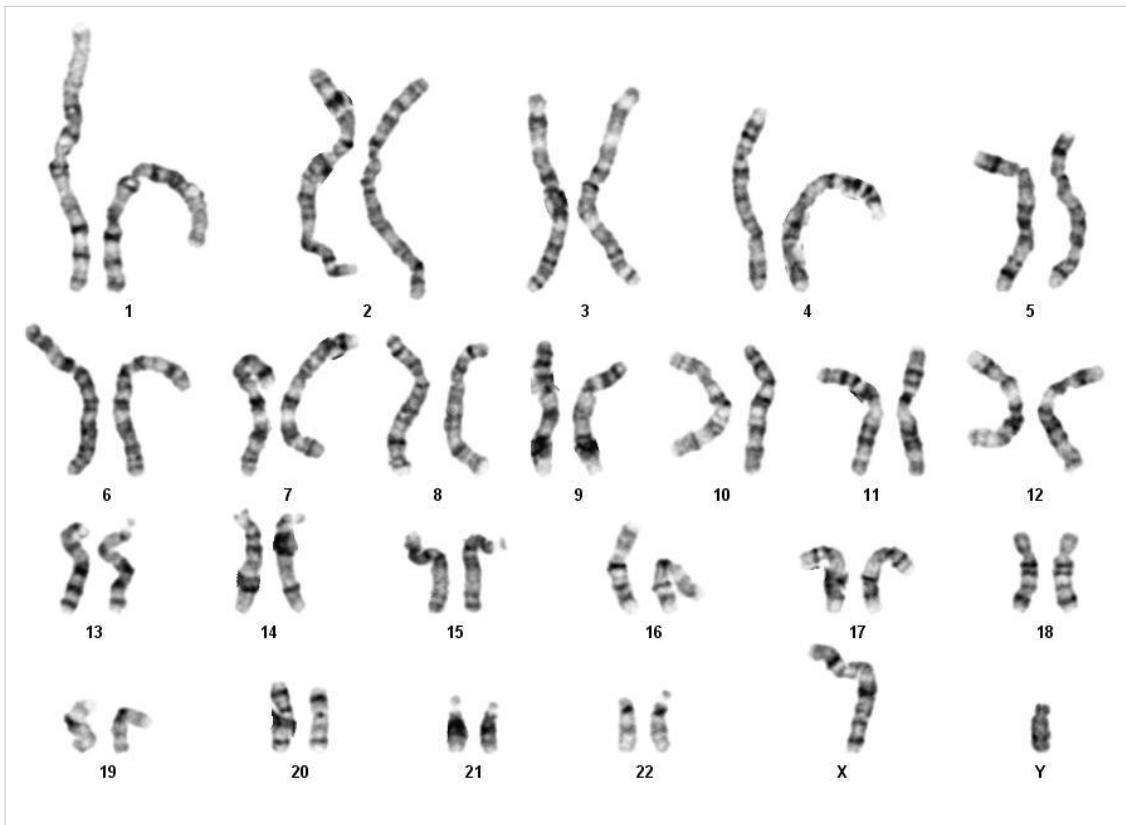


Figura 9: Cariograma de um indivíduo do sexo masculino com cariótipo 46,XY [ISCN 2020] por bandagem GTL (Laboratório de Citogenética do Serviço de Genética do Hospital Pediátrico de Coimbra).

Pela bandagem CBG é possível observar a marcação específica do centrómero e da zona heterocromática distal do braço longo do cromossoma Y, permitindo identificar rearranjos da sua estrutura como evidenciado na Figura 10.



Figura 10: Bandagem CBG de um indivíduo do sexo masculino 46,XY [ISCN 2020] evidenciando-se a marcação do cromossoma Y (Laboratório de Citogenética do Serviço de Genética do Hospital Pediátrico de Coimbra).

2.2 Citogenética Molecular

O estudo Citogenético Molecular por FISH é aplicado no âmbito da infertilidade masculina para identificação e caracterização de alterações cromossómicas estruturais, em especial no cromossoma Y. Esta técnica apresenta uma resolução superior à da citogenética convencional, permitindo esclarecer rearranjos estruturais e pesquisar a presença e localização do gene *SRY*. Sendo esta uma técnica dirigida, o seu sucesso depende da correta indicação clínica e análise do cariótipo. Assim, recorreu-se à técnica de FISH para caracterizar alterações estruturais no cromossoma Y detetadas por citogenética convencional.

Para o estudo por FISH são necessárias preparações em lâmina de linfócitos T, produzidas pelo mesmo método que as destinadas ao estudo de citogenética convencional. As lâminas foram envelhecidas à temperatura ambiente durante a 12 horas e conservadas a -20°C . Foi realizado um pré-tratamento para preservação da estrutura dos cromossomas e otimizar a

hibridização das sondas. Deste modo, as lâminas foram incubadas em 2xSSC a 37°C durante 10 minutos e posteriormente submetidas a uma desidratação progressiva por lavagens sucessivas em soluções de etanol a 70%, 85% e 100% durante 2 minutos.

Foi utilizada uma mix de sondas para hibridização de diferentes alvos: uma sonda *locus* específica para marcação do *SRY*; sondas repetitivas para a região centromérica do cromossoma X e, em alguns casos, sondas repetitivas para a Yq12 (CytoTest® e Cytocell® OGT, respectivamente). Para a hibridização, foram selecionadas regiões das lâminas com elevada concentração de metáfases para a adição de 1.5µL de mix de sondas. As regiões hibridizadas foram seladas com lamela e as lâminas foram colocadas em placa de aquecimento a 74°C durante 2 minutos para co-desnaturação dos cromossomas e sondas aplicadas. As lâminas foram mantidas numa câmara de hibridização húmida a 37°C durante 16 horas permitindo a marcação total das regiões cromossómicas em estudo.

A lamela foi retirada e as lâminas foram lavadas em 0.4xSSC a 70°C durante 2 minutos e em 2xSSC durante 1 minuto, de modo a remover as sondas não hibridizadas e as hibridizadas inespecificamente. De seguida foram adicionados 8µL de corante de contraste (DAPI) a cada área hibridizada e foi colocada uma lamela sobre as regiões a observar. As lâminas foram incubadas durante 30 minutos a 4°C e observadas ao microscópio de fluorescência, sendo registados os sinais de hibridização visualizados.

3. Genética Molecular

3.1 Extração de DNA

As amostras de sangue periférico para estudos moleculares são colhidas em EDTA. As amostras estão associadas à informação clínica do utente na base de dados do CHUC. Adicionalmente, é realizado um registo interno do Laboratório em que é atribuído um número interno à amostra (CGM).

Foi utilizado o kit QIAamp® DNA Blood Midi (Qiagen) para a extração de DNA pelo “Spin Protocol”. Foram adicionados 200µl de proteínase K a tubos cónicos de 10mL e de seguida adicionados 2000µl de sangue periférico e homogeneizada a solução. Posteriormente, foram

adicionados 2400µl de buffer AL e os tubos vortexados durante 1 minuto, permitindo a lise das células de toda a amostra. As amostras foram incubadas durante 10 minutos a 70°C para otimizar a lise celular. Foram adicionados 2000µl de etanol a 99.9% e homogeneizada a amostra. A solução foi transferida para a coluna e centrifugada a 3000 rpm durante 3 minutos. O filtrado foi descartado e foram adicionados 2000µl de buffer de lavagem AW1 e as amostras centrifugadas a 5000 rpm durante 1 minuto. De seguida, foram adicionados 2000µl de buffer de lavagem AW2 e as amostras centrifugadas a 5000 rpm durante 15 minutos. O filtrado foi descartado e as colunas foram colocadas em tubos novos. Adicionaram-se 300µl de tampão de eluição AE e as amostras foram incubadas à temperatura ambiente durante 5 minutos e posteriormente centrifugadas a 5000 rpm durante 2 minutos. De modo a obter a máxima concentração possível de DNA, o eluído foi re-adicionado à coluna e incubado à temperatura ambiente durante 5 minutos. As amostras foram novamente centrifugadas a 5000 rpm durante 2 minutos e o eluído foi armazenado num tubo eppendorf a -20°C. O DNA extraído foi quantificado por espectrofotometria por medição da absorvância a 260nm (A_{260}). Através da relação A_{260}/A_{280} foi também possível avaliar o grau de pureza do DNA, devendo aproximar-se de 1.8.

3.2 Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA)

O MLPA é uma técnica semi-quantitativa não automatizada baseada em PCR multiplex para determinação do número relativo de cópias de múltiplas sequências numa só reação. A aferição do número de cópias de cada região genética é possível pela análise comparativa com amostras referência de indivíduos saudáveis. Esta técnica é aplicada no âmbito da infertilidade masculina para identificação e caracterização de alterações cromossómicas estruturais do cromossoma Y, em especial microdeleções do seu braço longo. O painel de sondas de análise de microdeleções do cromossoma Y (P360-B2) inclui uma sonda para o gene *SRY*, 42 sondas para as regiões AZF, 12 sondas de referência para regiões autossómicas e nove sondas de controlo de qualidade. A técnica foi realizada seguindo o protocolo do fabricante (MRCHolland).

A técnica de MLPA consiste em três fases: desnaturação e hibridação do DNA e sondas; ligação das hemi-sondas e reação de PCR. Primeiramente, o DNA foi diluído em água

“nuclease free no-DEPC”, obtendo-se 5µL de solução de concentração de 30ng de DNA/µL. Foram também preparadas três amostras referência de indivíduos saudáveis e um controle negativo. As amostras foram desnaturadas a 98°C durante 10 minutos. A 25°C foram adicionados 3µL de mix de hibridação, constituída por buffer de MLPA e mix de sondas numa proporção de 50:50. As amostras foram incubadas a 95°C durante 1 minuto e de seguida a 60°C durante 16 horas, permitindo a hibridação das sondas às regiões-alvo.

A reação de ligação permite a ligação das hemi-sondas totalmente hibridadas às regiões-alvo através da atividade de uma ligase. Foi preparada a mix para a reação de ligação, constituída por 25µL de água “nuclease free no-DEPC”, 3µL de ligase buffer A, 3µL de ligase buffer e 1µL ligase-65, por reação. A 54°C, no termociclador, foram adicionados 32µL da mix a cada reação. As reações foram incubadas a 54°C durante 15 minutos e seguidamente mantidas a 98°C.

Na reação de PCR são amplificadas todas as sondas ligadas, visto serem as únicas contendo os primers forward e reverse. Foi preparada a mix respectiva, constituída por 7.5µL de água “nuclease free no-DEPC”, 2µL de mix de primers e 0.5µL de polimerase, por reação. Foram adicionados 10µL da mix a cada amostra à temperatura ambiente. Foi seguido o protocolo de PCR de 35 ciclos: desnaturação a 95°C durante 30 segundos, hibridação dos primers a 60°C durante 30 segundos e extensão a 72°C durante 60 segundos. Finalmente, foi realizada a extensão final a 72°C durante 20 minutos.

A reação de MLPA resulta num conjunto de fragmentos de DNA (sondas amplificadas) de diferentes dimensões que podem ser separados por eletroforese capilar. Deste modo, cada amostra foi analisada preparando uma mix de 0.2µL de 500 LIZ™ (GeneScan™) e 9.5µL de formamida por amostra, à qual foram adicionados 0.75µL de reação de MLPA. As amostras foram desnaturadas a 95°C durante 5 minutos e posteriormente analisada pelo equipamento de eletroforese capilar 3130 Genetic Analyser (Applied Biosystems™).

A marcação fluorescente das sondas permite a sua diferenciação pela dimensão da sequência “stuffer” contida em cada sonda. A quantificação da fluorescência das sondas resulta num eletroferograma, característico de cada amostra, em que cada pico corresponde a uma das sondas amplificadas. A área dos picos de fluorescência de cada sonda é comparada à média dos picos obtidos nas amostras referência. Calcula-se o rácio (R) entre as áreas dos picos, o

qual se traduz na quantidade relativa de cópias de cada região genética em estudo. A deleção de uma sequência é identificada por um $R \leq 0.7$ e presença de duplicações é determinada por $R \geq 1.3$. A análise de resultados foi realizada pelo software Coffalyser.Net™ que calcula os rácios de forma automática e realiza a análise de controlo de qualidade dos nove picos controlo.

Capítulo IV

Resultados

1. Estudo Retrospectivo

Para a análise retrospectiva o grupo selecionado de casos correspondeu a um período de oito meses, envolvendo 53 casos clínicos de infertilidade masculina. Apenas um dos casos corresponde a um utente menor de idade, sendo os restantes adultos com idade média de 37.2 anos. A distribuição dos casos por faixa etária encontra-se representada na Figura 11.

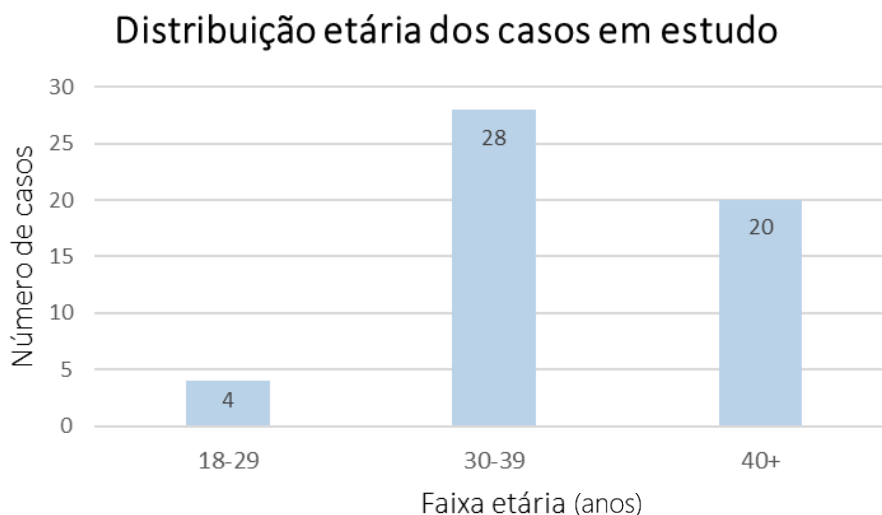


Figura 11: Distribuição dos casos analisados do estudo retrospectivo (n=53) por faixa etária.

Dos casos analisados neste estudo, 52.8% foram referenciados por infertilidade primária associada a alterações do espermograma; 41.5% foram referenciados por infertilidade primária idiopática; e 5.7% dos casos foram referenciados por hipogonadismo. Dos casos de infertilidade primária associada a alterações do espermograma, 82.1% eram azoospermicos e 17.9% eram oligoastenoteratozoospermicos. A distribuição dos casos em estudo por indicação clínica encontra-se representada na Figura 12.

Deste modo, pela análise da indicação clínica pela qual os utentes foram referenciados, verificou-se que os indivíduos são maioritariamente referenciados por um de três fenótipos: infertilidade primária masculina idiopática; infertilidade primária masculina associada a alterações do espermograma e hipogonadismo.

O estudo citogenético resultou na identificação de alterações cromossómicas em seis casos, traduzindo-se numa taxa diagnóstica de 11.3%. Todos estes indivíduos apresentam perturbação

da espermatogénese, estando um dos casos concomitantemente associado a hipogonadismo. Foram identificados dois casos de alterações cromossómicas estruturais e quatro de aneuploidias. As alterações identificadas em resultado deste estudo encontram-se descritas na Tabela 1.

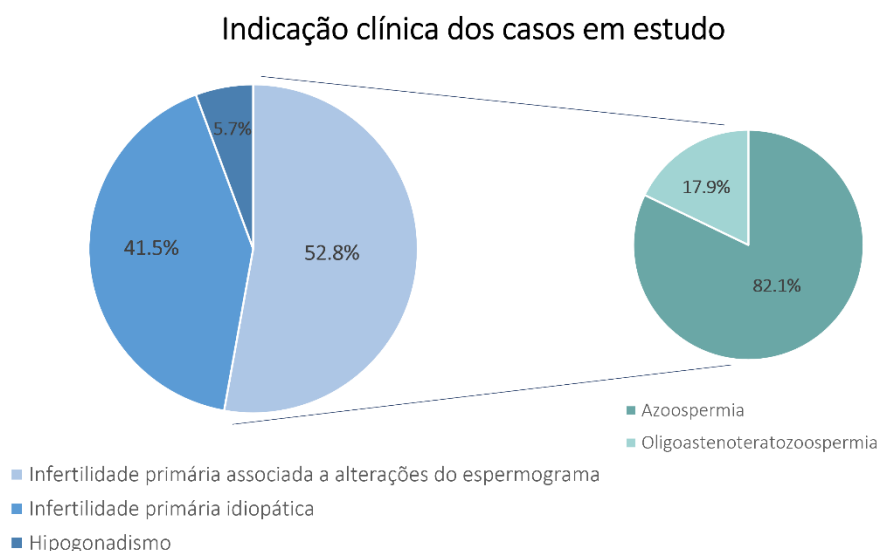


Figura 12: Distribuição dos casos analisados de acordo com a informação clínica de cada utente: infertilidade primária associada a alterações do espermograma (n=28); infertilidade primária idiopática (n=22) e hipogonadismo (n=3). A infertilidade primária associada a alterações do espermograma foi subclasseificada em casos de azoospermia (n=23) e oligoastenoteratozoospermia (n=5).

Adicionalmente, um dos utentes referenciado por infertilidade primária e azoospermia, foi diagnosticado com Síndrome de DiGeorge por MLPA (rsa 22q11.21(CLTCL1,HIRA,CDC45L,CLDN5,GP1BB,TBX1,TXNRD2,DGCR8,ZNF74,KLHL22,MED15,SNAP29,LZTR1)x1). Sendo este um fenótipo que excede o âmbito deste trabalho, este resultado não será incluído na discussão dos resultados.

Relativamente às alterações estruturais, foi identificado um caso de cromossoma Y isodicêntrico, posteriormente caracterizado com recurso à FISH, 46,X, idic(Y)(q12). ish idic(Y)(SRY++,DYZ1+) (Figuras 13 e 14).

Adicionalmente, foi identificado um caso de reversão sexual, 46,XX. O estudo por FISH permitiu concluir que a reversão sexual não se deveu à translocação do *SRY*, visto que este gene não estava presente em nenhum dos cromossomas (Figuras 15 e 16). Por MLPA foi possível concluir que não existia material do cromossoma Y no seu genoma (rsa(P360-B2)x0).

Tabela 1: Quadro resumo dos casos com alterações cromossômicas identificadas por citogenética convencional (n=6), idade do indivíduo, indicação clínica e resultado do estudo de acordo com as normas do ISCN 2020.

Caso	Idade (anos)	Indicação clínica	Alteração identificada
A2	34	Infertilidade primária; Azoospermia	46,X,idic(Y)(q12).ish idic(Y)(SRY++,DYZ1+)
A3	32	Infertilidade primária; Azoospermia; Atrofia testicular bilateral sem massas palpáveis	46,XX
A4	31	Infertilidade primária; Azoospermia	47,XXY
A5	37	Infertilidade primária; Azoospermia	47,XXY
A6	35	Infertilidade primária; Azoospermia	mos 47,XXY[28]/46,XY[2]
A7	47	Azoospermia; Hipogonadismo; Suspeita de S. Klinefelter	47,XXY



Figura 13: Cariograma do caso A2 por bandagem GTL verificando-se a existência de um cromossoma Y isodicêntrico. Trata-se de um caso de um indivíduo do sexo masculino com cariótipo 46,X, idic(Y)(q12) [ISCN 2020].

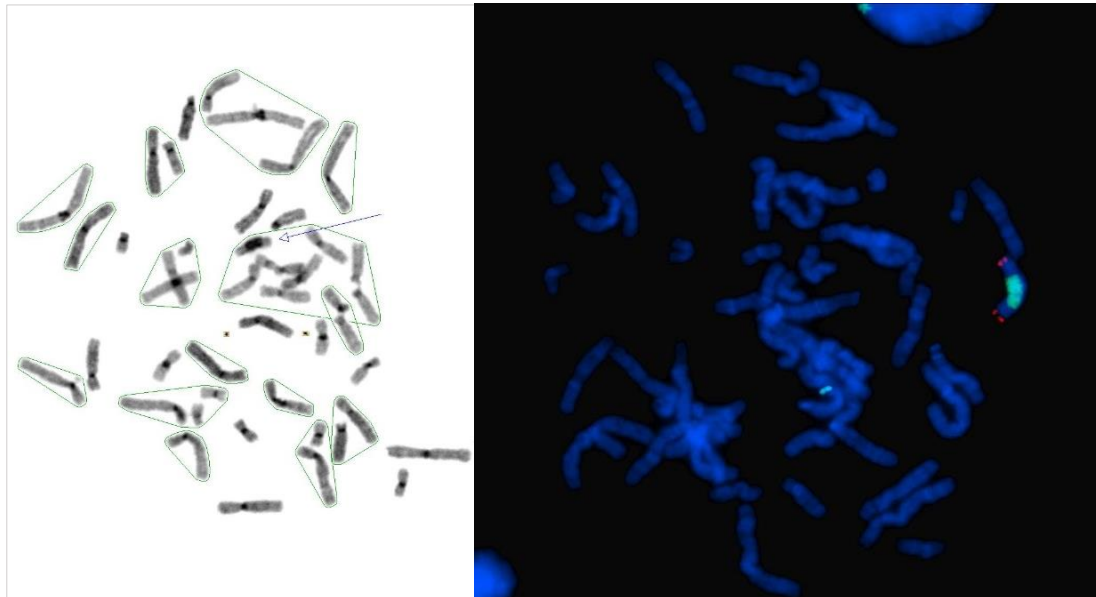


Figura 14: Estudos complementares para caracterização do cromossoma Y isodicêntrico por bandagem CBG (esquerda) e FISH (direita) no caso A3. A bandagem CBG permite avaliar a estrutura do cromossoma Y, identificar o centrômero e a região Yq12. Verifica-se a estrutura em espelho do cromossoma, e a duplicação de todo o braço curto e grande parte do braço longo. A análise por FISH incluiu sondas para o gene SRY (Yq11.31) (vermelho), para a região heterocromática do braço longo (Yq12) (verde) e para a região centromérica do cromossoma X (Xp11.1q11.1) (azul) (Cytocell®, OGT). Verificou-se que se trata de um idic(Y)(q) com pontos de quebra no braço longo, duplicação dos braços curtos e SRY.

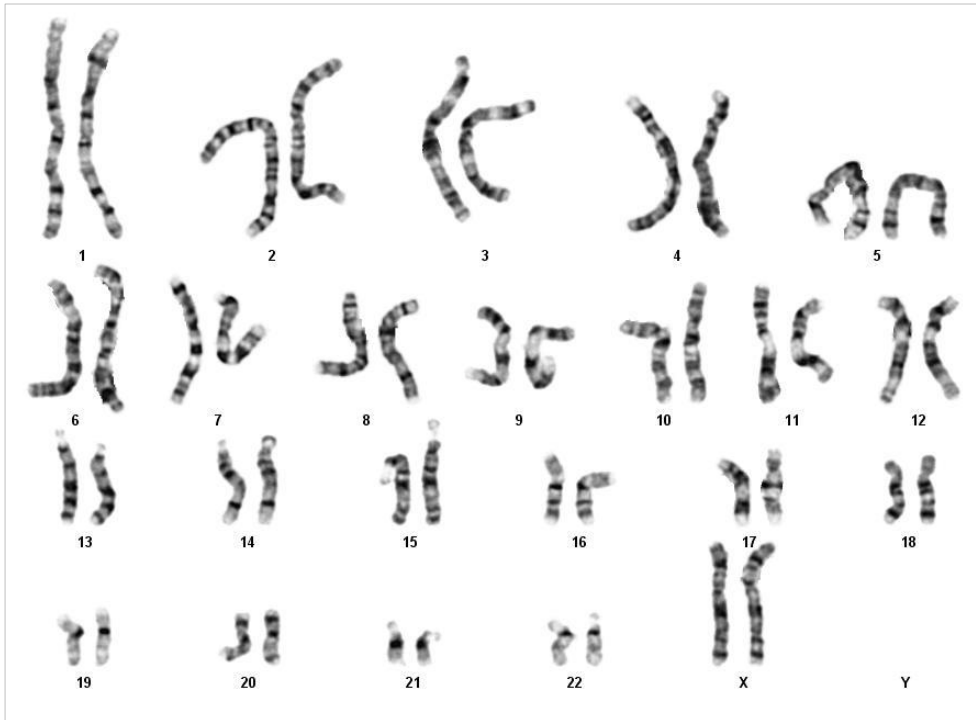


Figura 15: Cariograma do caso A3 por bandagem GTL verificando-se a existência de um complemento cromossômico 46,XX [ISCN 2020].

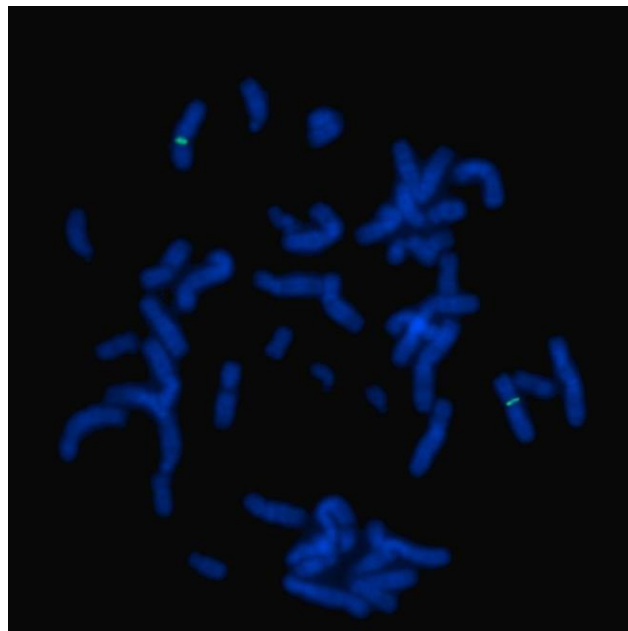


Figura 16: Estudo por FISH para pesquisa do gene SRY no caso A3. Foram utilizadas sondas para o SRY (Yp11.31) e sondas controle para a região centromérica do cromossoma X (Xp22.3) (CytoTest®). É possível observar a marcação centromérica de dois cromossomas X e a ausência de marcação do SRY.

As alterações numéricas identificadas envolveram apenas os cromossomas sexuais. Três dos casos foram diagnosticados como Síndrome de Klinefelter 47,XXY (Figura 17). Num dos casos, foi identificado um caso de Síndrome de Klinefelter em mosaico: mos 47,XXY[28]/46,XY[2].



Figura 17: Cariograma de um indivíduo com Síndrome de Klinefelter (caso A3) por bandagem GTL. Indivíduo do sexo masculino com cariótipo 47,XXY [ISCN 2020]

2. Estudo Citogenético e Genético Molecular

A implementação da técnica de MLPA permitiu alargar a pesquisa etiológica nos casos de infertilidade primária associada a alterações do espermograma. Assim, o diagnóstico genético molecular foi realizado em paralelo com o estudo citogenético quando assim requisitado pelo clínico. Os restantes casos foram estudados seguindo as metodologias aplicadas no estudo retrospectivo. A idade média dos utentes foi de 36.3 anos. A distribuição dos casos por faixa etária encontra-se representada na Figura 18.

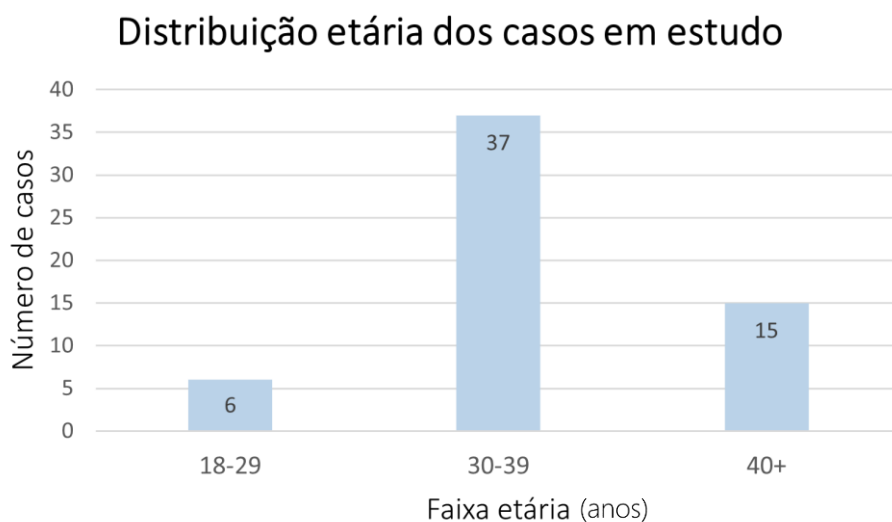


Figura 18: Distribuição dos casos analisados na fase experimental (n=58) por faixa etária.

No decorrer deste estudo, correspondente a um período de nove meses, foram analisados 58 casos de infertilidade primária masculina. Destes, 48.3% foram referenciados por infertilidade primária associada a alterações do espermograma; 46.6% foram referenciados por infertilidade primária idiopática; 3.4% dos casos foram referenciados por hipogonadismo e 1.7% referenciadoa por anejaculação. Relativamente aos casos associados a alterações do espermograma, 50% eram azoospérmicos, 39% oligoastenoteratozoospérmicos e 11% oligozoospérmicos. A distribuição dos casos em estudo por indicação clínica encontra-se representada na Figura 19.

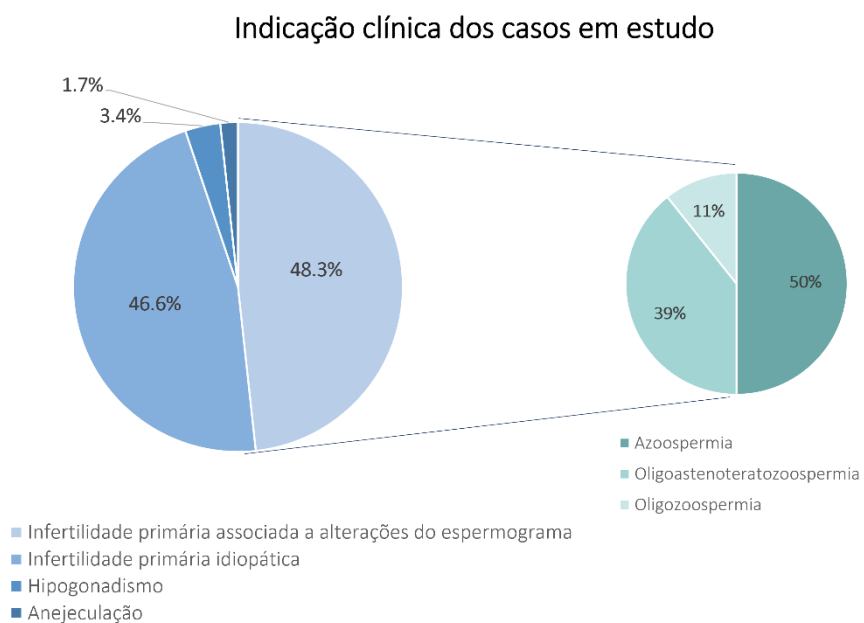


Figura 19: Distribuição dos casos analisados de acordo com a informação clínica de cada utente: infertilidade primária associada a alterações do espermograma (n=28); infertilidade primária idiopática (n=27); hipogonadismo (n=2) e anejaculação (n=1). A infertilidade primária associada a alterações do espermograma foi subclassificada em casos de azoospermia (n=14), oligoastenoteratozoospermia (n=11) e oligozoospermia (n=3).

Os casos clínicos referenciados ao Laboratório de Citogenética foram enquadrados em um de três grupos de estudo de acordo com a indicação clínica e estudos genéticos prescritos:

- Grupo I. Infertilidade primária idiopática com estudo citogenético – 28 casos
- Grupo II. Infertilidade primária associada a alterações do espermograma com estudo citogenético – 15 casos
- Grupo III. Infertilidade primária associada a alterações do espermograma com estudo citogenético e genético molecular (MLPA) – 15 casos

O estudo citogenético convencional permitiu identificar cinco cromossomopatias: dois casos de alterações cromossômicas estruturais e três casos de aneuploidia. Relativamente às alterações estruturais, foi identificada uma deleção do braço longo do cromossoma Y, posteriormente caracterizada por FISH: 46,X,del(Y)(q11.2).ish del(Y)(SRY+) (Figuras 20 e 21). Foi também identificada uma translocação aparentemente equilibrada entre os cromossomas 13 e 14, 45,XY,der(13;14)(q10;q10) (Figura 22). As alterações identificadas em resultado deste estudo encontram-se descritas na Tabela 2.

Tabela 2: Quadro resumo dos casos com alterações cromossômicas identificadas por citogenética convencional (n=5), idade do indivíduo, indicação clínica e resultado do estudo de acordo com as normas do ISCN 2020.

<i>Caso</i>	<i>Idade (anos)</i>	<i>Indicação clínica</i>	<i>Alteração identificada</i>
B1	43	Infertilidade primária	mos 47,XXY[37]/46,XY[3]
B2	42	Infertilidade primária; Azoospermia	mos 47,XYY[2]/47,XXY[1]/46,XY[47]
B3	37	Infertilidade primária; Azoospermia	46,X,del(Y)(q11.2).ish del(Y)(SRY+)
B4	37	Infertilidade primária	45,XY,der(13;14)(q10;q10)
B8	33	Infertilidade primária; Azoospermia	47,XXY

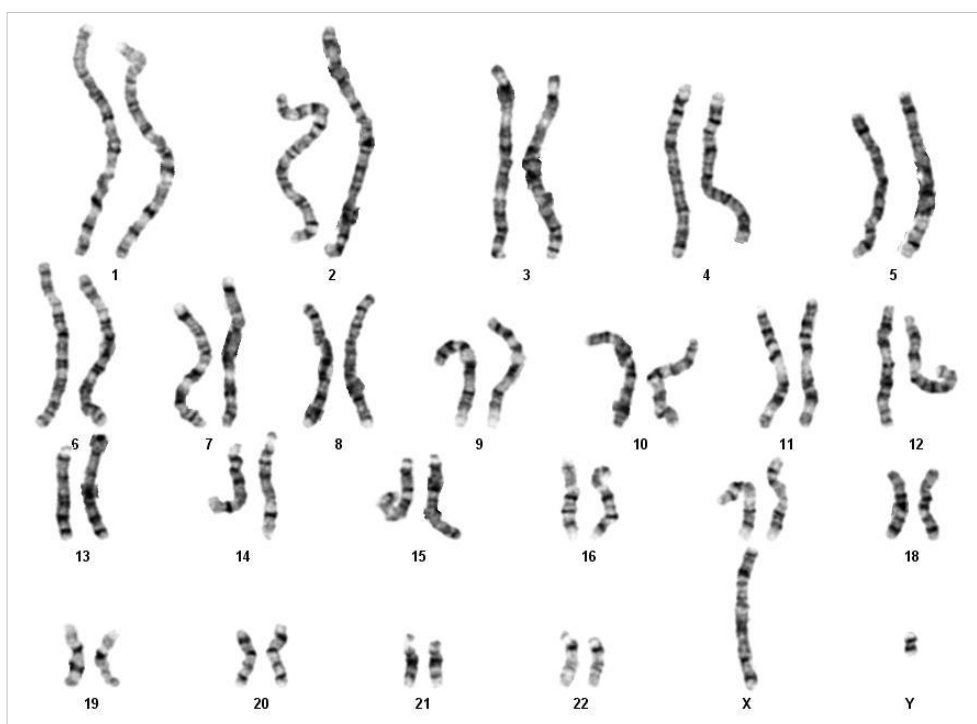


Figura 20: Cariograma do caso B3 verificando-se uma deleção terminal do cromossoma Y por bandagem GTL. Indivíduo do sexo masculino com cariótipo 46,X,del(Y)(q11.2) [ISCN 2020].

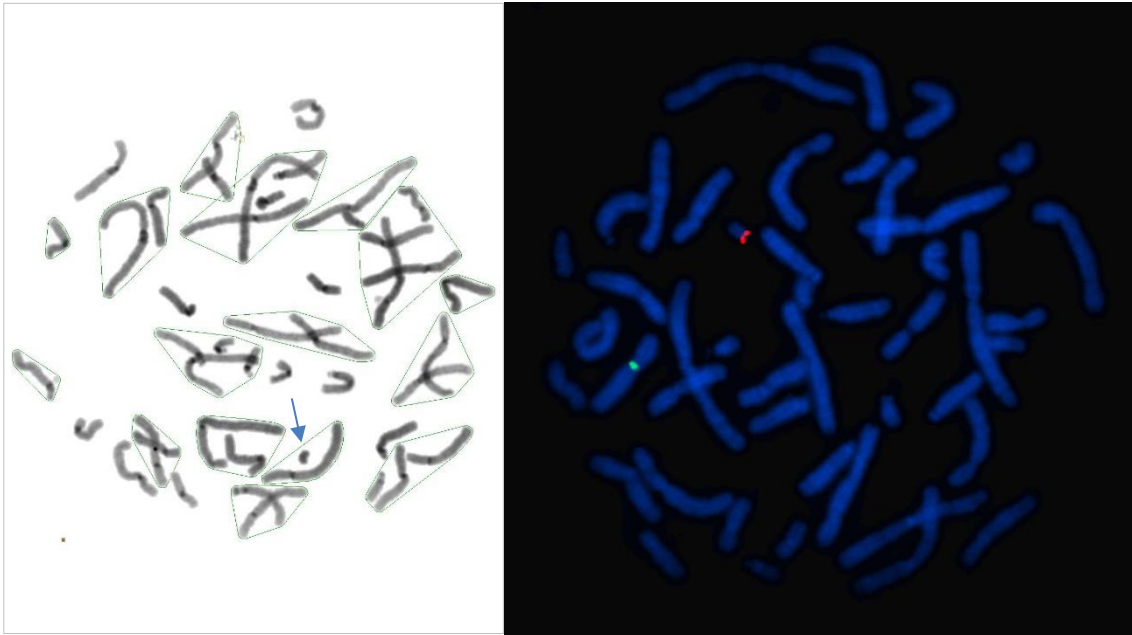


Figura 21: Estudos complementares para caracterização da deleção terminal do cromossoma Y por bandagem CBG (esquerda) e FISH (direita) no caso B3. A bandagem CBG permite avaliar a estrutura do cromossoma Y, identificar o centrómero e a região Yq12, esta última ausente. A análise por FISH incluiu sondas para o SRY (Yp11.31) e sondas controlo para a região centromérica do cromossoma X (Xp22.3) (CytoTest®). Verifica-se que o SRY está presente no braço curto e que o braço longo sofreu uma grande deleção.

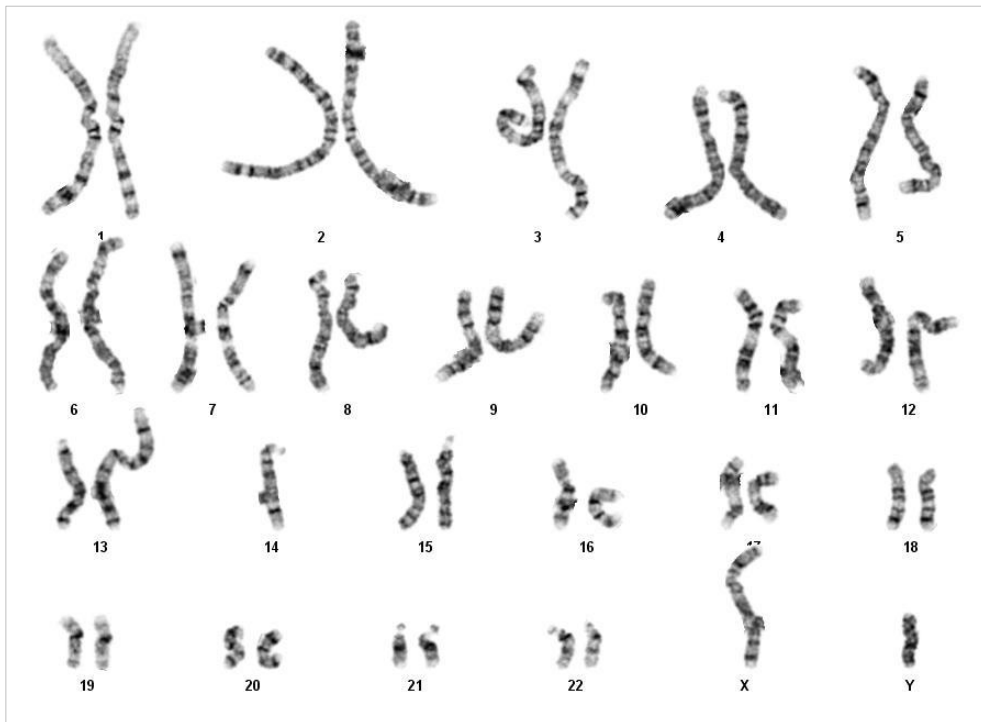


Figura 22: Cariograma do caso B4 verificando-se uma translocação Robertsoniana entre os cromossomas 13 e 14 por bandagem GTL. Indivíduo do sexo masculino com cariótipo 45,XY,der(13;14)(q10q10) [ISCN 2020].

Quanto às alterações cromossômicas numéricas, foi diagnosticado um Síndrome de Klinefelter 47,XXY; um caso de Síndrome de Klinefelter em mosaico mos 47,XXY[37]/46,XY[3] e um mosaicismo complexo dos cromossomas sexuais, sendo a linha celular de complemento cromossômico normal a maioritária: mos 47,XY[2]/47,XXY[1]/46,XY[47] (Figura 23).

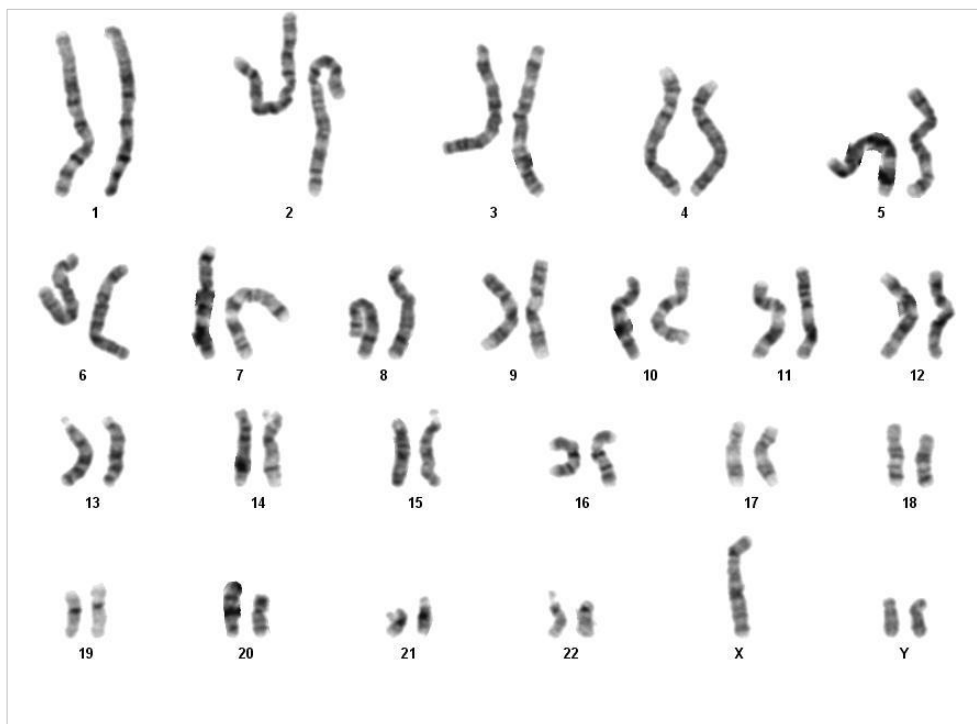


Figura 23: Cariograma da linha celular 47,XXY do caso B2 por bandagem GTL.

A pesquisa de microdeleções do cromossoma Y por MLPA foi realizada em 15 casos associados a alterações do espermograma. Em casos sem CNVs há amplificação de todas as sondas das regiões em estudo em igual proporção às amostras de referência, traduzindo-se no resultado `rsa[GRCh38] Y(P360-B2)x1`, visto que estes genes encontram-se em hemizigotia.

Este estudo permitiu a identificação de três microduplicações e uma microdeleção (`rsa[GRCh38] Yq11.223(22279283_23473986)x0`) associada a mosaicismo complexo dos heterossomas (47,XXY[2]/47,XXY[1]/46,XY[47]) referido anteriormente. Pela técnica de MLPA foi também possível caracterizar a deleção do braço longo do cromossoma Y anteriormente descrita: `rsa[GRCh38] Yq11.2(14078518_26423998)x0`. Visto que apenas as microdeleções permitem explicar o fenótipo de azoospermia secretora, esta técnica teve uma taxa diagnóstica de 13,3%. As alterações identificadas em resultado deste estudo encontram-se descritas na Tabela 3.

Tabela 3: Quadro resumo dos casos com alterações cromossômicas identificadas por estudo genético molecular (n=5), idade do indivíduo, indicação clínica e resultado do estudo de acordo com as normas do ISCN 2020.

Caso	Idade (anos)	Indicação clínica	Alteração identificada
B2	42	Infertilidade primária; Azoospermia	rsa[GRCh38] Yq11.223(22279283_23473986)x0
B3	37	Infertilidade primária; Azoospermia	rsa[GRCh38] Yq11.2(14078518_26423998)x0
B5	32	Infertilidade primária; OAT ¹	rsa[GRCh38] Yq11.22(CDY2A,BPY2,DAZ2,CDY1B)x3
B6	39	Infertilidade primária; Azoospermia	rsa[GRCh38] Yq11.221(CDY2A)x3
B7	34	Infertilidade primária; OAT ¹	rsa[GRCh38] Yq11.223(BPY2)x3

1: *Oligastenoteratozoospermia*

No caso B2 foi identificada uma microdeleção englobando as regiões AZFb e AZFc e incluindo os genes *RBMY1J*, *BPY2* e *DAZ2*. A Figura 24 apresenta os resultados do MLPA pela análise do software Coffalyser.Net™. As sondas em que foram verificadas variações do número de cópias encontram-se descritas na Tabela 4. Rácios de 0 indicam a deleção de todas as cópias da sequência, como é o caso do *RBMY1J*, enquanto o rácio de 0.5 indica a deleção de metade das cópias dessa sequência, como é o caso do *DAZ2*. Rácios de 0.77 aproximam-se do valor esperado da deleção de uma das três sequências para as quais as sondas *BPY2*— (486nt) e *BPY2*— (376nt) têm complementaridade. Assim, do Yq11.223 esta é provavelmente uma deleção contígua desde a sonda *RBMY1J*—(427nt) até à sonda *DAZ2-down* (301nt)

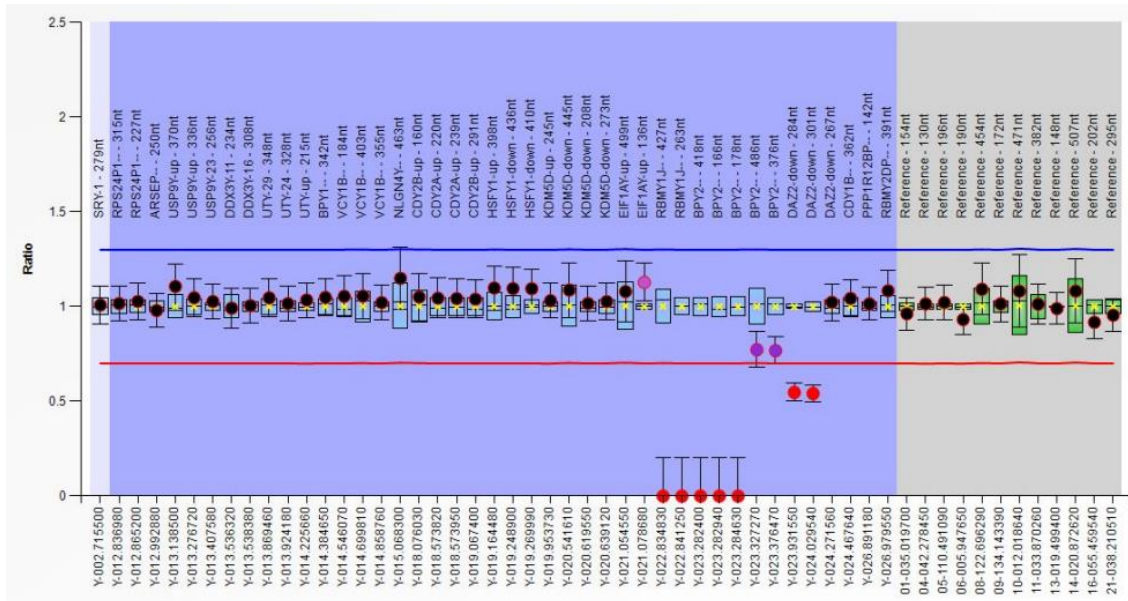


Figura 24: Análise do software Coffalyser.net do resultado do estudo de MLPA do caso B2.

Tabela 4: Sondas que apresentaram um rácio alterado no caso B2.

Gene – exão (dimensão)	Localização	Rácio
<i>RBMY1J</i> — (427nt)	Yq11.223	0
<i>RBMY1J</i> — (263nt)	Yq11.223	0
<i>BPY2</i> — (418nt)	Yq11.223	0
<i>BPY2</i> — (166nt)	Yq11.223	0
<i>BPY2</i> — (178nt)	Yq11.223	0
<i>BPY2</i> — (486nt)	Yq11.223	0.77*
<i>BPY2</i> — (376nt)	Yq11.223	0.77*
<i>DAZ2-down</i> (284nt)	Yq11.223	0.55
<i>DAZ2-down</i> (301nt)	Yq11.223	0.54

No caso B3, o estudo por MLPA permitiu definir a extensão da deleção do braço longo do cromossoma Y previamente identificada por citogenética. A Figura 25 apresenta os resultados do MLPA pela análise do software Coffalyser.Net™.

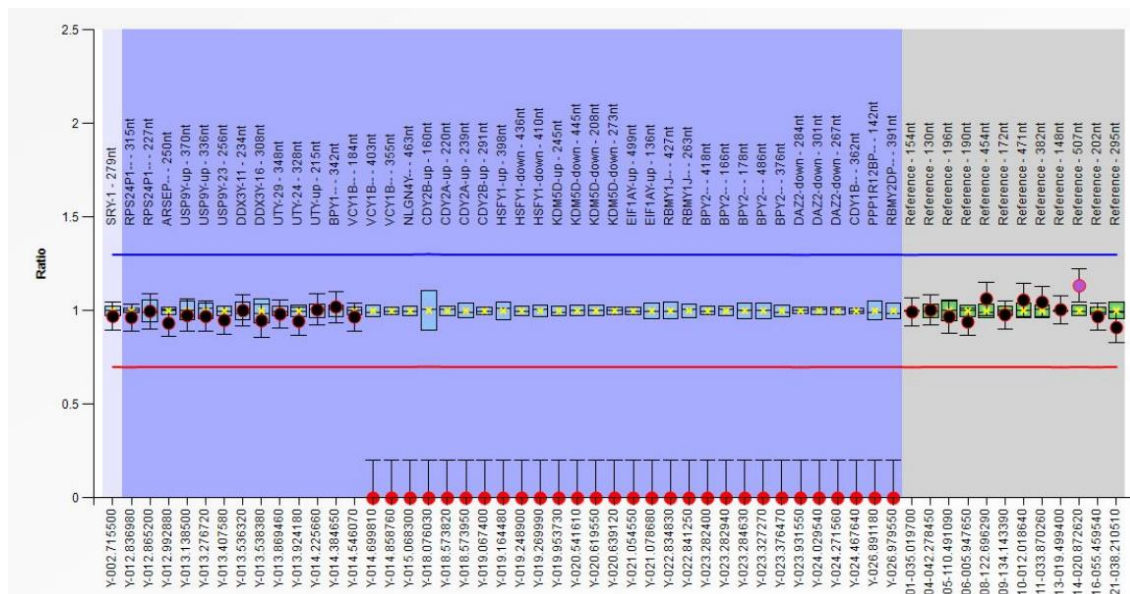


Figura 25: Análise do software Coffalyser.Net™ do resultado do estudo de MLPA do caso B3.

Verificou-se que a alteração se estende desde a região adjacente à AZFb até ao terminal do cromossoma Y, incluindo assim toda a região AZFb e AZFc, desde a sonda VCY1B— (403nt) à RBMY2DP— (391nt). As sondas em que foram verificadas variações do número de cópias encontram-se descritas na Tabela 5.

Tabela 5: Sondas que apresentaram um rácio alterado no caso B3.

Gene – exão (dimensão)	Localização	Rácio
VCY1B— (403nt)	Yq11.221	0
VCY1B— (355nt)	Yq11.221	0
NLGN4Y— (463nt)	Yq11.221	0
CDY2B-up (160nt)	Yq11.221	0
CDY2A-up (220nt)	Yq11.221	0
CDY2A-up (239nt)	Yq11.221	0

<i>CDY2B</i> -up (291nt)	Yq11.222	0
<i>HSFY1</i> -up (398nt)	Yq11.222	0
<i>HSFY1</i> -down (436nt)	Yq11.222	0
<i>HSFY1</i> -down (410nt)	Yq11.222	0
<i>KDM5D</i> -up (245nt)	Yq11.222	0
<i>KDM5D</i> -down (445nt)	Yq11.222	0
<i>KDM5D</i> -down (208nt)	Yq11.222	0
<i>KDM5D</i> -down (273nt)	Yq11.222	0
<i>EIF1AY</i> -up (499nt)	Yq11.222	0
<i>EIF1AY</i> -up (136nt)	Yq11.222	0
<i>RBMY1J</i> — (427nt)	Yq11.223	0
<i>RBMY1J</i> — (263nt)	Yq11.223	0
<i>BPY2</i> — (418nt)	Yq11.223	0
<i>BPY2</i> — (166nt))	Yq11.223	0
<i>BPY2</i> — (178nt)	Yq11.223	0
<i>BPY2</i> — (486nt)	Yq11.223	0
<i>BPY2</i> — (376nt)	Yq11.223	0
<i>DAZ2</i> -down (284nt)	Yq11.223	0
<i>DAZ2</i> -down (301nt)	Yq11.223	0
<i>DAZ2</i> -down (267nt)	Yq11.223	0
<i>CDY1B</i> — (362nt)	Yq11.223	0
<i>PPP1R12BP</i> — (142nt)	Yq11.23	0
<i>RBMY2DP</i> — (391nt)	Yq11.23	0

Relativamente às microduplicações identificadas, estas não são alterações que permitam explicar o quadro clínico de azoospermia, logo não foram reportadas. São, contudo, variantes previamente descritas na literatura cujas consequências fenotípicas não são ainda claras.

No caso clínico B5 foram identificadas três duplicações não contíguas. A primeira inclui apenas uma sonda, a segunda inclui cinco sondas e a última duas sondas. A Figura 26 apresenta os resultados do MLPA pela análise do software Coffalyser.Net™. As sondas em que foram verificadas variações do número de cópias encontram-se descritas na Tabela 6.

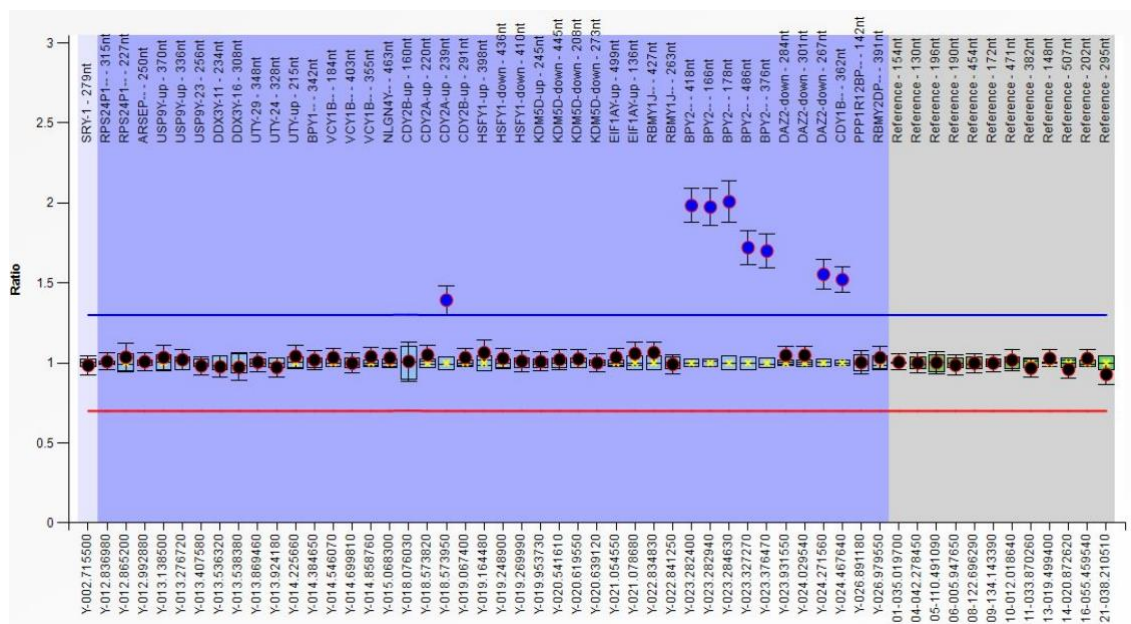


Figura 26: Análise do software Coffalyser.Net™ do resultado do estudo de MLPA do caso B5.

Tabela 6: Sondas que apresentaram um rácio alterado no caso B5.

Gene – exão (dimensão)	Localização	Rácio
CDY2A-up (239nt)	Yq11.221	1.39
BPY2— (418nt)	Yq11.223	1.98
BPY2— (166nt)	Yq11.223	1.97
BPY2— (178nt)	Yq11.223	2.01
BPY2— (486nt)	Yq11.223	1.72

<i>BPY2</i> — (376nt)	Yq11.223	1.7
<i>DAZ2</i> -down (267nt)	Yq11.223	1.55
<i>CDY1B</i> —(362nt)	Yq11.223	1.52

No caso B6 foi identificada uma duplicação que inclui duas sondas. A Figura 27 apresenta os resultados do MLPA pela análise do software Coffalyser.Net™. As sondas em que foram verificadas variações do número de cópias encontram-se descritas na Tabela 7.

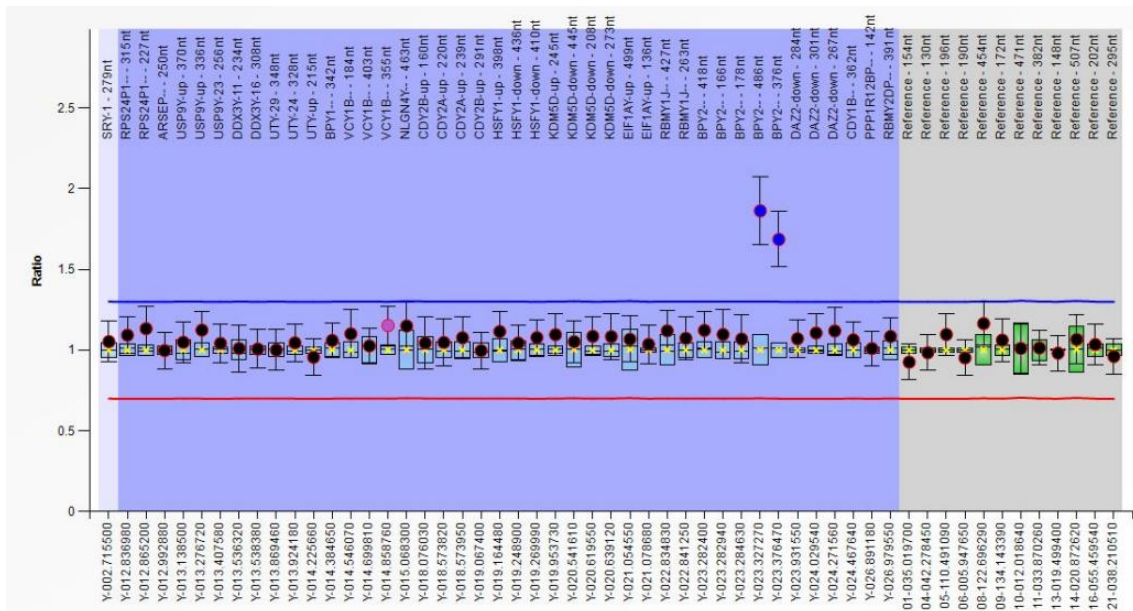


Figura 27: Análise do software Coffalyser.Net™ do resultado do estudo de MLPA do caso B6.

Tabela 7: Sondas que apresentaram um rácio alterado no caso B6.

Gene – exão (dimensão)	Localização	Rácio
<i>BPY2</i> — (486nt)	Yq11.223	1.86
<i>BPY2</i> — (376nt)	Yq11.223	1.69

No caso clínico B7 foi identificada uma duplicação que inclui duas sondas. A Figura 28 apresenta os resultados do MLPA pela análise do software Coffalyser.Net™. As sondas em que foram verificadas variações do número de cópias encontram-se descritas na Tabela 7.

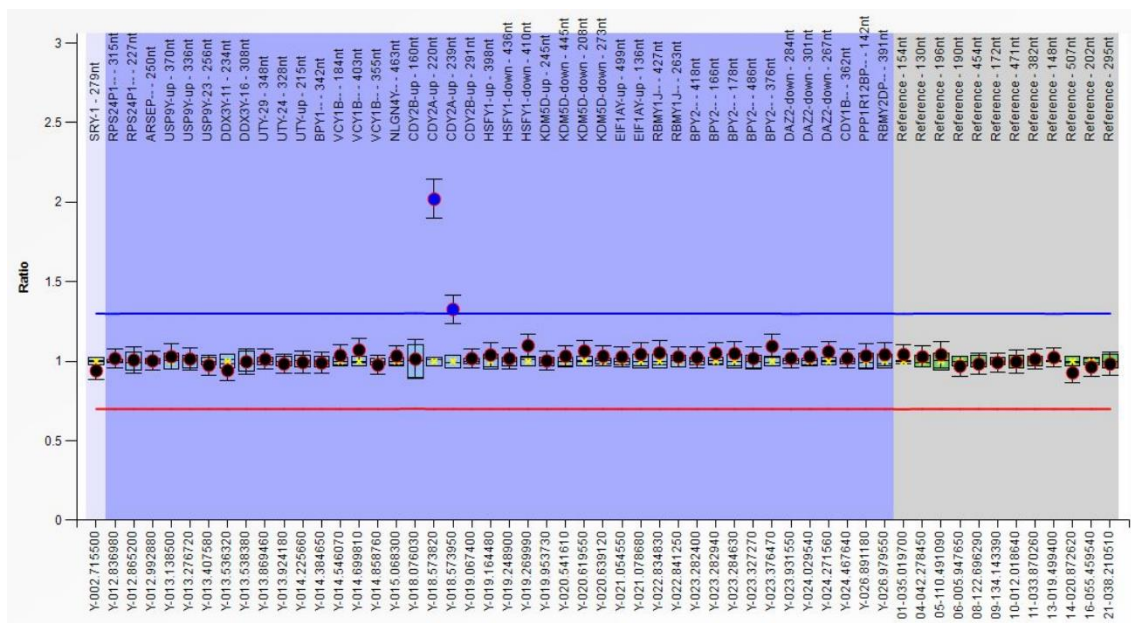


Figura 28: Análise do software Coffalyser.Net™ do resultado do estudo de MLPA do caso B7.

Tabela 8: Sondas que apresentaram um rácio alterado no caso B7.

Gene – exão (dimensão)	Localização	Rácio
CDY2A-up (220nt)	Yq11.223	1.86
CDY2A-up (239 nt)	Yq11.223	1.69

Capítulo V

Discussão

1. Estudo Retrospectivo

A infertilidade primária masculina é uma patologia de etiologia complexa e heterogênea. Assim se justifica que a citogenética, um estudo não direcionado de todo o cariótipo e que permite a identificação de diversas alterações genéticas, seja a primeira linha de estudo genético destes casos. As alterações de maior relevo no âmbito do diagnóstico de infertilidade masculina são as aneuploidias dos cromossomas sexuais, rearranjos estruturais equilibrados sem impacto para o portador e alterações estruturais do cromossoma Y.

O estudo retrospectivo permitiu avaliar o papel do diagnóstico citogenético em casos de infertilidade primária. A bandagem GTL permite a identificação de alterações cromossômicas numéricas e estruturais, equilibradas e desequilibradas, de resolução de até 3 a 5 Mb. É, por isso, a base do estudo citogenético e permitiu identificar todas as alterações cromossômicas deste estudo. A bandagem CBG tem um papel essencial na avaliação detalhada da estrutura do cromossoma Y. Visto que este cromossoma tem uma estrutura de dimensão variável e de difícil análise pelo padrão de bandas, rearranjos como inversões e cromossomas isodicêntricos são mais claramente evidenciados pela marcação específica das regiões centromérica e heterocromática terminal. Finalmente, a identificação de aneuploidias dos cromossomas sexuais em mosaico implica a avaliação de um maior número de metafases (20 a 30), visto que recorrentemente estão presentes linhas celulares de baixa expressão.

Estima-se que atualmente é possível identificar fatores genéticos subjacentes ao fenótipo de infertilidade masculina em 15% dos casos, porém neste estudo verificou-se que a taxa diagnóstica da citogenética convencional foi de 11.3%. Justifica-se esta taxa diagnóstica inferior pelo facto de o estudo citogenético não permitir a deteção de microdeleções do cromossoma Y, nem de variantes de sequência patogénicas. É, assim, clara a necessidade de aprofundar o estudo genético dos casos em que a análise citogenética não resulta num diagnóstico. Efetivamente, é recomendada a pesquisa de microdeleções do cromossoma Y em casos de infertilidade primária masculina associada a alterações do espermograma. Não devem ser encaminhados para este teste indivíduos normozoospermicos, uma vez que estas alterações comprometem a espermatogénese. Assim, os casos de infertilidade masculina idiopática não são atualmente direcionados para estudos genéticos complementares.

A primeira fase deste projeto permitiu também caracterizar o grupo de utentes referenciados ao Laboratório de Citogenética em consequência do diagnóstico de infertilidade primária e/ou hipogonadismo. Verificou-se que estas patologias são maioritariamente identificadas em idade adulta por incapacidade de conceção, não existindo previamente comorbilidades que sugerissem um quadro patológico. Efetivamente, a idade média dos utentes em idade reprodutiva foi de 37.2 anos. Apesar de, por si, só a idade não justificar o fenótipo de infertilidade ou hipogonadismo, a qualidade espermática declina cerca dos 35 anos^{80,81}.

Caso Clínico A2

O caso clínico A2 foi referenciado por infertilidade primária e azoospermia. A análise cromossómica revelou um complemento cromossómico masculino com uma alteração cromossómica estrutural desequilibrada, um cromossoma Y isodicêntrico presente em todas as metafases. Este rearranjo foi caracterizado por FISH com sonda *locus* específica para o gene *SRY* (Yq11.31); sondas repetitivas para a região heterocromática do braço longo (Yq12) e sondas repetitivas controlo para a região centromérica do cromossoma X (Xp11.1q11.1) (Cytocell® OGT). Este estudo revelou a duplicação aparentemente total do braço curto e a duplicação de todo o braço longo (Ypter→Yq12::Yq12→Ypter). Em todas as metafases registaram-se duas cópias do gene *SRY*, a marcação da zona heterocromática do braço longo e um cromossoma X. Deste modo, admite-se que não houve perda de material do Yp nem das regiões AZF. Efetivamente, a estrutura é compatível com a existência de duas cópias de todo o cromossoma.

Foram já propostas múltiplos mecanismos patofisiológicos para a azoospermia secretora associada aos cromossomas isodicêntricos. Geralmente, considera-se as deleção das regiões AZF como um dos principais fatores envolvidos na perturbação espermatogénica associada ao cromossoma isodicêntrico do Y. Neste caso, estas regiões aparentemente não foram perturbadas, encontrando-se provavelmente duplicadas. A alteração da dosagem destes genes poderá estar implicada no fenótipo, no entanto não existem estudos que definitivamente associem a duplicação total das regiões AZF ao fenótipo de azoospermia secretora⁴³.

A deleção da região PAR1, essencial para o emparelhamento dos homólogos durante a meiose, é também um importante mecanismo a considerar nestes casos. Porém, o cromossoma em causa não aparenta ter sofrido alterações do braço curto, tendo o rearranjo ocorrido na porção distal do braço longo. A duplicação desta região pode, contudo, perturbar o emparelhamento ao existirem duas regiões complementares à PAR1 do cromossoma X. A PAR2 não é necessária para o emparelhamento dos homólogos e a sua deleção parece não ter implicações na fertilidade^{43,82}. No entanto, outros estudos apontam a deleção dos genes da PAR2 com papel regulador da meiose como mecanismo causal de infertilidade destes rearranjos ao induzir a paragem da maturação em meiose⁸³.

A instabilidade centromérica resultante da existência de dois centrómeros ativos poderá contribuir para a perturbação da espermatogénese. Contudo, verifica-se que a elevada distância intercentromérica do rearranjo em causa predispõe para a inativação de um dos centrómeros⁸⁴. Ademais, a existência deste cromossoma em todas as células sustenta que este apenas terá um centrómero ativo e será mitoticamente estável. Finalmente, o rearranjo da estrutura destes cromossomas, bem como a perda de material genético, leva à perturbação do emparelhamento e segregação dos homólogos na meiose^{43,86}. Sendo este o mecanismo mais provavelmente subjacente ao fenótipo observado.

Na origem deste rearranjo poderá estar a quebra na zona distal do braço longo do cromossoma seguida da fusão das cromátides ou NAHR mediada pelos palíndromos da MSY. Este último mecanismo proposto por Lange *et al.* (2009) estabelece que a recombinação através de diferentes palíndromos explica rearranjos idicYp e idicYq distintos⁸⁴. Foi descrita a formação de um isodicêntrico através da recombinação das sequências repetitivas DYZ18/DYZ1/DYZ2 da Yq12, representado na Figura 29⁸³. Este rearranjo assemelha-se ao do caso em estudo, propondo-se que o mecanismo de formação terá sido semelhante a este.

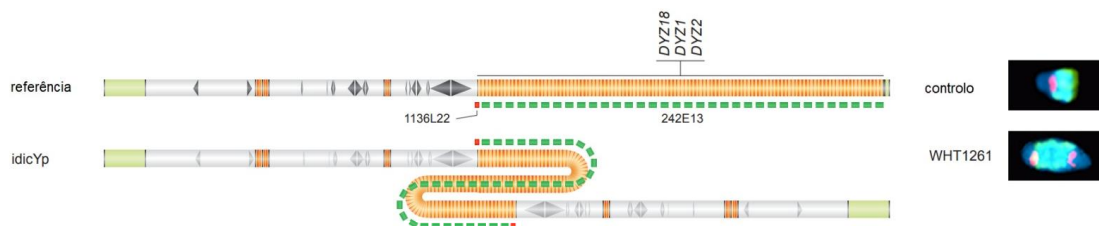


Figura 29: Ilustração esquemática de um cromossoma Y isodicêntrico com ponto de quebra na heterocromatina DYZ18/DYZ1/DYZ2. O estudo por FISH com as sondas 1136L22 (vermelho) e 242E13 (verde) permitiu confirmar a estrutura prevista deste rearranjo. Adaptado de Lange *et al.*, 2009.

Os cromossomas isodicêntricos estão associados a um largo espectro de manifestações fenotípicas, descritas anteriormente, e nas quais o caso em estudo se enquadra. A patofisiologia desta alteração cromossômica depende do rearranjo em causa: os pontos de quebra, regiões cromossômicas deletadas/duplicadas, bem como a existência de mosaicismo. Geralmente, estes indivíduos são azoospérmicos, no entanto, foram já descritos casos de OAT^{84,85}. O aconselhamento genético é crucial para que o portador seja esclarecido relativamente às consequências desta alteração. Adicionalmente, o utente poderá recorrer ao diagnóstico pré-natal visto que esta é uma alteração cromossômica desequilibrada.

Caso Clínico A3

Este caso clínico foi referenciado por infertilidade primária; azoospermia; atrofia testicular bilateral sem massas palpáveis. A análise cromossômica revelou um complemento cromossômico de 46,XX. Foi realizado o estudo citogenético molecular para pesquisa do *SRY*. Foram utilizadas sondas para o *SRY* (Yp11.31) e sondas controlo para a região centromérica do cromossoma X (Xp22.3) (CytoTest®). Em todas as metafases verificou-se a existência de dois cromossomas X, mas sem sinal da sonda para o *SRY*. Deste modo, conclui-se que este é um caso de reversão sexual *SRY* negativo. Assim, o fenótipo masculino poderá ser explicado pela ativação de genes da cascata de diferenciação sexual masculina (*SOX9*, *DAX1* e *SOX3*); a presença de variantes em genes que permitem a diferenciação sexual feminina, como é o caso do *RSPO1*; ou pela existência de uma linha celular *SRY* positiva nas gónadas (mosaicismo gonadal)^{43,87}.

O fenótipo de infertilidade por azoospermia secretora é expectável, visto que não estão presentes os genes das regiões AZF necessários para a espermatogénese. Assim, este será um caso de esterilidade total, não sendo viável a realização de técnicas de PMA. No entanto, apenas a identificação das alterações genéticas associadas ao fenótipo permitiria esclarecer a relação genótipo-fenótipo. O aconselhamento genético é também crucial para que o portador seja esclarecido relativamente às consequências desta alteração.

Casos Clínicos A4, A5, A6 e A7

Os casos A4, A5 e A6 foram referenciados por infertilidade primária e azoospermia. O caso A7 foi referenciado por azoospermia, hipogonadismo e suspeita de Síndrome de Klinefelter. Em todos os casos foi diagnosticado Síndrome de Klinefelter: constitucional nos casos A4, A5 e A7 e em mosaico no caso A6. Em todos os casos a fenótipo enquadra-se nos traços característicos desta Síndrome. É de salientar, contudo, que em todos estes casos deverá existir hipogonadismo, apesar de esta indicação clínica não constar na informação transmitida ao Laboratório. O caso A6, apresenta mosaicismo de baixa expressão, logo a manifestação da Síndrome poderá ser menos severa, contudo, este efeito dependerá do grau de expressão de cada linha celular nos diferentes tecidos. Com base nos dados da literatura, prevê-se que estes indivíduos não serão estéreis. A taxa de sucesso da TESE é relativamente elevada (40-50%), especialmente no caso do mosaicismo. Esta é a patologia mais frequentemente associada à infertilidade masculina primária e, de facto, foi o diagnóstico mais comum deste estudo.

Como discutido anteriormente, a patofisiologia desta Síndrome ainda não é clara. É habitual o diagnóstico tardio desta patologia, decorrente do diagnóstico de infertilidade. Sendo esta aneuploidia livre, não terá sido herdada dos progenitores, nem será transmitida à descendência. De facto, apenas foi reportado um caso de um indivíduo com Síndrome de Klinefelter com um descendente com a mesma patologia⁹. O aconselhamento genético é crucial para o esclarecimento do utente relativamente ao diagnóstico e às comorbilidades a si associadas que requerem vigilância médica adicional. Adicionalmente, estes indivíduos poderão recorrer ao diagnóstico pré-natal.

2. Estudo Citogenético e Genético Molecular

A pesquisa de microdeleções do cromossoma Y é aplicada em casos de azoospermia secretora, oligozoospermia severa ou OAT. Perturbações da espermatogénese estão intimamente associadas à deleção de genes das regiões AZF. Deste modo, nestes casos, é recomendada a pesquisa de microdeleções do cromossoma Y. Estas alterações nem sempre implicam esterilidade total e são transmissíveis à descendência masculina. Assim, indivíduos

que procurem técnicas de PMA devem ser corretamente acompanhados e receber aconselhamento genético.

Esta fase do projeto pretendeu implementar a pesquisa de microdeleções do cromossoma Y na rotina diagnóstica de casos de infertilidade primária masculina associada a alterações do espermograma e avaliar o seu potencial diagnóstico. A metodologia aplicada foi a MLPA, que consiste num procedimento e análise de resultados relativamente simples e rápido. Esta técnica baseia-se na amplificação multiplex de sondas de DNA complementares a diferentes sequências do genoma humano. As sondas são constituídas por dois oligonucleótidos que hibridizam em sequências-alvo adjacentes, e que apenas se ligam quando perfeitamente complementares com a sequência, conferindo elevada sensibilidade a este estudo. Já o estudo por PCR convencional baseia-se na utilização de dois primers STS para cada região AZF⁵⁵. Estes marcadores são complementares a *loci* previamente descritos em microdeleções do cromossoma Y associados a fenótipos de azoospermia ou oligozoospermia. Comparativamente, o MLPA permite uma análise de resolução superior com cobertura de todo o braço longo. De facto, o MLPA contempla o estudo individual de 42 sondas para o braço longo, em que cada sonda está associada ao gene a que é complementar.

A avaliação do impacto do diagnóstico molecular foi possível pelo estabelecimento de três grupos de estudo e avaliação da taxa diagnóstica de cada um. No caso da infertilidade primária idiopática (grupo I), o estudo citogenético traduziu-se numa taxa diagnóstica de cerca de 7.1%. No grupo de casos de infertilidade primária associada a alterações do espermograma (grupo II) com estudo do cariótipo, a taxa diagnóstica foi de cerca de 6.6%. Finalmente, nos casos de infertilidade primária associada a alterações do espermograma em que foi realizado o estudo citogenético em paralelo com a pesquisa de microdeleções do cromossoma Y (grupo III), a taxa diagnóstica foi de cerca 13.3%.

Era esperado que o grupo I apresentasse a menor taxa diagnóstica, uma vez que são casos menos severos em que a função espermática não se encontra perturbada. Não existem outros estudos genéticos validados para estes quadros clínicos⁴. Avaliando os grupos II e III, verifica-se que o diagnóstico combinado citogenético e molecular permite um aumento significativo da taxa diagnóstica.

Relativamente, ao grupo III, foram identificadas duas alterações por citogenética convencional, uma aneuploidia complexa dos cromossomas sexuais e uma deleção do braço longo do cromossoma Y. O estudo por MLPA identificou alterações em dois casos, ambos azoospermicos. Esta metodologia permitiu caracterizar a deleção Yq e identificar uma deleção não detetável por citogenética. Assim, a taxa diagnóstica da pesquisa de microdeleções do cromossoma Y foi de cerca de 6.7%. Considerando que a prevalência destas microdeleções é de 5% na população oligozoospermica e 10% da população azoospermica⁹, a taxa diagnóstica encontra-se dentro da gama de valores esperados. No entanto, este é um valor consideravelmente baixo, comparando com resultados descritos na literatura. Comparativamente, Franchim *et al.* (2020) reportaram uma taxa diagnóstica de 21% desta metodologia⁸⁸. De facto, a taxa diagnóstica verificada afasta-se dos valores esperados de diagnóstico de uma causa genética associada ao fenótipo de oligozoospermia (10%) e de azoospermia (25%)³⁷.

Casos Clínicos B1 e B8

Estes casos de infertilidade primária, e azoospermia no caso B8, foram diagnosticados com Síndrome de Klinefelter. O caso B1 apresenta um mosaicismo de baixa expressão em que a linha aneuploide é maioritária, enquanto em B8 a aneuploidia é constitucional. A relação genótipo-fenótipo desta Síndrome foi anteriormente abordada na discussão dos casos A4, A5, A6 e A7. As mesmas conclusões se aplicam aos casos B1 e B8.

No entanto, no caso B1 não foi reportada a presença de alterações do espermograma, características desta Síndrome. A infertilidade primária associada à SK deve-se à perturbação da espermatogénese. Logo, e visto que a linha celular maioritária é a 47,XXY, este indivíduo terá fenótipo de azoospermia ou, pelo menos, de oligozoospermia.

Caso Clínico B2

O caso clínico B2 foi referenciado por infertilidade primária e azoospermia. O estudo citogenético revelou uma linha celular de complemento cromossómico masculino normal e duas linhas aneuploides de baixa expressão: mos 47,XXY[2]/47,XXY[1]/46,XY[47].

Adicionalmente, a pesquisa de microdeleções identificou uma microdeleção na região terminal da AZFb e região inicial da AZFc, incluindo os genes *RBMY1J*, *BPY2* e *DAZ2*. O estudo por MLPA não permitiu identificar as linhas celulares aneuploides, uma vez que estas têm baixa expressão.

O mosaïcismo identificado apresenta três linhas celulares distintas, sendo a maioritária a de complemento cromossómico masculino normal. Foram identificadas células aneuploides de complemento cromossómico 47,XXY e 47,XYY. As linhas celulares aneuploides foram identificadas em ambas as culturas celulares, confirmando não se tratar de pseudomosaïcismo associado a artefactos de cultura. A sua origem estará associada a eventos de não-disjunção mitótica pós-zigótica. Estas são linhas de baixa expressão em sangue periférico, não sendo possível prever a sua representação noutros tecidos e dificultando a interpretação deste resultado. Adicionalmente, apesar de a Síndrome de Klinefelter estar claramente associada ao fenótipo de azoospermia, não é consensual que a Síndrome de Jacobs tenha um efeito patogénico na fertilidade. Deste modo, o impacto fenotípico destas aneuploidias não é claro.

Relativamente à microdeleção identificada, as sondas complementares às regiões deletadas apresentam rácios distintos. Isto deve-se ao facto de as sondas para os genes *BPY2* e *DAZ2* serem complementares a três e dois *loci* distintos, respectivamente. Assim, os rácios de 0.5 indicam a deleção de metade das sequências para as quais as sondas hibridizam. As sondas *BPY2*— (486nt) e *BPY2*— (376nt) apresentam rácios aparentemente normais, mas que se aproximam do rácio esperado para a deleção de uma das três sequências-alvo destas sondas. Assim, esta será uma deleção contígua do nucleótido 22279283 ao 23473987. A extensão desta microdeleção assemelha-a à já reportada microdeleção parcial da região AZFc b1/b3.

Para a interpretação deste resultado foi primeiramente considerada a função de cada um destes genes. O gene *RBMY1J*, expressa-se apenas nos testículos, codificando uma proteína que regula o “splicing” durante a espermatogénese^{89,90}. Os genes *BPY2* e *DAZ2* expressam-se exclusivamente nos testículos, atuando no desenvolvimento das espermatogónias^{77,90,91}. Todos estes genes fazem parte de famílias de genes com múltiplas cópias as quais não foram deletadas na sua totalidade. Deste modo, a função destes genes continuará a ser desempenhada, ainda que possa ocorrer um efeito de sub-dosagem génica.

A consulta das bases de dados ClinVar e DECIPHER permitiu a comparação do caso B2 com outros já reportados. Foram reportadas deleções de dimensão inferior, algumas das quais classificadas como patogénicas e outras como benignas. Contudo, não foram identificadas deleções de igual dimensão à microdeleção em estudo. A relação genótipo-fenótipo desta microdeleção não é clara, tendo sido reportada tanto em indivíduos saudáveis como inférteis^{92,93}. Ademais, Huang *et al.* (2020) avaliaram o impacto de microdeleções parciais da AZFc no sucesso da TESE em indivíduos diagnosticados com Síndrome de Klinefelter constitucional e verificaram que a presença destas microdeleções não é impeditiva do sucesso deste procedimento⁹⁴. Noutros estudos, esta alteração, e a deleção de cópias do gene *DAZ2*, foi identificada como um fator de aumento do risco de falha espermatogénica, embora a baixa incidência na população dificulte o estabelecimento de uma relação causal do fenótipo^{93,95,96}.

Considerando que este indivíduo apresenta múltiplas aberrações genéticas, concluiu-se que estas poderão ter um papel causal no fenótipo de azoospermia e consequente infertilidade primária. Os resultados destes estudos têm de ser esclarecidos no âmbito de uma consulta de aconselhamento genético. Indivíduos diagnosticados com Síndrome de Klinefelter, bem como com microdeleções da AZFc são candidatos para realizar a TESE, existindo uma taxa moderada de sucesso deste procedimento^{4,97}. Devem também ser consideradas as implicações da PMA para a descendência, uma vez que, não sendo a Síndrome de Klinefelter hereditável, as microdeleções do cromossoma Y serão transmitidas a todos os descendentes do sexo masculino. Adicionalmente, o utente poderá recorrer ao diagnóstico pré-natal.

Caso Clínico B3

O caso clínico B3 foi referenciado por infertilidade primária e azoospermia. O estudo citogenético permitiu identificar uma deleção terminal do braço longo do cromossoma Y, posteriormente caracterizada por FISH: 46,X,del(Y)(q11.2).ish del(Y)(SRY+). Posteriormente, foi realizado o estudo genético molecular, o qual permitiu definir a extensão da deleção: rsa[GRCh38] Yq11.221q11.23(14078518_26423998)x0. A deleção inclui toda a região AZFb e AZFc, resultando na deleção da totalidade de várias famílias de genes da MSY, bem como dos genes contidos na PAR2. A perda destes genes impedirá o normal desenvolvimento da

espermatogénese, justificando o fenótipo apresentado. Neste caso, a probabilidade de produção de espermatozoides é negligenciável⁹⁷, não sendo este paciente um bom candidato para TESE. Os resultados deste estudo devem ser esclarecidos numa consulta de aconselhamento genético.

Caso Clínico B4

O caso clínico B4 foi referenciado por infertilidade primária. A análise citogenética revelou um complemento cromossómico masculino e uma translocação robertsoniana entre os cromossomas 13 e 14. Este é um rearranjo aparentemente equilibrado e geralmente sem impacto no fenótipo do portador, à exceção de casos de infertilidade. É a alteração cromossómica mais frequente em seres humanos, com prevalência de 1:1300⁵⁸.

Rearranjos equilibrados estão habitualmente associados à perda gestacional recorrente⁵⁸. Contudo, caso a perda gestacional ocorra numa fase precoce, este quadro clínico pode ser confundido como infertilidade primária. No entanto, os portadores de translocações equilibradas podem também apresentar um fenótipo de infertilidade primária associada à perturbação da espermatogénese ou por inviabilidade dos zigotos formados por gâmetas desequilibrados^{43,58}. Neste caso, o utente foi referenciado sem indicação de azoospermia secretora, logo o fenótipo estará provavelmente associado a abortos subclínicos. O desequilíbrio dos embriões gerados dever-se-á à sobredosagem dos genes do cromossoma 13 ou do cromossoma 14. A trissomia 13, a Síndrome de Patau, é uma aneuploidia viável, contudo o tempo de sobrevivência é de um mês a um ano. Já a trissomia 14 constitucional não é viável, resultando em perda gestacional. Adicionalmente, as trissomias podem induzir o mecanismo de “trisomy rescue”. Este tem como objetivo eliminar a cópia supranumerária do cromossoma podendo resultar na dissomia uniparental paterna do cromossoma 14, a qual está associada a perturbações de desenvolvimento fetal^{58,59}.

O aconselhamento genético é fundamental para a gestão de casos de portadores de translocações equilibradas. Isto porque este é um rearranjo herdável que pode ter sido transmitido por um progenitor, encontrando-se os familiares em risco de serem portadores. Ademais, também o utente poderá transmitir esta alteração cromossómica à descendência. Assim, o aconselhamento genético deve não só esclarecer o diagnóstico, mas também

informar sobre a hereditariedade deste rearranjo e transmitir a necessidade do estudo citogenético dos familiares (progenitores do caso índice, bem como seus irmãos). Neste caso, o utente poderá recorrer a técnicas de PMA e diagnóstico pré-implantação para seleção de embriões sem desequilíbrios genéticos, ou optar pelo diagnóstico pré-natal.

Casos Clínicos B5, B6 e B7

Os casos B5 e B7 foram referenciados por infertilidade primária e OAT e o caso B6 foi referenciado por infertilidade primária e azoospermia. Em todos os casos, foram identificadas microduplicações, de dimensão variável, de genes das regiões AZF. No caso B5 as duplicações de oito *loci* localizam-se nas regiões AZFb e AZFc. No caso B6 as microduplicações de dois *loci* estão presentes em AZFc. Em B7 as duplicações ocorrem na AZFc. Os *loci* duplicados no caso B6 e B7 são partilhados com as sondas duplicadas em B5, à exceção da sonda *CDY2A*-up 220nt.

No caso B5, encontravam-se duplicados os genes *CDY2A*, *BPY2*, *DAZ2* e *CDY1B*. O caso B6 apresentava duplicação do gene *BPY2*. E no caso B7 foi identificada a duplicação do gene *CDY2A*. A severidade do fenótipo não aparenta ter relação com a extensão da duplicação, uma vez que o caso B5 apresenta maior número de loci duplicados, mas é o caso B6 com fenótipo mais severo (azoospermia). Lu *et al.* (2014) identificaram uma relação entre a sobredosagem entre os genes *DAZ* e *BPY2* e a perturbação da espermatogénese⁹⁹. No entanto, outros autores que verificaram associações semelhantes, admitem que os efeitos destas duplicações podem variar entre populações etnicamente distintas¹⁰⁰. Efetivamente, o impacto fenotípico das duplicações de genes das regiões AZF não é consensual^{88,101}. Estas alterações foram identificadas em populações saudáveis, bem como em indivíduos diagnosticados com falha espermatogénica^{88,102}. São necessários mais estudos para esclarecer esta relação⁸⁸. Deste modo, as duplicações identificadas não foram consideradas causais do fenótipo destes indivíduos, não tendo sido reportadas.

3. Considerações Finais

No decorrer deste estudo foram avaliados 111 casos de infertilidade primária masculina e foram identificadas 11 alterações genéticas causais deste fenótipo. Destas, cerca de 70% são alterações cromossómicas numéricas e aproximadamente 40% são alterações cromossómicas estruturais. Relativamente ao estudo molecular, a pesquisa de microdeleções do cromossoma Y foi efetuada em 15 casos, tendo sido identificada apenas uma microdeleção.

Como esperado, a patologia mais prevalente é a Síndrome de Klinefelter, a qual é diagnosticada por citogenética convencional. Efetivamente, esta técnica tem um papel central na pesquisa etiológica da infertilidade masculina ao permitir a análise não direcionada do cariótipo e permitindo identificar alterações equilibradas e mosaicos de baixa expressão.

A clara mais-valia do estudo molecular recai no facto de permitir aumentar a taxa diagnóstica do estudo genético através de metodologias relativamente simples. Efetivamente, também este estudo permite complementar o estudo citogenético por identificação de variantes de dimensão reduzida e, por isso, não detetáveis por citogenética, bem como, a possibilidade de caracterizar o conteúdo genético afetado por alterações estruturais.

A interpretação dos resultados da pesquisa de microdeleções do cromossoma Y pode ser complexa. Efetivamente, a relação genótipo-fenótipo de microduplicações e microdeleções de reduzida extensão neste cromossoma não é clara. O significado clínico das microduplicações é especialmente controverso, não devendo estas alterações ser reportadas. A análise de resultados deve também ser cuidada de modo a distinguir claramente alterações genéticas associadas a infertilidade e aquelas associadas à esterilidade. Esta informação deve ser explícita de forma a melhor apoiar a decisão clínica relativamente a opções terapêuticas como a PMA.

A metodologia de MLPA apresenta como grandes vantagens a simplicidade e rapidez do seu protocolo, elevada sensibilidade e resolução. Comparativamente à PCR multiplex, o MLPA permite uma análise de maior resolução e a deteção de deleções e duplicações. Destaca-se também que esta metodologia permite o despiste de Síndrome de Klinefelter constitucional. As desvantagens desta metodologia centram-se na incapacidade de deteção de algumas

alterações genéticas. De facto, a deteção de mosaicismo de baixa expressão é limitada, não é possível identificar rearranjos equilibrados, nem diferenciar uma microdeleção de uma variante de sequência que impeça a hibridização das sondas em estudo.

Deste modo, a realização simultânea das metodologias de citogenética e genética molecular permite a melhor compreensão das alterações genéticas identificadas e fenótipos associados, bem como agilizar os diagnósticos. Assim, a implementação do MLPA possibilitou complementar o estudo citogenético estabelecido no Laboratório de Citogenética. O sucesso desta metodologia e os claros benefícios do alargamento do estudo etiológico destes casos demonstram que a diversificação das tecnologias de estudo genético é fundamental para a Genética Clínica.

Finalmente, é de referir que o número de amostras analisadas por MLPA foi reduzido e as conclusões inferidas da análise de resultados e da aplicação desta metodologia para a investigação etiológica destes quadros clínicos são, por isso, limitadas.

Capítulo VI

Conclusão e Perspetivas Futuras

A infertilidade masculina primária é uma patologia complexa que afeta a população a nível global. Estes quadros clínicos estão associados a comorbilidades, tendo sido já reportado um aumento da mortalidade nestes indivíduos e maior taxa de incidência de patologias cardiovasculares, por exemplo. Ademais, verifica-se que a incidência da infertilidade apresenta uma tendência de crescimento. Em paralelo, foi também já reportada a diminuição da qualidade espermática de diversas populações. O correto diagnóstico e acompanhamento destes indivíduos tem um papel fundamental na gestão deste diagnóstico, possibilitando por vezes a reprodução por metodologias artificiais. No entanto, 30 a 40% dos casos são considerados idiopáticos.

O processo diagnóstico deve ser articulado entre as vertentes clínica e laboratorial. A avaliação clínica direciona o estudo laboratorial e este, por sua vez, sustenta a decisão terapêutica. Para isto, é essencial que o “workflow” laboratorial seja informativo e completo. Apesar de os estudos genéticos recomendados pelas diretrizes internacionais se manterem idênticos há uma década, a introdução de metodologias mais eficientes pode representar uma melhoria substancial para o processo diagnóstico.

No decorrer deste projeto foram avaliadas as metodologias existentes para o estudo genético da infertilidade primária masculina e foi implementada uma nova tecnologia (MLPA) para o estudo genético molecular. Efetivamente, este estudo permitiu avaliar o impacto das tecnologias de citogenética e genética molecular no diagnóstico clínico. Verificou-se que a aplicação simultânea destas metodologias permite atingir um maior número de diagnósticos, bem como uma melhor caracterização dos mesmos. O estudo citogenético mantém-se a metodologia mais relevante, no entanto, a pesquisa de microdeleções do cromossoma Y por MLPA complementa-a por aumento da resolução de análise. O MLPA é uma técnica alternativa à PCR que apresenta maior cobertura do cromossoma Y, resultando numa análise de maior resolução. Porém, os resultados desta podem constituir um desafio na sequência da identificação de alterações de menor extensão e de duplicações cujo significado clínico não é claro.

Futuramente, tecnologias de análise de sequência, bem como o estudo epigenético poderão introduzir uma melhoria significativa da eficiência do diagnóstico genético. Efetivamente, consórcios como GEMINI dedicam-se à pesquisa de variantes de sequência e avaliação do

seu impacto no fenótipo de infertilidade masculina. Variantes epigenéticas podem também estar associadas a estes quadros clínicos e contribuir para aprofundar a compreensão dos mecanismos subjacentes à infertilidade masculina. Existem ainda obstáculos à implementação destas metodologias, em especial a dificuldade de interpretação e validação das variantes identificadas, uma vez que, estas apresentam elevada heterogeneidade genética e alélica e têm baixa frequência na população.

A evolução do diagnóstico genético destas patologias depende da expansão do conhecimento relativo aos mecanismos patofisiológicos subjacentes à infertilidade masculina, de estudos integrativos de larga escala e validação funcional das variantes genéticas identificadas. Para que tal seja possível é essencial a colaboração da comunidade científica é essencial.

Capítulo VII

Referências Bibliográficas

1. Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., de Mouzon, J., Ishihara, O., Mansour, R., Nygren, K., Sullivan, E., Vanderpoel, S., International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology, & World Health Organization (2009). International Committee for Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) revised glossary of ART terminology, 2009. *Fertility and sterility*, 92(5), 1520–1524. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.09.009>
2. Zegers-Hochschild, F., Adamson, G. D., Dyer, S., Racowsky, C., de Mouzon, J., Sokol, R., Rienzi, L., Sunde, A., Schmidt, L., Cooke, I. D., Simpson, J. L., & van der Poel, S. (2017). The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. *Fertility and sterility*, 108(3), 393–406. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.06.005>
3. Rowe, P. J., Comfaire, F. H., Hargreave, T. B., & Mahmoud, A. M. A. (2003). *Who manual for the standardized investigation, diagnosis, and management of the infertile male* (1st ed.). Published on behalf of the World Health Organization by Cambridge University Press
4. EAU Guidelines. Edn. presented at the EAU Annual Congress Amsterdam 2022. ISBN 978-94-92671-16-5
5. Infertility prevalence estimates, 1990–2021. Geneva: World Health Organization; 2023. Licence: CC BY-NC-SA 3.0 IGO
6. Silva-Carvalho, J. L., & Santos, A. (2009). Estudo Afrodite: Caracterização da infertilidade em Portugal (Vol I. Estudo na Comunidade). Porto: Faculdade de Medicina da Universidade do Porto.
7. Agarwal, A., Mulgund, A., Hamada, A., & Chyatte, M. R. (2015). A unique view on male infertility around the globe. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 13, 37. <https://doi.org/10.1186/s12958-015-0032-1>
8. Jungwirth, A., Giwercman, A., Tournaye, H., Diemer, T., Kopa, Z., Dohle, G., Krausz, C., & European Association of Urology Working Group on Male Infertility (2012). European Association of Urology guidelines on Male Infertility: the 2012 update. *European urology*, 62(2), 324–332. <https://doi.org/10.1016/j.eururo.2012.04.048>
9. Krausz, C., & Riera-Escamilla, A. (2018). Genetics of male infertility. *Nature reviews. Urology*, 15(6), 369–384. <https://doi.org/10.1038/s41585-018-0003-3>
10. Krausz C. (2011). Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best practice & research. Clinical endocrinology & metabolism*, 25(2), 271–285. <https://doi.org/10.1016/j.beem.2010.08.006>
11. Agarwal, A., Baskaran, S., Parekh, N., Cho, C. L., Henkel, R., Vij, S., Arafa, M., Panner Selvam, M. K., & Shah, R. (2021). Male infertility. *Lancet (London, England)*, 397(10271), 319–333. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)32667-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(20)32667-2)
12. Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine (2015). Diagnostic evaluation of the infertile male: a committee opinion. *Fertility and sterility*, 103(3), e18–e25. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2014.12.103>

13. Schlegel, P. N., Sigman, M., Collura, B., De Jonge, C. J., Eisenberg, M. L., Lamb, D. J., Mulhall, J. P., Niederberger, C., Sandlow, J. I., Sokol, R. Z., Spandorfer, S. D., Tanrikut, C., Treadwell, J. R., Oristaglio, J. T., & Zini, A. (2021). Diagnosis and Treatment of Infertility in Men: AUA/ASRM Guideline Part I. *The Journal of urology*, 205(1), 36–43. <https://doi.org/10.1097/JU.0000000000001521>
14. Esteves, S. C., Miyaoka, R., & Agarwal, A. (2011). An update on the clinical assessment of the infertile male. [corrected]. *Clinics (Sao Paulo, Brazil)*, 66(4), 691–700. <https://doi.org/10.1590/s1807-59322011000400026>
15. WHO, Department of Reproductive Health and Research. WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen, 5th edn. Geneva: World Health Organization, 2010.
16. Colpi, G. M., Francavilla, S., Haidl, G., Link, K., Behre, H. M., Goulis, D. G., Krausz, C., & Giwercman, A. (2018). European Academy of Andrology guideline Management of oligo-astheno-teratozoospermia. *Andrology*, 6(4), 513–524. <https://doi.org/10.1111/andr.12502>
17. Aitken, R. J., Baker, H. W., & Irvine, D. S. (1995). On the nature of semen quality and infertility. *Human reproduction (Oxford, England)*, 10(2), 248–249. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.humrep.a135922>
18. Nagirnaja, L., Lopes, A. M., Charng, W. L., Miller, B., Stakaitis, R., Golubickaite, I., Stendahl, A., Luan, T., Friedrich, C., Mahyari, E., Fadial, E., Kasak, L., Vigh-Conrad, K., Oud, M. S., Xavier, M. J., Cheers, S. R., James, E. R., Guo, J., Jenkins, T. G., Riera-Escamilla, A., ... Conrad, D. F. (2022). Diverse monogenic subforms of human spermatogenic failure. *Nature communications*, 13(1), 7953. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-35661-z>
19. Houston, B. J., Riera-Escamilla, A., Wyrwoll, M. J., Salas-Huetos, A., Xavier, M. J., Nagirnaja, L., Friedrich, C., Conrad, D. F., Aston, K. I., Krausz, C., Tüttelmann, F., O'Bryan, M. K., Veltman, J. A., & Oud, M. S. (2021). A systematic review of the validated monogenic causes of human male infertility: 2020 update and a discussion of emerging gene-disease relationships. *Human reproduction update*, 28(1), 15–29. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmab030>
20. Signore, F., Gulia, C., Votino, R., De Leo, V., Zaami, S., Putignani, L., Gigli, S., Santini, E., Bertacca, L., Porrello, A., & Piergentili, R. (2019). The Role of Number of Copies, Structure, Behavior and Copy Number Variations (CNV) of the Y Chromosome in Male Infertility. *Genes*, 11(1), 40. <https://doi.org/10.3390/genes11010040>
21. Tournaye, H., Krausz, C., & Oates, R. D. (2017). Novel concepts in the aetiology of male reproductive impairment. *The lancet. Diabetes & endocrinology*, 5(7), 544–553. [https://doi.org/10.1016/S2213-8587\(16\)30040-7](https://doi.org/10.1016/S2213-8587(16)30040-7)
22. Bhasin, S., O'Leary, M. P., & Basaria, S. S. (2021). *Essentials of men's health*. McGraw-Hill.

23. Ring, J. D., Lwin, A. A., & Köhler, T. S. (2016). Current medical management of endocrine-related male infertility. *Asian journal of andrology*, 18(3), 357–363. <https://doi.org/10.4103/1008-682X.179252>
24. Colaco, S., & Modi, D. (2018). Genetics of the human Y chromosome and its association with male infertility. *Reproductive biology and endocrinology: RB&E*, 16(1), 14. <https://doi.org/10.1186/s12958-018-0330-5>
25. Linn, E., Ghanem, L., Bhakta, H., Greer, C., & Avella, M. (2021). Genes Regulating Spermatogenesis and Sperm Function Associated With Rare Disorders. *Frontiers in cell and developmental biology*, 9, 634536. <https://doi.org/10.3389/fcell.2021.634536>
26. Ruthig, V. A., & Lamb, D. J. (2022). Updates in Sertoli Cell-Mediated Signaling During Spermatogenesis and Advances in Restoring Sertoli Cell Function. *Frontiers in endocrinology*, 13, 897196. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.897196>
27. Arafa, M., Elbardisi, H., Majzoub, A., & Agarwal, A. (2020). *Genetics of male infertility: A case-based guide for Clinicians*. Springer International Publishing.
28. Cioppi, F., Rosta, V., & Krausz, C. (2021). Genetics of Azoospermia. *International journal of molecular sciences*, 22(6), 3264. <https://doi.org/10.3390/ijms22063264>
29. Britannica, T. Editors of Encyclopaedia (2023, August 9). spermatogenesis. Encyclopedia Britannica. <https://www.britannica.com/science/spermatogenesis>
30. Kasak, L., & Laan, M. (2021). Monogenic causes of non-obstructive azoospermia: challenges, established knowledge, limitations and perspectives. *Human genetics*, 140(1), 135–154. <https://doi.org/10.1007/s00439-020-02112-y>
31. Kuchakulla, M., Narasimman, M., Khodamoradi, K., Khosravizadeh, Z., & Ramasamy, R. (2021). How defective spermatogenesis affects sperm DNA integrity. *Andrologia*, 53(1), e13615. <https://doi.org/10.1111/and.13615>
32. Tarozzi, N., Nadalini, M., Coticchio, G., Zacà, C., Lagalla, C., & Borini, A. (2021). The paternal toolbox for embryo development and health. *Molecular human reproduction*, 27(7), gaab042. <https://doi.org/10.1093/molehr/gaab042>
33. Hotaling, J., & Carrell, D. T. (2014). Clinical genetic testing for male factor infertility: current applications and future directions. *Andrology*, 2(3), 339–350. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2014.00200.x>
34. Miharū N. (2005). Chromosome abnormalities in sperm from infertile men with normal somatic karyotypes: oligozoospermia. *Cytogenetic and genome research*, 111(3-4), 347–351. <https://doi.org/10.1159/000086909>

35. Calogero, A. E., Burrello, N., De Palma, A., Barone, N., D'Agata, R., & Vicari, E. (2003). Sperm aneuploidy in infertile men. *Reproductive biomedicine online*, 6(3), 310–317. [https://doi.org/10.1016/s1472-6483\(10\)61850-0](https://doi.org/10.1016/s1472-6483(10)61850-0)
36. Chatziparasidou, A., Christoforidis, N., Samolada, G., & Nijs, M. (2015). Sperm aneuploidy in infertile male patients: a systematic review of the literature. *Andrologia*, 47(8), 847–860. <https://doi.org/10.1111/and.12362>
37. Igaz, P., & Patocs, A. (2019). *Genetics of endocrine diseases and syndromes*. Cham: Springer.
38. Cerván-Martín, M., Castilla, J. A., Palomino-Morales, R. J., & Carmona, F. D. (2020). Genetic Landscape of Nonobstructive Azoospermia and New Perspectives for the Clinic. *Journal of clinical medicine*, 9(2), 300. <https://doi.org/10.3390/jcm9020300>
39. Ghieh, F., Mitchell, V., Mandon-Pepin, B., & Vialard, F. (2019). Genetic defects in human azoospermia. *Basic and clinical andrology*, 29, 4. <https://doi.org/10.1186/s12610-019-0086-6>
40. Ferrás, C., Costa, P., Fernandes, S., Carvalho, F., Marques, J., Alves, C., Pinho, M., Almeida, C., Silva, J., Viana, P., Sousa, S., Gonçalves, A., Ferrás, L., Sousa, M., & Barros, A. (2004). Importância do Estudo das Microdeleções do Cromossoma Y na Infertilidade Masculina. *Acta Urológica*, 21, 4.
41. Hughes, J. F., & Page, D. C. (2015). The Biology and Evolution of Mammalian Y Chromosomes. *Annual review of genetics*, 49, 507–527. <https://doi.org/10.1146/annurev-genet-112414-055311>
42. McGowan-Jordan, J., Hastings, R. J., & Moore, S. (2020). *ISCN 2020: An international system for human cytogenomic nomenclature (2020)*. Karger.
43. Amor, D. J., M., G. R. J., & Sutherland, G. R. (2018). *Gardner and Sutherland's chromosome abnormalities and genetic counseling*. Oxford University Press.
44. Rhie, A., Nurk, S., Cechova, M., Hoyt, S. J., Taylor, D. J., Altemose, N., Hook, P. W., Koren, S., Rautiainen, M., Alexandrov, I. A., Allen, J., Asri, M., Bzikadze, A. V., Chen, N. C., Chin, C. S., Diekhans, M., Flicek, P., Formenti, G., Functammasan, A., Garcia Giron, C., ... Phillippy, A. M. (2023). The complete sequence of a human Y chromosome. *Nature*, 10.1038/s41586-023-06457-y. Advance online publication. <https://doi.org/10.1038/s41586-023-06457-y>
45. Schneider, V. A., Graves-Lindsay, T., Howe, K., Bouk, N., Chen, H. C., Kitts, P. A., Murphy, T. D., Pruitt, K. D., Thibaud-Nissen, F., Albracht, D., Fulton, R. S., Kremitzki, M., Magrini, V., Markovic, C., McGrath, S., Steinberg, K. M., Auger, K., Chow, W., Collins, J., Harden, G., ... Church, D. M. (2017). Evaluation of GRCh38 and de novo

- haploid genome assemblies demonstrates the enduring quality of the reference assembly. *Genome research*, 27(5), 849–864. <https://doi.org/10.1101/gr.213611.116>
46. Helena Mangs, A., & Morris, B. J. (2007). The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future. *Current genomics*, 8(2), 129–136. <https://doi.org/10.2174/138920207780368141>
 47. Sadeghi-Nejad, H., & Farrokhi, F. (2007). Genetics of azoospermia: current knowledge, clinical implications, and future directions. Part II: Y chromosome microdeletions. *Urology journal*, 4(4), 192–206.
 48. Skaletsky, H., Kuroda-Kawaguchi, T., Minx, P. J., Cordum, H. S., Hillier, L., Brown, L. G., Repping, S., Pyntikova, T., Ali, J., Bieri, T., Chinwalla, A., Delehaunty, A., Delehaunty, K., Du, H., Fewell, G., Fulton, L., Fulton, R., Graves, T., Hou, S. F., Latrielle, P., ... Page, D. C. (2003). The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature*, 423(6942), 825–837. <https://doi.org/10.1038/nature01722>
 49. GRIPENBERG U. (1964). SIZE VARIATION AND ORIENTATION OF THE HUMAN Y CHROMOSOME. *Chromosoma*, 15, 618–629. <https://doi.org/10.1007/BF00319995>
 50. Navarro-Costa, P., Gonçalves, J., & Plancha, C. E. (2010). The AZFc region of the Y chromosome: at the crossroads between genetic diversity and male infertility. *Human reproduction update*, 16(5), 525–542. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmq005>
 51. Lange, J., Noordam, M. J., van Daalen, S. K., Skaletsky, H., Clark, B. A., Macville, M. V., Page, D. C., & Repping, S. (2013). Intrachromosomal homologous recombination between inverted amplicons on opposing Y-chromosome arms. *Genomics*, 102(4), 257–264. <https://doi.org/10.1016/j.ygeno.2013.04.018>
 52. Krausz, C., & Casamonti, E. (2017). Spermatogenic failure and the Y chromosome. *Human genetics*, 136(5), 637–655. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1793-8>
 53. Trombetta, B., & Cruciani, F. (2017). Y chromosome palindromes and gene conversion. *Human genetics*, 136(5), 605–619. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1777-8>
 54. Kim, J. W., Park, S. Y., Ryu, H. M., Lee, D. E., Lee, B. Y., Kim, S. Y., Park, Y. S., Lee, H. S., & Seo, J. T. (2012). Molecular and clinical characteristics of 26 cases with structural Y chromosome aberrations. *Cytogenetic and genome research*, 136(4), 270–277. <https://doi.org/10.1159/000338413>

55. Krausz, C., Hoefsloot, L., Simoni, M., Tüttelmann, F., European Academy of Andrology, & European Molecular Genetics Quality Network (2014). EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology*, 2(1), 5–19. <https://doi.org/10.1111/j.2047-2927.2013.00173.x>
56. 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. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2012.01.099>
57. Vogt P. H. (2004). Molecular genetics of human male infertility: from genes to new therapeutic perspectives. *Current pharmaceutical design*, 10(5), 471–500. <https://doi.org/10.2174/1381612043453261>
58. Nussbaum, R., McInnes, R., Willard, H., & Hamosh, A. (2016). *Thompson & Thompson Genetics in medicine*. Elsevier.
59. Turnpenny, P. D., Ellard, S., & Cleaver, R. (2022). *Emery's elements of medical genetics and Genomics*. Elsevier.
60. Flannigan, R., & Schlegel, P. N. (2017). Genetic diagnostics of male infertility in clinical practice. *Best practice & research. Clinical obstetrics & gynaecology*, 44, 26–37. <https://doi.org/10.1016/j.bpobgyn.2017.05.002>
61. Kanakis, G. A., & Nieschlag, E. (2018). Klinefelter syndrome: more than hypogonadism. *Metabolism: clinical and experimental*, 86, 135–144. <https://doi.org/10.1016/j.metabol.2017.09.017>
62. Foresta, C., Galeazzi, C., Bettella, A., Marin, P., Rossato, M., Garolla, A., & Ferlin, A. (1999). Analysis of meiosis in intratesticular germ cells from subjects affected by classic Klinefelter's syndrome. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 84(10), 3807–3810. <https://doi.org/10.1210/jcem.84.10.6029>
63. Groth, K. A., Skakkebaek, A., Høst, C., Gravholt, C. H., & Bojesen, A. (2013). Clinical review: Klinefelter syndrome--a clinical update. *The Journal of clinical endocrinology and metabolism*, 98(1), 20–30. <https://doi.org/10.1210/jc.2012-2382>
64. Lanfranco, F., Kamischke, A., Zitzmann, M., & Nieschlag, E. (2004). Klinefelter's syndrome. *Lancet (London, England)*, 364(9430), 273–283. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(04\)16678-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(04)16678-6)
65. Zitzmann, M., Aksglaede, L., Corona, G., Isidori, A. M., Juul, A., T'Sjoen, G., Kliesch, S., D'Hauwers, K., Toppari, J., Słowikowska-Hilczer, J., Tüttelmann, F., & Ferlin, A. (2021). European academy of andrology guidelines on Klinefelter Syndrome Endorsing Organization: European Society of Endocrinology. *Andrology*, 9(1), 145–167. <https://doi.org/10.1111/andr.12909>

66. Gravholt, C. H., Chang, S., Wallentin, M., Fedder, J., Moore, P., & Skakkebaek, A. (2018). Klinefelter Syndrome: Integrating Genetics, Neuropsychology, and Endocrinology. *Endocrine reviews*, 39(4), 389–423. <https://doi.org/10.1210/er.2017-00212>
67. Corona, G., Pizzocaro, A., Lanfranco, F., Garolla, A., Pelliccione, F., Vignozzi, L., Ferlin, A., Foresta, C., Jannini, E. A., Maggi, M., Lenzi, A., Pasquali, D., Francavilla, S., & Klinefelter ItaliaN Group (KING) (2017). Sperm recovery and ICSI outcomes in Klinefelter syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Human reproduction update*, 23(3), 265–275. <https://doi.org/10.1093/humupd/dmx008>
68. Wisniewski, A. B., Batista, R. L., Costa, E. M. F., Finlayson, C., Sircili, M. H. P., Dénes, F. T., Domenice, S., & Mendonca, B. B. (2019). Management of 46,XY Differences/Disorders of Sex Development (DSD) Throughout Life. *Endocrine reviews*, 40(6), 1547–1572. <https://doi.org/10.1210/er.2019-00049>
69. Ren, H., Chow, V., & Ma, S. (2015). Meiotic behaviour and sperm aneuploidy in an infertile man with a mosaic 45,X/46,XY karyotype. *Reproductive biomedicine online*, 31(6), 783–789. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2015.08.016>
70. Malan, V., Gesny, R., Morichon-Delvallez, N., Aubry, M. C., Benachi, A., Sanlaville, D., Turleau, C., Bonnefont, J. P., Fekete-Nihoul, C., & Vekemans, M. (2007). Prenatal diagnosis and normal outcome of a 46,XX/46,XY chimera: a case report. *Human reproduction (Oxford, England)*, 22(4), 1037–1041. <https://doi.org/10.1093/humrep/del480>
71. Li, T. F., Wu, Q. Y., Zhang, C., Li, W. W., Zhou, Q., Jiang, W. J., Cui, Y. X., Xia, X. Y., & Shi, Y. C. (2014). 46,XX testicular disorder of sexual development with SRY-negative caused by some unidentified mechanisms: a case report and review of the literature. *BMC urology*, 14, 104. <https://doi.org/10.1186/1471-2490-14-104>
72. Harton, G. L., & Tempest, H. G. (2012). Chromosomal disorders and male infertility. *Asian journal of andrology*, 14(1), 32–39. <https://doi.org/10.1038/aja.2011.66>
73. Berookhim, B. M., & Schlegel, P. N. (2014). Azoospermia due to spermatogenic failure. *The Urologic clinics of North America*, 41(1), 97–113. <https://doi.org/10.1016/j.ucl.2013.08.004>
74. Slimani, W., Jelloul, A., Al-Rikabi, A., Sallem, A., Hasni, Y., Chachia, S., Ernez, A., Chaieb, A., Bibi, M., Liehr, T., Saad, A., & Mougou-Zerelli, S. (2020). Small supernumerary marker chromosomes (sSMC) and male infertility: characterization of five new cases, review of the literature, and perspectives. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 37(7), 1729–1736. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01811-9>

75. Yang, Y., & Hao, W. (2019). Clinical, cytogenetic, and molecular findings of isodicentric Y chromosomes. *Molecular cytogenetics*, 12, 55. <https://doi.org/10.1186/s13039-019-0465-x>
76. Liehr, T., Ewers, E., Kosyakova, N., Klaschka, V., Rietz, F., Wagner, R., & Weise, A. (2009). Handling small supernumerary marker chromosomes in prenatal diagnostics. Expert review of molecular diagnostics, 9(4), 317–324. <https://doi.org/10.1586/erm.09.17>
77. Deng, C. Y., Zhang, Z., Tang, W. H., & Jiang, H. (2023). Microdeletions and vertical transmission of the Y-chromosome azoospermia factor region. *Asian journal of andrology*, 25(1), 5–12. <https://doi.org/10.4103/aja2021130>
78. Thirumavalavan, N., Gabrielsen, J. S., & Lamb, D. J. (2019). Where are we going with gene screening for male infertility?. *Fertility and sterility*, 111(5), 842–850. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2019.03.036>
79. Hastings, R. J., Cavani, S., Bricarelli, F. D., Patsalis, P. C., Kristoffersson, U., & ECA PWG Co-ordinators (2007). Cytogenetic Guidelines and Quality Assurance: a common European framework for quality assessment for constitutional and acquired cytogenetic investigations. *European journal of human genetics: EJHG*, 15(5), 525–527. <https://doi.org/10.1038/sj.ejhg.5201809>
80. Stone, B. A., Alex, A., Werlin, L. B., & Marrs, R. P. (2013). Age thresholds for changes in semen parameters in men. *Fertility and sterility*, 100(4), 952–958. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.05.046>
81. Harris, I. D., Fronczak, C., Roth, L., & Meacham, R. B. (2011). Fertility and the aging male. *Reviews in urology*, 13(4), e184–e190.
82. Helena Mangs, A., & Morris, B. J. (2007). The Human Pseudoautosomal Region (PAR): Origin, Function and Future. *Current genomics*, 8(2), 129–136. <https://doi.org/10.2174/138920207780368141>
83. Kumar, P., Jain, M., Kalsi, A. K., & Halder, A. (2018). Molecular characterisation of a case of dicentric Y presented as nonobstructive azoospermia with testicular early maturation arrest. *Andrologia*, 50(2), 10.1111/and.12886. <https://doi.org/10.1111/and.12886>
84. Lange, J., Skaletsky, H., van Daalen, S. K., Embry, S. L., Korver, C. M., Brown, L. G., Oates, R. D., Silber, S., Repping, S., & Page, D. C. (2009). Isodicentric Y chromosomes and sex disorders as byproducts of homologous recombination that maintains palindromes. *Cell*, 138(5), 855–869. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2009.07.042>

85. Kalantari, H., Asia, S., Totonchi, M., Vazirinasab, H., Mansouri, Z., Zarei Moradi, S., Haratian, K., Gourabi, H., & Mohseni Meybodi, A. (2014). Delineating the association between isodicentric chromosome Y and infertility: a retrospective study. *Fertility and sterility*, 101(4), 1091–1096. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.12.048>
86. Abur, U., Gunes, S., Hekim, N., Akar, O. S., Altundag, E., & Asci, R. (2022). Clinical, cytogenomic, and molecular characterization of isodicentric Y-chromosome and prediction of testicular sperm retrieval outcomes in azoospermic and severe oligozoospermic infertile men. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 39(12), 2799–2810. <https://doi.org/10.1007/s10815-022-02632-8>
87. Li, T. F., Wu, Q. Y., Zhang, C., Li, W. W., Zhou, Q., Jiang, W. J., Cui, Y. X., Xia, X. Y., & Shi, Y. C. (2014). 46,XX testicular disorder of sexual development with SRY-negative caused by some unidentified mechanisms: a case report and review of the literature. *BMC urology*, 14, 104. <https://doi.org/10.1186/1471-2490-14-104>
88. Franchim, C. S., Soares-Junior, J. M., Serafini, P. C., Monteleone, P. A. A., Coccuzza, M. S., Zanardo, E. A., Montenegro, M. M., Dias, A. T., Kulikowski, L. D., & Baracat, E. C. (2020). Efficacy of MLPA for detection of Y-chromosome microdeletions in infertile Brazilian patients. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 37(5), 1251–1259. <https://doi.org/10.1007/s10815-020-01777-8>
89. Abid, S., Sagare-Patil, V., Gokral, J., & Modi, D. (2013). Cellular ontogeny of RBMY during human spermatogenesis and its role in sperm motility. *Journal of biosciences*, 38(1), 85–92. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9281-8>
90. Elliott, D. J., Oghene, K., Makarov, G., Makarova, O., Hargreave, T. B., Chandley, A. C., Eperon, I. C., & Cooke, H. J. (1998). Dynamic changes in the subnuclear organisation of pre-mRNA splicing proteins and RBM during human germ cell development. *Journal of cell science*, 111 (Pt 9), 1255–1265. <https://doi.org/10.1242/jcs.111.9.1255>
91. Tse, J. Y., Wong, E. Y., Cheung, A. N., O, W. S., Tam, P. C., & Yeung, W. S. (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. <https://doi.org/10.1095/biolreprod.103.015792>
92. Rozen, S. G., Marszalek, J. D., Irenze, K., Skaletsky, H., Brown, L. G., Oates, R. D., Silber, S. J., Ardlie, K., & Page, D. C. (2012). AZFc deletions and spermatogenic failure: a population-based survey of 20,000 Y chromosomes. *American journal of human genetics*, 91(5), 890–896. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2012.09.003>
93. Liu, X., Zhang, H., Yu, Y., Fei, J., Jiang, Y., Liu, R., Wang, R., & Zhang, G. (2020). Deletion of b1/b3 shows risk for expansion of Yq microdeletion in male offspring: Case report of novel Y chromosome variations. *Medicine*, 99(37), e22124. <https://doi.org/10.1097/MD.00000000000022124>

94. Huang, I. S., Fantus, R. J., Chen, W. J., Wren, J., Kao, W. T., Huang, E. Y., Bennett, N. E., Brannigan, R. E., & Huang, W. J. (2020). Do partial AZFc deletions affect the sperm retrieval rate in non-mosaic Klinefelter patients undergoing microdissection testicular sperm extraction?. *BMC urology*, 20(1), 21. <https://doi.org/10.1186/s12894-020-00587-5>
95. Bansal, S. K., Jaiswal, D., Gupta, N., Singh, K., Dada, R., Sankhwar, S. N., Gupta, G., & Rajender, S. (2016). Gr/gr deletions on Y-chromosome correlate with male infertility: an original study, meta-analyses, and trial sequential analyses. *Scientific reports*, 6, 19798. <https://doi.org/10.1038/srep19798>
96. Shahid, M., Dhillon, V. S., Khalil, H. S., Sexana, A., & Husain, S. A. (2011). Associations of Y-chromosome subdeletion gr/gr with the prevalence of Y-chromosome haplogroups in infertile patients. *European journal of human genetics : EJHG*, 19(1), 23–29. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2010.151>
97. Hopps, C. V., Mielnik, A., Goldstein, M., Palermo, G. D., Rosenwaks, Z., & Schlegel, P. N. (2003). Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Human reproduction (Oxford, England)*, 18(8), 1660–1665. <https://doi.org/10.1093/humrep/deg348>
98. Vozdova, M., Oracova, E., Kasikova, K., Prinosilova, P., Rybar, R., Horinova, V., Gaillyova, R., & Rubes, J. (2013). Balanced chromosomal translocations in men: relationships among semen parameters, chromatin integrity, sperm meiotic segregation and aneuploidy. *Journal of assisted reproduction and genetics*, 30(3), 391–405. <https://doi.org/10.1007/s10815-012-9921-9>
99. Lu, C., Jiang, J., Zhang, R., Wang, Y., Xu, M., Qin, Y., Lin, Y., Guo, X., Ni, B., Zhao, Y., Diao, N., Chen, F., Shen, H., Sha, J., Xia, Y., Hu, Z., & Wang, X. (2014). Gene copy number alterations in the azoospermia-associated AZFc region and their effect on spermatogenic impairment. *Molecular human reproduction*, 20(9), 836–843. <https://doi.org/10.1093/molehr/gau043>
100. Xie, S., Zhang, Y., & Yang, Y. (2020). Is the primary AZFc duplication a potential risk for male infertility?: A systematic review and meta-analysis. *Andrology*, 8(5), 996–1004. <https://doi.org/10.1111/andr.12800>
101. Zhou, R., Cheng, J., Ma, D., Tan, J., Wang, Y., Hu, P., & Xu, Z. (2019). Identifying Novel Copy Number Variants in Azoospermia Factor Regions and Evaluating Their Effects on Spermatogenic Impairment. *Frontiers in genetics*, 10, 427. <https://doi.org/10.3389/fgene.2019.00427>
102. Yang, B., Ma, Y. Y., Liu, Y. Q., Li, L., Yang, D., Tu, W. L., Shen, Y., Dong, Q., & Yang, Y. (2015). Common AZFc structure may possess the optimal spermatogenesis efficiency relative to the rearranged structures mediated by non-allele homologous recombination. *Scientific reports*, 5, 10551. <https://doi.org/10.1038/srep10551>