



## Pesquisa de microdeleções AZF em homens inférteis na população portuguesa

Iris Pereira-Caetano<sup>1</sup>, Júlia Silva<sup>1</sup>, Sónia Correia<sup>2</sup>,  
Maria Graça Pinto<sup>2</sup>, Ricardo Rangel<sup>2</sup>, Ana Aguiar<sup>3</sup>,  
Joaquim Nunes<sup>3</sup>, Carlos Calhaz<sup>3</sup>, João Gonçalves<sup>1</sup>

[joao.goncalves@insa.min-saude.pt](mailto:joao.goncalves@insa.min-saude.pt)

(1) Unidade de Genética Molecular. Departamento de Genética Humana, INSA.

(2) Unidade de Medicina da Reprodução, Maternidade Dr. Alfredo da Costa.

(3) Unidade de Medicina da Reprodução. Departamento de Obstetria, Ginecologia e Medicina da Reprodução, Hospital de Santa Maria.

### Introdução

A infertilidade conjugal, definida como a incapacidade de conceção de um casal ao fim de um ano de relações sexuais desprotegidas, afeta 10 a 15% dos casais em idade reprodutiva, sendo que as causas masculinas constituem 30 a 40% das causas de infertilidade dos casais. Etiologicamente, a infertilidade masculina pode ter origem genética e não genética. De entre as causas genéticas mais frequentes destacam-se as alterações numéricas ou estruturais dos cromossomas, as mutações no gene *CFTR* e as microdeleções do cromossoma Y.

No braço longo do cromossoma Y, em Yq11.2, localizam-se três regiões AZF (*Azoospermia factor*), AZFa, AZFb e AZFc, fundamentais para a fertilidade masculina uma vez que possuem múltiplos genes com expressão testicular implicados nas diferentes etapas da espermatogénese (1,2). As microdeleções do Y podem abranger uma ou mais destas regiões, e dependendo da região AZF deletada ou ausente, a fertilidade pode ser mais ou menos afetada, observando-se diferentes padrões histológicos testiculares, que vão desde o síndrome de só-células-de-sertoli (deleção de AZFa), a paragem de maturação dos gametas durante a meiose (deleção AZFb) e a hipoespermatogénese (deleção de AZFc) (2). Estas microdeleções representam a segunda causa genética mais frequente de falha espermatogénica em homens inférteis a seguir ao síndrome de klinefelter (cariotipo 47,XXY) (3).

O diagnóstico molecular das microdeleções AZF no cromossoma Y é um teste genético recomendado por rotina em homens inférteis que apresentem oligozoospermia grave ( $<5 \times 10^6$  espermatozoides/ml de sêmen ejaculado) ou azoospermia secretora de causa desconhecida (4).

### Objetivos e métodos

O presente trabalho compreende os resultados da pesquisa molecular das microdeleções AZF no cromossoma Y realizada em 865 homens com infertilidade idiopática, 270 com diagnóstico clínico de azoospermia e 595 com oligozoospermia grave ( $<5 \times 10^6$  espermatozoides/ml). Neste estudo, foram excluídos os homens que apresentavam alterações endocrinológicas, varicocele, criptorquidia, orquite, doença sistémica, anomalias cromossómicas autossómicas e anomalias numéricas dos cromossomas sexuais, ou sujeitos a fatores de risco profissionais, e ainda homens cuja informação clínica disponibilizada foi insuficiente para os incluir nos dois grupos referidos. Paralelamente, analisaram-se 300 homens férteis (com pelo menos um descendente) da população portuguesa.

A análise molecular compreendeu a amplificação enzimática múltipla (PCR-Múltipla) de sequências de genes e de *loci* específicos de cada uma das três regiões AZF, bem como do gene *SRY* (gene determinante testicular) localizado no braço curto do Y, em amostras de DNA genómico obtidas de sangue periférico. Na presença de uma microdeleção, foram efetuadas reações de PCR-múltiplas adicionais com marcadores específicos por forma a caracterizar os seus pontos de quebra.

### Resultados

Neste estudo consideraram-se apenas as deleções AZF completas (não foram consideradas as deleções parciais em AZFc). Dos 865 doentes inférteis estudados, em 49 (5,7%) detetaram-se microdeleções AZF. Estas microdeleções foram exclusivas dos homens com azoospermia secretora (27/270, 10,0%) ou com oligozoospermia grave (22/595, 3,7%), não tendo sido detetadas deleções AZF na população masculina fértil.



artigos breves\_ n. 1

Das 27 microdeleções AZF detetadas em homens azoospermicos, 9 (3,3%) eliminam AZFc, 4 (1,5%) AZFb, 1 (0,4%) AZFa, 10 (3,7%) AZFb+c e 3 (1,1%) AZFa+b+c. Os 22 casos de microdeleções em homens com oligozoospermia grave compreendem unicamente AZFc (**Tabela 1**). Assim, os homens com azoospermia apresentaram heterogeneidade na natureza e extensão das microdeleções AZF. Das microdeleções identificadas, a deleção de AZFc é a mais frequente (63%, **Gráfico 1**).

Relativamente a este teste genético, a Unidade de Genética Molecular do Departamento de Genética Humana - Instituto Nacional de Saúde Doutor Ricardo Jorge participou anualmente, desde 2000, nos ensaios experimentais de avaliação externa da qualidade organizados e avaliados pela EMQN (*The European Molecular Genetics Quality Network*), tendo obtido sempre a classificação máxima em todos os parâmetros avaliados (genotigagem, interpretação de resultados, identificação correta dos utentes e a clareza do relatório).

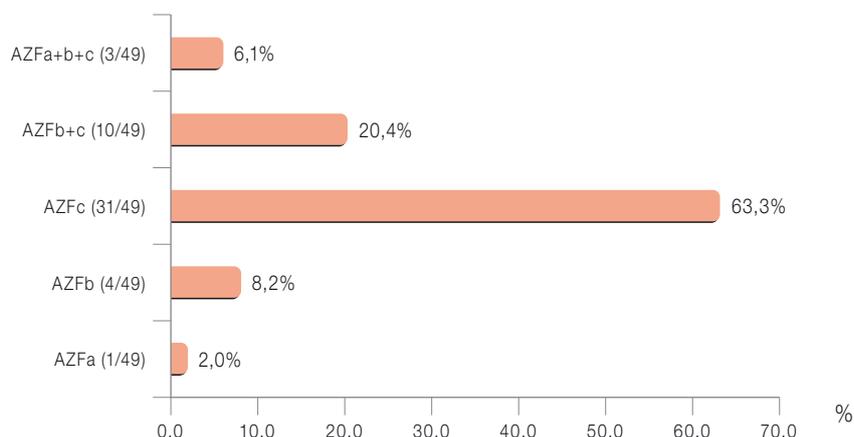
**\_Discussão e conclusões**

As microdeleções na região AZF do cromossoma Y representam um fator genético condicionante da espermatogénese, estando a sua localização associada a fenótipos histológicos testiculares diversos, que originam desde azoospermia secretora a hipoespermatogénese. Assim, a deleção de toda a região AZFa impede a diferenciação das células germinais causando o síndrome de só-células-de-sertoli, as deleções extensas da região AZFb causam a paragem na maturação dos gâmetas (predominantemente em espermatócito primário ou secundário), enquanto as microdeleções AZFc afetam maioritariamente a quantidade de espermatozoides produzidos, e assim a deleção completa desta região está associada a fenótipos histológicos diversos, resultando em gametogénese reduzida (oligozoospermia grave) ou em situações de azoospermia secretora (2). De acordo com os estudos internacionais, as microdeleções AZF são responsáveis por 10 a 15% dos casos de azoospermia secretora (não obstrutiva) e por 3 a 5% dos

**Tabela 1:** Distribuição da frequência das microdeleções AZF identificadas nos dois grupos de homens inférteis.

	Deleção AZF (%)					Total
	AZFc	AZFb	AZFa	AZFb+c	AZFa+b+c	
Azoospermicos	9(3,3%)	4(1,5%)	1(0,4%)	10(3,7%)	3(1,1%)	27(10,0%)
Oligozoospermicos	22(3,7%)	0	0	0	0	22(3,7%)

**Gráfico 1:** Tipo de microdeleção identificada e sua frequência relativa.





artigos breves\_ n. 1

casos de oligozoospermia grave, permanecendo a maioria dos casos com a causa da infertilidade por identificar (3, 5).

A ausência de AZFc é a única compatível com a produção de gâmetas. Na presença de uma deleção AZFc em homens azoospermicos, a probabilidade de detetar espermatozóides por biópsia testicular é de 50 a 60% (4). Assim, mediante aconselhamento genético e reunidas as condições específicas no âmbito da medicina da reprodução, poderá ser proposto a estes homens/casais a fertilização intracitoplasmática de espermatozóides (ICSI), visando proporcionar-lhes descendência.

Os nossos resultados são concordantes e confirmam os dados referidos na bibliografia demonstrando claramente que as microdeleções AZF no cromossoma Y constituem uma causa comum de infertilidade masculina. O seu estudo molecular assume uma grande importância no diagnóstico de infertilidade de um casal uma vez que pode conduzir à identificação da causa da infertilidade no mesmo, bem como confirmar o diagnóstico clínico. A deteção de uma microdeleção AZF permite estabelecer a causa da insuficiência da gametogénese, tem valor prognóstico dado que é possível informar da probabilidade de sucesso na obtenção de espermatozóides para microinjecção intracitoplasmática e desta forma contribuir significativamente para a decisão clínica e tratamento a propor aos casais. Na presença de deleções AZFb, AZFb+c, AZFa, AZFa+b ou AZFa+b+c, não existe indicação para realização de biópsia testicular. O aconselhamento genético é recomendado sempre que seja detetada uma microdeleção AZF, e torna-se particularmente relevante para AZFc uma vez que esta, por ICSI, será obrigatoriamente transmitida à descendência masculina, vindo a afetar provavelmente a sua fertilidade.

A adoção das recomendações internacionais para o diagnóstico molecular das microdeleções AZF no cromossoma Y deve ser uma prática comum dos laboratórios que oferecem este teste genético, bem como a participação anual em ensaios específicos de avaliação externa da qualidade, uma vez que permite a melhoria contínua do seu desempenho (4).

Referências bibliográficas:

- (1) Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, et al. Human Y Chromosome Azoospermia Factors (AZF) Mapped to Different Subregions in Yq11. *Hum Mol Genet.* 1996;5(7):933-43. [LINK](#)
- (2) Navarro-Costa P, Plancha CE, Gonçalves J. Genetic Dissection of the AZF Regions of the Human Y Chromosome: Thriller or Filler for Male (In) fertility?. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:936569. doi: 10.1155/2010/936569. Epub 2010 Jun 30. [LINK](#)
- (3) Hotaling J, Carrell DT. Clinical genetic testing for male factor infertility: current applications and future directions. *Andrology.* 2014;2(3):339-50.
- (4) Krausz C, Hoefsloot L, Simoni M, et al.; European Academy of Andrology; European Molecular Genetics Quality Network. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of Y-chromosomal microdeletions: state-of-the-art 2013. *Andrology.* 2014;2(1):5-19. [LINK](#)
- (5) Krausz C. Male infertility: pathogenesis and clinical diagnosis. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 2011;25(2):271-85.