



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA

2009/2010

Joana Pereira da Cruz
Factores genéticos na infertilidade masculina

Abril, 2010

FMUP



FACULDADE DE MEDICINA
UNIVERSIDADE DO PORTO

Joana Pereira da Cruz
Factores genéticos na infertilidade masculina

Mestrado Integrado em Medicina

Área: Genética Médica

**Trabalho efectuado sobre a Orientação de:
Prof. Dr. Alberto Manuel Barros da Silva**

Revista: Arquivos de Medicina

Abril, 2010

FMUP

Nome: Joana Pereira da Cruz

Endereço electrónico: m04201@med.up.pt

Título da Dissertação/Monografia/Relatório de Estágio:

Factores genéticos na infertilidade masculina

Nome completo do Orientador: Prof. Dr. Alberto Manuel Barros da Silva

Nome completo do Co-Orientador:

Ano de conclusão: 2010

Designação da área do projecto de opção: Genética Médica

É autorizada a reprodução integral desta Dissertação/Monografia/Relatório de Estágio (*cortar o que não interessar*) apenas para efeitos de investigação, mediante declaração escrita do interessado, que a tal se compromete.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 20 / 4 / 2010

Assinatura: Joana Pereira da Cruz

Eu, Joana Pereira da Cruz, abaixo assinado, nº mecanográfico 040801201, aluno do 6º ano do Mestrado Integrado em Medicina, na Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, declaro ter actuado com absoluta integridade na elaboração deste projecto de opção.

Neste sentido, confirmo que NÃO incorri em plágio (acto pelo qual um indivíduo, mesmo por omissão, assume a autoria de um determinado trabalho intelectual, ou partes dele). Mais declaro que todas as frases que retirei de trabalhos anteriores pertencentes a outros autores, foram referenciadas, ou redigidas com novas palavras, tendo colocado, neste caso, a citação da fonte bibliográfica.

Faculdade de Medicina da Universidade do Porto, 20 / 4 / 2010

Assinatura: Joana Pereira da Cruz

Factores genéticos na infertilidade masculina

Genetic factors associated with male infertility

Cruz, Joana Pereira da*

* Aluna do 6º ano do Curso de Mestrado Integrado em Medicina da Faculdade de Medicina da
Universidade do Porto

Correspondência:

Rua José Figueiras, 146

4900-723 Viana do Castelo

Telemóvel: 917131764

E-mail: m04201@med.up.pt

Contagem de palavras:

Resumo: 183 palavras

Abstract: 140 palavras

Texto: 3711 palavras

Agradecimentos:

Ao Prof. Dr. Alberto Barros, pela disponibilidade e orientação.

Aos meus pais, pelo incentivo e apoio constantes.

Ao João Júlio, pela amizade e motivação.

Resumo:

A infertilidade é um problema de saúde pública *major* a nível mundial, que atinge 15% dos casais em idade fértil em todo o mundo. As alterações genéticas, incluindo aberrações cromossómicas e mutações génicas, são responsáveis por 15% dos casos de infertilidade masculina. Os mecanismos de selecção natural impedem, através da incapacidade de conceber, que estas mutações sejam transmitidas à descendência. Actualmente, estes mecanismos podem ser transpostos com o recurso a técnicas de reprodução medicamente assistidas, cada vez mais generalizadas. Como tal, é essencial que, durante o processo de avaliação de um casal com infertilidade, se proceda à identificação de possíveis anomalias genéticas, de forma a assegurar um correcto aconselhamento genético. Estudos citogenéticos efectuados ao longo dos últimos 20 anos em gâmetas de homens portadores de alterações genéticas, identificaram uma elevada taxa de aneuploidias. Estas anomalias são consequência directa da anomalia genética constitucional ou secundárias a um erro meiótico induzido por um ambiente testicular desfavorável.

Esta monografia tem como objectivo relatar e discutir os conhecimentos clínicos, citogenéticos e moleculares conhecidos actualmente, relativamente aos factores genéticos mais associados com infertilidade masculina, mais prevalentes na população.

Palavras Chave: infertilidade masculina, genética, cromossoma Y.

Abstract:

Infertility is a major public health problem, affecting 15% of couples worldwide. Genetic causes account for 15% of severe male infertility, including chromosome abnormalities and single gene mutations. Natural selection prevents the transmission of mutations causing infertility, while this protective mechanism may be overcome by assisted reproduction techniques. Consequently, it is extremely important to proceed to the identification of genetic factors in infertile couple and provide genetic counseling. Cytogenetic studies performed over the past 20 years revealed a higher rate of aneuploid sperm in men suffering from any genetic alteration. These abnormalities may be a direct consequence of the constitutional genetic abnormality or caused by meiotic errors induced by the altered testicular environment that these men present. This monograph aims to report and discuss the clinical, cytogenetic and molecular knowledge about the most prevalent genetic abnormalities associated with male infertility.

Keywords: male infertility, genetics, Y chromosome

Índice:

Resumo e palavras chave	Pág.3
Lista de abreviaturas e siglas	Pág.6
Lista de tabelas e figuras	Pág.6
Introdução	Pág.7
Anomalias Cromossômicas	Pág.9
<i>Síndrome de Klinefelter e Mosaicos XXY</i>	Pág.10
<i>47,XXY</i>	Pág.12
<i>Translocações Recíprocas</i>	Pág.13
<i>Translocações Recíprocas autossomas-gonossomas</i>	Pág.14
<i>Translocações Robertsonianas</i>	Pág.15
Genética Molecular	Pág.17
<i>Microdeleções do cromossoma Y</i>	Pág.17
Conclusão	Pág.21
Referências Bibliográficas	Pág.22

Lista de abreviaturas e siglas:

- ACBVD - Ausência congénita bilateral de vasos deferentes.
- ACUVD - Ausência congénita unilateral de vasos deferentes.
- ANO - Azoospermia não obstrutiva.
- ATP - Adenosina trifosfato.
- AZF - Azoospermic Factor.
- ICSI - Injecção Intracitoplasmática de Espermatozóides.
- MSY - Male-specific Y.
- NOR – Nucleolar organizer genes.
- RHNA - Recombinação homóloga não alélica.
- RMA - Reprodução medicamente assistida.
- SCS - Síndrome de Células de Sertoli.
- SK - Síndrome de Klinefelter.
- TESE – Extracção de espermatozóides testiculares.
- Yq - Braço longo do cromossoma Y.

Lista de figuras e tabelas:

- Tabela 1** – Exemplos de alterações genéticas (cromossómicas e mutações génicas) responsáveis por infertilidade masculinaPág.8
- Figura 1** – Exemplo de um espermatozóide humano no estadio de paquitenoPág.9
- Figura 2** - Efeitos da não-disjunção meiótica e mitótica na origem do Síndrome de Klinefelter clássico e mosaicoPág.11
- Figura 3** – Recombinações cromossómicas possíveis nos gâmetas de portadores de translocações recíprocasPág.13
- Figura 4** – Possíveis padrões de segregação para os gâmetas formados por um portador de uma translocação robertsoniana 14/21Pág.16

Introdução:

A infertilidade foi definida pela Organização Mundial de Saúde como a incapacidade de conceber após dois anos de relações sexuais não protegidas ⁽¹⁾ e estima-se que atinja 15% dos casais em idade fértil em todo o mundo, independentemente de factores étnicos, culturais ou socioeconómicos. ⁽²⁾ Em Portugal, a prevalência da infertilidade ao longo da vida situa-se entre os 9 e os 10%. ⁽³⁾

Apesar dos avanços observados nas últimas décadas na área da reprodução medicamente assistida (RMA), a infertilidade permanece um problema de saúde pública *major* a nível mundial que, para além de consequências epidemiológicas ou demográficas, levanta conflitos de índole humana e social: para muitos casais, a incapacidade de ter um filho é uma tragédia, e a confluência de expectativas pessoais, interpessoais, sociais e religiosas, conduzem a sensações de fracasso, perda e exclusão. ⁽¹⁾

Ao longo da história e em todas as civilizações, a mulher tem sido o símbolo da fertilidade, e a incapacidade de conceber interpretada como uma disfunção no sistema reprodutor feminino. ⁽³⁾ Hoje, sabemos que o potencial de reprodução de um casal depende da coordenação e da combinação das funções de ambos os sistemas reprodutivos ⁽²⁾ sendo identificada uma etiologia masculina em 30 a 50% dos casos. ⁽⁴⁾

A infertilidade masculina é uma entidade multifactorial que pode ocorrer isoladamente ou no contexto de várias síndromes complexas. Na sua origem podem estar malformações anatómicas, disfunções da gametogénese, endocrinopatias, distúrbios imunológicos, perturbações ejaculatórias ou exposição a determinados agentes ambientais. ⁽²⁾ Actualmente, as alterações genéticas, incluindo aberrações cromossómicas e mutações génicas, são responsáveis por 15% dos casos de infertilidade masculina ⁽⁵⁾ (Tabela 1).

Durante as últimas décadas, foram identificados vários mecanismos moleculares e genéticos envolvidos no processo da reprodução que, quando alterados, resultam em infertilidade. Este trabalho não tem por objectivo rever todas as alterações moleculares ou polimorfismos genéticos presumivelmente associados com a infertilidade masculina, mas sim sistematizar os conhecimentos clínicos, citogenéticos e moleculares das condições mais prevalentes na população.

Anomalias Cromossómicas	Genética Molecular
<ul style="list-style-type: none"> • Síndrome de Klinefelter e Mosaicos XXY • 47,XYY • Translocações Recíprocas • Translocações Recíprocas autossomas-gonossomas • Translocações Robertsonianas 	<ul style="list-style-type: none"> • Microdelecções do cromossoma Y • Fibrose cística • Discinesia ciliar primária • Persistência dos ductos de Müller • Síndrome de Asrkog-Scott • Síndrome de Kallmann • Hipoplasia congénita da supra-renal • Síndrome de infertilidade masculina • Atrofia muscular espinhal e bulbar ligada ao cromossoma X • Distrofia miotónica • Síndrome de Kearns-Sayre • Adrenomielloneuropatia • Síndrome de falência poliglandular I e II • Síndrome de Bardet-Biedl • Síndrome de Noonan • Dissomias uniparentais

Tabela 1 – Exemplos de alterações genéticas (cromossómicas e mutações génicas) responsáveis por infertilidade masculina.

Anomalias cromossómicas:

As anomalias cromossómicas, relativamente comuns na espécie humana, resultam da perda, ganho ou rearranjo anormal de 1 ou mais dos 46 cromossomas. A maioria destas anomalias são acontecimentos *de novo*, secundárias a mutações nas células germinativas parentais, podendo igualmente ser herdadas com um padrão de transmissão mendeliano.⁽⁶⁾

Desde há muito se sabe que os indivíduos portadores de anomalias cromossómicas somáticas, de número ou estrutura, têm maior probabilidade de infertilidade, abortos espontâneos de repetição ou maior risco de gerarem filhos portadores de deficiências graves.⁽⁴⁾ De facto, constatou-se que a prevalência de anomalias cromossómicas em homens inférteis é superior à da população em geral, variando inversamente com a contagem espermática, estando presente em 19% dos homens com azoospermia não obstrutiva (ANO).⁽⁷⁾

Nas últimas décadas, a descoberta de determinadas proteínas do complexo sináptico (SCP1 e



Figura 1 – Exemplo de um espermatozóide humano no estágio de paquíteno. Complexos sinápticos (vermelho), centrómeros (azul) e locais de recombinação homólogos (amarelo).

Retirado de: Tempest H.G., Martin R.H.; Cytogenetic risks in chromosomally normal infertile men. *Curr Opin Obstet Gynecol.* 21:223-227 (2009) (com a autorização do autor).

SCP2), do centrómero (CREST) e de locais de recombinação homólogos (MLH1), permitiu um estudo mais aprofundado e uma melhor compreensão dos processos de recombinação durante a meiose⁽⁸⁾ (Figura 1). A análise por imunofluorescência de espermatozóides de homens inférteis, em particular daqueles com ANO, revelou uma elevada prevalência de erros no emparelhamento e na recombinação dos cromossomas durante a meiose, com consequente formação de um número significativo de espermatozóides aneuplóides.⁽⁹⁾

As técnicas de RMA disponíveis actualmente permitiram a muitos homens inférteis, portadores de uma taxa elevada de aneuploidias

espermáticas, realizar o sonho de serem pais. A Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides (ICSI), uma das técnicas de RMA mais utilizada em indivíduos com ANO, consiste na introdução de um espermatozóide no interior de um único óvulo, permitindo que sejam ultrapassados os mecanismos e barreiras da selecção natural e que a aneuploidia seja transmitida à geração seguinte. De facto, a análise dos vários estudos feitos até à data em concepções por ICSI, revela um risco de aneuploidias na descendência destes indivíduos, pelo menos três vezes superior à da população em geral.⁽⁸⁾ A comunidade científica tem feito vários apelos para que se proceda sistematicamente ao estudo do cariótipo dos homens que pretendam recorrer a estas técnicas, assim como ao estudo citogenético dos respectivos espermatozóides, de forma a evitar a transmissão dos erros cromossómicos à descendência.⁽⁵⁾

a) Síndrome de Klinefelter e Mosaicos XXY

Descrita em 1942 por Harry F. Klinefelter, a Síndrome de Klinefelter (SK) é a aneuploidia dos cromossomas sexuais mais vezes encontrada no sexo masculino, com uma prevalência de 1/600 na população em geral.⁽¹⁰⁾

A SK caracteriza-se pela polissomia do cromossoma X, sendo a dissomia X (47,XXY) a variante mais vezes encontrada.⁽¹⁰⁾ Em 90% dos casos, o cariótipo 47,XXY surge espontaneamente aquando da não-disjunção de um par de cromossomas X, durante a meiose I ou II da ovogénese/espermatogénese parental. Os restantes 10% apresentam uma forma mosaico da Síndrome (46XY/47XXY) e resultam da não-disjunção mitótica do cromossoma X após fertilização do zigoto⁽¹¹⁾ (Figura 2).

O cromossoma X compreende cerca de 1100 genes essenciais ao normal funcionamento dos testículos e cérebro.⁽¹²⁾ Assim, apesar de poderem apresentar um amplo espectro de fenótipos distintos, os indivíduos com SK manifestam essencialmente disfunções nestes dois sistemas orgânicos.⁽¹¹⁾

A SK é uma das principais causas de hipogonadismo primário e uma das causas genéticas mais frequentes de infertilidade. A sua prevalência na população masculina infértil é de 4%, atingindo os 11% em homens com ANO.⁽¹⁰⁾ Tipicamente, estes pacientes apresentam níveis baixos de

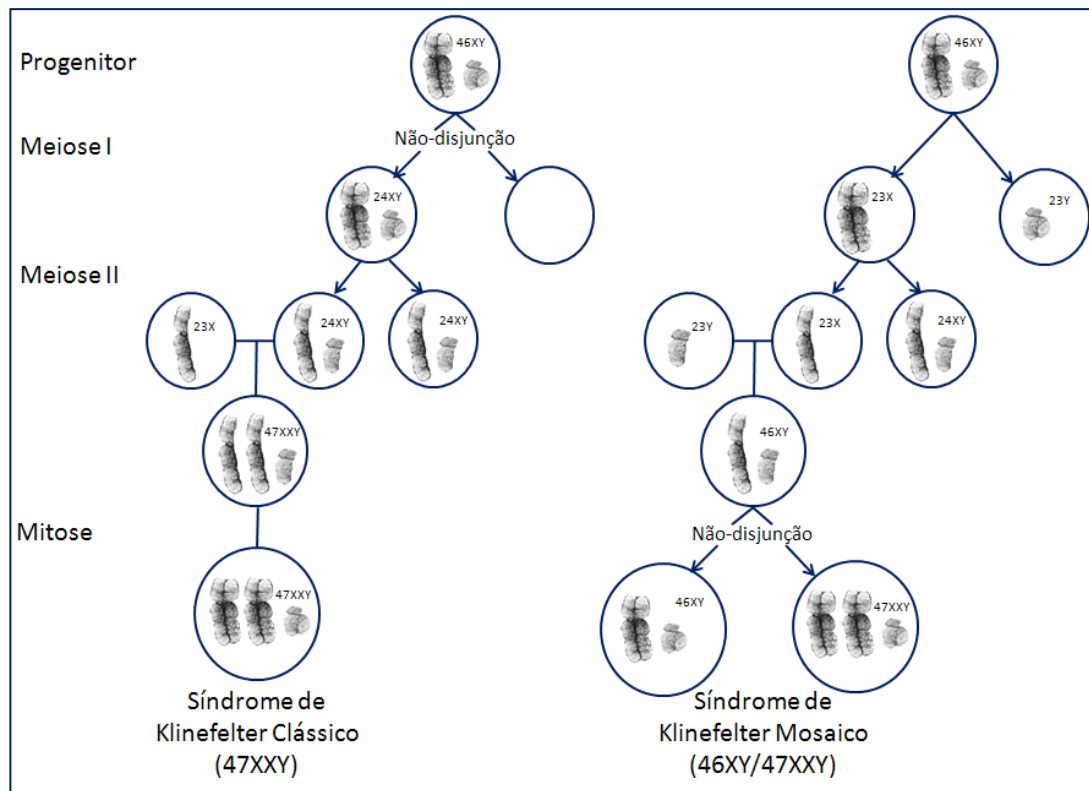


Figura 2 - Efeitos da não-disjunção meiótica e mitótica na origem do Síndrome de Klinefelter clássico (A) e mosaico (B).

testosterona e aumento da secreção de FSH e LH, secundária à ausência de *feedback* inibitório (hipogonadismo hipergonadotrófico). A histologia testicular de adultos com SK revela fibrose extensa e hialinização dos túbulos seminíferos, ausência de espermatogénese e hiperplasia das células de Leydig e do interstício. ⁽¹⁰⁾

A variante mosaico da SK é geralmente menos severa do que a forma clássica. Estes doentes podem apresentar testículos de tamanho normal, sendo menos frequente a ginecomastia e a azoospermia. ⁽⁶⁾

Apesar de serem tradicionalmente descritos como inférteis, alguns pacientes com SK apresentam focos com actividade espermática, permitindo a extracção de espermatozoides (TESE) maduros para a realização de ICSI. ⁽¹³⁾ O estudo citogenético destes espermatozoides, revelou que a frequência de aneuploidias dos cromossomas varia entre 1,5% ⁽¹⁴⁾ e 7% ⁽¹⁵⁾ nos indivíduos com a variante mosaico, e entre os 2% ⁽¹⁶⁾ e 25% ⁽¹⁷⁾ nos com a variante clássica da SK. Por outro lado, estes pacientes têm igualmente associado um risco aumentado de originar descendência com aneuploidias autossómicas, nomeadamente dissomia 13, 18 e 21. ⁽¹⁸⁾

A alta prevalência de aneuploidias espermáticas em pacientes com SK já foi explicada por duas teorias: a primeira afirma que espermatogónias 47,XXY prosseguem na meiose, resultando num aumento da incidência de hiperploídias; ⁽¹³⁾ a segunda teoria baseia-se no facto de existirem vários mecanismos de controlo da meiose, que levam à perda do cromossoma X adicional em fases precoces da espermatogénese. ⁽¹¹⁾ Nesse caso, apenas as espermatogónias normais 46,XY prosseguem na espermatogénese, num ambiente testicular desfavorável e propenso a novos erros de segregação cromossómicos, nomeadamente nos autossomas. ⁽¹³⁾

A maioria das crianças geradas por ICSI com espermatozóides de homens com SK apresenta cariótipo normal. No entanto, perante um tratamento de fertilidade bem sucedido, é imperativo equacionar o risco de terem sido gerados embriões 47,XXY ou 47,XXX. ⁽⁵⁾

b) 47,XYY

A Síndrome 47,XYY é a segunda aneuploidia de cromossomas sexuais mais frequente, ⁽⁵⁾ ocorrendo entre 1/1000 e 4/1000 nascimentos do sexo masculino, ⁽⁶⁾ em consequência de uma não-disjunção na meiose II paterna. ⁽¹⁹⁾

Apesar de a maioria dos homens 47,XYY ser fértil, são mais frequentemente identificados na população infértil. O estudo citogenético dos espermatozóides de indivíduos com Síndrome 47,XYY, revelou uma frequência de aneuploidias variável entre 0,3% e 15%. ⁽⁹⁾ No entanto, um estudo recente efectuado em dois homens 47,XYY com oligozoospermia severa, demonstrou uma taxa de aneuploidias de 37-38%, metade das quais, aneuploidias dos cromossomas sexuais. ⁽²⁰⁾ De facto, foi sugerido que os indivíduos 47,XYY apresentam proporções variáveis de células germinativas mosaico XY/XYY de forma inversamente proporcional à contagem espermática, determinando o fenótipo fértil ou não fértil. ⁽²⁰⁾

A análise de células germinativas XYY no estadio de paquíteno, revelou diferentes configurações possíveis para o emparelhamento dos cromossomas sexuais. A configuração mais prevalente é o emparelhamento de dois cromossomas Y como bivalentes, permanecendo o cromossoma X isolado (YY+X). Outras configurações possíveis incluem (XY+Y), (X+Y+Y) e o

trivalente (XYY). Ao contrário do que acontece com as células (YY+X) que tendem a ser letais, verificou-se que as células (XY+Y) e o trivalente (XYY) progridem na espermatogênese, levando à produção de espermatozoides aneuploides (24,XY e 24,YY). Por outro lado, tal como em indivíduos com SK, foi relatado um aumento da prevalência de dissomias 13 e 21, assim como de nulissomias. ⁽²⁰⁾

c) Translocações Recíprocas

As translocações recíprocas balanceadas são a anomalia cromossômica de estrutura mais comum na espécie humana, com uma incidência de 1/1175 nascimentos. ⁽²¹⁾ Estas translocações consistem na troca de material genético entre os braços de dois cromossomas heterólogos, resultando na alterações sequencial do material genético, sem que seja alterada a quantidade de material cromossômico. ⁽²²⁾ A prevalência de translocações recíprocas em indivíduos inférteis (0,6% - 0,95%) é entre seis a doze vezes superior à encontrada na população em geral. ⁽²¹⁾

Durante a meiose I, estes cromossomas translocados formam quadrivalentes com os respectivos homólogos normais. Na segregação alterna formam-se espermatócitos cromossomicamente balanceados, com cromossomas portadores da translocação ou com os homólogos normais. Na segregação adjacente produzem-se gâmetas cromossomicamente não-balanceados, parcialmente nulissômicos ou dissômicos, responsáveis pela geração de embriões monossômicos ou trissômicos parciais ⁽²²⁾ (Figura 3).

Cada uma das translocações recíprocas é única do ponto de vista dos cromossomas envolvidos e dos locais onde

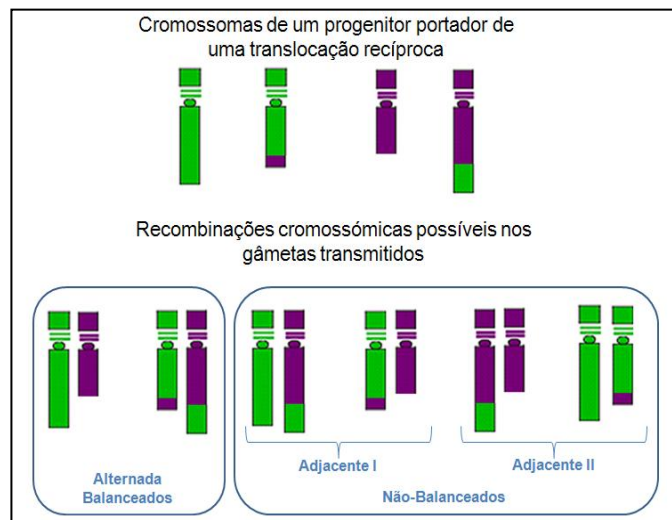


Figura 3 – Recombinações cromossômicas possíveis nos gâmetas de portadores de translocações recíprocas. Na segregação alterna forma-se espermatócitos cromossomicamente balanceados, portadores da translocação ou normais. Na segregação adjacente I, um cromossoma translocado segrega com o cromossoma normal não-homólogo envolvido na translocação. Na segregação adjacente II, um cromossoma translocado segrega num espermatócito II com o seu cromossoma homólogo normal.

ocorrem as rupturas. Como tal, a taxa de desequilíbrios encontrada nos espermatozoides de cada um dos portadores é extremamente variável (entre 18,6% ⁽²³⁾ e 93,4% ⁽²⁴⁾; média \approx 50%).⁽¹³⁾

A segregação adjacente I é mais frequente (incidência média de \approx 26,6%) do que a segregação adjacente II (incidência média de \approx 12,4%).⁽¹³⁾ Menos frequente é a segregação não-balanceada 3:1, na qual se formam gâmetas com 22 e 24 cromossomas, responsáveis por duplas monossomias ou duplas trissomias, respectivamente.⁽²²⁾ Neste tipo de segregação estão geralmente envolvidos cromossomas acrocêntricos, em particular o cromossoma 22. De facto, a translocação t(11;22)(q23;q11), a única translocação recíproca que surge de forma recorrente na espécie humana, origina uma segregação 3:1 em 30% dos seus espermatozoides.⁽¹³⁾ A segregação 4:0, que produz gâmetas com 21 e 25 cromossomas, é extremamente rara.⁽²²⁾

Vários autores têm evocado a hipótese de um efeito intercromossómico associado à presença de uma translocação recíproca. Este fenómeno consiste na não-disjunção meiótica de cromossomas não envolvidos directamente na translocação, e traduz-se na presença de trissomias livres e não homogêneas na descendência dos portadores de translocações recíprocas. Um dos casos mais frequentes é o da trissomia 21. No entanto, os estudos empreendidos no sentido de evidenciar este fenómeno permanecem contraditórios.⁽¹³⁾

d) Translocações recíprocas autossomas-gonossomas

O fenótipo e as consequências na fertilidade de uma translocação X-autossoma, variam em função do sexo do portador, da proporção de pontos de ruptura e do padrão de inactivação do cromossoma X. As mulheres portadoras deste tipo de translocação são globalmente férteis, apesar de manifestarem um risco aumentado de digenesia gonadal. Por sua vez, os homens apresentam ANO.⁽⁵⁾

A frequência de translocações Y-autossoma na população em geral é de 1/2000,⁽²⁵⁾ com um ligeiro predomínio na população com oligozoospermia (0,2%) e nos indivíduos que recorrem a ICSI (0,09%).⁽⁵⁾ Verificou-se que, em homens inférteis, o ponto de ruptura situa-se na região de heterocromatina Yq12, enquanto que em indivíduos estéreis, ocorre ruptura distalmente à região de eucromatina Yq11, no *locus* do AZF (*vide infra*).⁽⁵⁾

e) *Translocações Robertsonianas*

As translocações robertsonianas são uma anomalia cromossômica de estrutura frequente no sexo masculino, com uma incidência de 1/1085 nascimentos.⁽²¹⁾ Em 50% dos casos, resultam de processos *de novo*, podendo igualmente ser transmitidas pelos progenitores.⁽⁵⁾

Estas translocações caracterizam-se pela fusão dos braços longos de dois cromossomas acrocêntricos (13, 14, 15, 21 e 22), com a exclusão dos respectivos braços curtos ao longo de divisões posteriores.⁽²²⁾ No entanto, uma vez que os braços curtos dos cromossomas acrocêntricos são constituídos unicamente por genes NOR (*nucleolar organizer genes*), esta perda de material cromossômico não se traduz em consequências fenotípicas para os seus portadores.⁽²²⁾

A prevalência de translocações robertsonianas na população masculina infértil varia entre 0,8% e 0,95%, sendo nove a dez vezes superior à da população em geral.⁽²¹⁾ As alterações na fertilidade destes indivíduos resultam de defeitos na espermatogénese, directamente relacionados com perturbações no processo meiótico.⁽⁵⁾

Durante a meiose I, os cromossomas emparelham de forma trivalente, podendo segregar na forma alterna ou adjacente. Da segregação alterna resultam espermatozóides normais e espermatozóides aneuplóides balanceados (com a translocação do progenitor). Da segregação adjacente resultam gâmetas com diferentes conformações não-balanceadas, responsáveis pela formação de zigotos monossómicos ou trissómicos para um dos cromossomas envolvidos⁽²²⁾ (Figura 4). As monossomias não são compatíveis com a vida e a maioria das concepções trissómicas resulta em aborto espontâneo durante o primeiro trimestre da gravidez, apesar de alguns sobreviverem até ao segundo trimestre ou a termo.⁽²²⁾ Há, no entanto, uma categoria especial de translocações robertsonianas incapaz de originar um zigoto viável, mesmo com recurso a técnicas de RMA. É o caso das translocações que ocorrem entre cromossomas homólogos (por exemplo, dois cromossomas 13) que após a segregação, produzem obrigatoriamente embriões anormais trissómicos ou monossómicos.⁽⁴⁾

Os estudos da segregação meiótica em portadores de translocações robertsonianas concluíram que a segregação alterna é muito mais frequente (73,5%⁽²⁶⁾ - 96,6%⁽²⁷⁾) do que a segregação adjacente (2,7-26,5%⁽²⁷⁾). Segundo Luciani *et al.* 1984, este fenómeno é explicado pelo facto de, durante a segregação, o trivalente adoptar preferencialmente uma configuração *cis*, a qual, ao contrário da configuração *trans*, promove a segregação alterna.⁽²⁸⁾

Por outro lado, verificou-se que a taxa média de desequilíbrios também varia em função da translocação envolvida. De facto, nas translocações mais comuns (como a t(13;14) ou a t(14;21)), os desequilíbrios são menos frequentes (10-15%⁽²⁹⁻³⁰⁾) do que nas translocações ditas de mais raras (15-30%⁽³¹⁾). Nestas últimas, o ponto de ruptura pericentromérico é aparentemente mais aleatório, originando emparelhamentos meióticos mais variáveis e consequentemente desequilíbrios mais marcados.⁽¹³⁾ Estes dados sustentam a ideia de que a segregação meiótica não é um processo aleatório com uma distribuição equiprovável de todos os tipos de desequilíbrios cromossómicos,⁽²²⁾ mas sim que a prevalência destes varia em função do tipo de translocação, dos cromossomas envolvidos e dos pontos onde ocorre ruptura.⁽¹³⁾

Apesar de inconclusivos, alguns estudos têm documentado um risco aumentado de aneuploidias em cromossomas não envolvidos na translocação (efeito intercromossómico) na descendência de portadores de translocações robertsonianas.⁽²²⁾

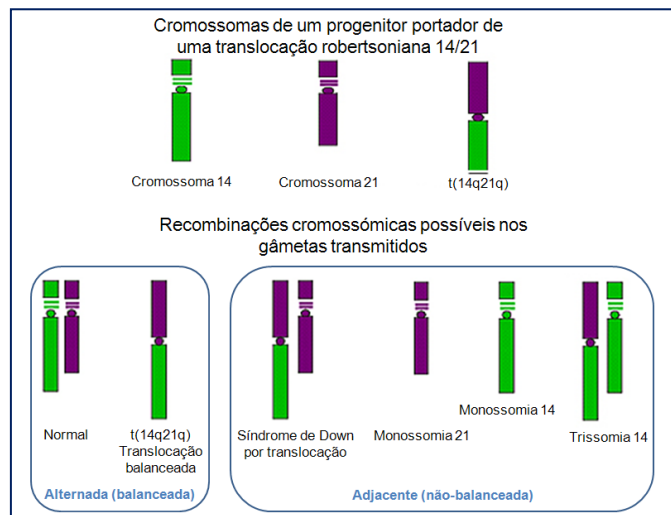


Figura 4 – Possíveis padrões de segregação para os gametas formados por um portador de uma translocação robertsoniana 14/21.

A segregação alternada produz ou uma constituição cromossómica normal ou um portador de translocação com um fenótipo normal. A segregação adjacente produz gametas não-balanceados e em concepções como o Síndrome de Down por translocação, monossomia 21, trissomia do 14 ou monossomia do 14.

Genética Molecular:

Foi identificado um número considerável de genes, com funções essenciais nas diferentes etapas da reprodução humana, que quando ausentes ou mutados, originam anomalias no sistema reprodutor masculino.⁽³²⁾

a) *Microdelecções do cromossoma Y*

Os cromossomas X e Y humanos, à semelhança de outros animais, evoluíram de um par de autossomas normal que deixou de recombinar entre si há mais de 300 milhões de anos. Ao longo do tempo, a ausência de recombinação permitiu que estas regiões geneticamente isoladas acumulassem mutações, deleções, inserções e sequências repetitivas, em favor da sua diferenciação.⁽³³⁾

O cromossoma Y, o mais pequeno do genoma humano (60 milhões de pares de base), é constituído maioritariamente (95%) por regiões não-recombinantes, denominadas de MSY (“*male-specific Y*”).⁽³³⁾ Aproximadamente um terço da eucromatina dessas regiões consiste em sequências de repetição *amplificonic* (incluindo repetições directas, repetições invertidas e palindrómos) dispersas ao longo dos braços longos e curtos do cromossoma Y, capazes de estabelecer recombinação homóloga não alélica (RHNA) entre si.⁽³⁴⁾

Uma vez que não existe no genoma humano qualquer contrapartida para o emparelhamento mitótico e recombinação meiótica das regiões MSY, estima-se que esta arquitectura molecular incomum tenha evoluído no sentido de proteger, a longo prazo, a integridade genética do cromossoma Y.⁽³⁵⁾ Por outro lado, a junção permanente de duas regiões *amplificonic* espacialmente separadas, pode resultar na perda de todo o material cromossómico intermédio. Assim, a RHNA é a principal responsável pela maioria destas microdelecções, não visíveis citogenicamente.⁽³⁵⁾

Em 1976,⁽³⁶⁾ foi pela primeira vez levantada a hipótese de uma relação causal entre microdelecções envolvendo o braço longo do cromossoma Y (Yq) e infertilidade, postulando-se a existência de um gene específico responsável pela fertilidade masculina (AZF, *Azoospermic Factor*) na região Yq11.23 do cromossoma Y.⁽³²⁾ Actualmente, o *locus* AZF é subdividido em três *loci*

funcionais distintos: AZFa, AZFb e AZFc, cada um contendo vários genes, com funções distintas nas diferentes fases do desenvolvimento da célula germinativa masculina.⁽³⁷⁾

As microdelecções do Yq representam a causa genética molecular mais frequente de infertilidade masculina severa, com uma prevalência de 10-15% nos indivíduos com ANO e oligozoospermia severa.⁽⁵⁾

A região AZFa situa-se na porção proximal de Yq e contém dois genes codificadores: *DDX3Y* (também conhecido por *DBY*) e *USP9Y*, ladeados por dois elementos retrovirais (HERV15yq1 e HERV15yq2) que estabelecem RHNA entre si.⁽³⁵⁾ O gene *DDX3Y* codifica uma helicase de RNA dependente de adenosina trifosfato (ATP), expressa em espermatogónias e cuja deleção foi associada a disfunções em fases pré-meióticas da espermatogénese. Por sua vez, o gene *USP9Y* codifica uma protease envolvida na regulação do metabolismo protéico em espermatídeos, e as deleções que o envolvem foram associadas a disfunções em fases pós-meióticas.⁽³⁷⁾ As microdelecções completas de AZFa são encontradas em aproximadamente 1% dos homens ANO⁽³⁵⁾ e manifestam-se pelo Síndrome de Células de Sertoli (SCS), o qual se caracteriza pela presença de células de Sertoli na ausência completa de células germinativas.⁽³⁷⁾ De facto, verificou-se que estes indivíduos apresentam patologia restrita ao testículo, sem alterações fenotípicas somáticas, sugerindo que estas proteínas desempenham unicamente funções nas células germinativas masculinas.⁽³⁷⁾

O segmento cromossómico que se encontra entre a porção proximal do palíndromo P5 e a porção distal de P1, está repleta de sequências passíveis de realizar RHNA, podendo resultar microdelecções com diferentes comprimentos. Três destas microdelecções são clinicamente relevantes: AZFb de 6,2Mb de comprimento (P5/P1 Proximal), AZFb/AZFc de 7,7Mb (P5/P1 Distal) e AZFc (b2/b4) que representa o fragmento entre a porção distal de P3 e a porção distal de P1, com 3,5Mb de comprimento.⁽³⁵⁾

As microdelecções AZFb ou AZFb/AZFc são encontrados em cerca de 1-2% dos homens com ANO.⁽³⁵⁾ Foram identificadas duas proteínas funcionais na região AZFb (HSFY e RBMY), expressas em células germinativas masculinas pré-meióticas, que contribuem para o controlo da proliferação e

diferenciação das espermatogónias e cuja supressão ou disfunção é suficiente para causar interrupção da meiose.⁽³⁷⁾

As microdelecções AZFc são as mais vezes encontradas em indivíduos inférteis (60% dos casos de microdelecção Yq),⁽³⁴⁾ ocorrendo em 13% dos homens com ANO e em 6% dos indivíduos com oligozoospermia severa.⁽³⁵⁾ A deleção completa de AZFc (b2/b4) remove oito famílias de genes, incluindo todos os membros da família de genes *DAZ*: o principal responsável pelo fenótipo AZFc.⁽⁵⁾ O gene *DAZ*, codifica uma proteína de ligação ao RNA, expressa exclusivamente em células germinativas precoces e presumivelmente responsável pela activação de mRNA silencioso em estádios de pré-meiose. Verificou-se que a AZFc não é crítica para a recombinação meiótica, mas que a ausência de determinadas regiões AZFc resultam na extensão dos estádios de transição de zigoteno e na redução da condensação cromossómica.⁽³⁵⁾ De facto, dentro do grupo de indivíduos com deleções AZFc, encontram-se fenótipos espermatogénicos diferentes, com um espectro clínico que varia entre oligozoospermia severa e azoospermia.⁽⁵⁾

Embora a maioria das microdelecções AZFc seja completa, foram relatadas várias microdelecções intra AZFc de comprimento mais curto, nomeadamente b2/b3, b1/b3 ou gr/gr. Esta última remove um dos pares do genes *DAZ*, não tendo sido ainda completamente esclarecido o seu efeito em anomalias da espermatogénese.⁽³⁵⁾

A maioria dos indivíduos portadores de microdelecções Yq recorre à ICSI para ultrapassar a infertilidade. No entanto, uma vez que todos os espermatozóides destes indivíduos transportam a microdelecção, esta será inevitavelmente transmitida aos descendentes do sexo masculino.⁽⁵⁾

O estudo citogenético de espermatozóides de indivíduos com microdelecções Yq demonstrou um risco aumentado de nulissomias ($11,9 \pm 3,2$ versus $1,1 \pm 0,2$, $P < 0,01$) e de dissomias XY ($4,1 \pm 1,2$ versus $0,2 \pm 0,5$, $P < 0,01$), quando comparados com a população em geral.⁽³⁸⁾ A alta prevalência de espermatozóides nulissómicos nomeadamente em portadores de deleções submicroscópicas, sugere uma instabilidade generalizada do cromossoma Y, eventualmente mais acentuada nas células germinativas.⁽⁵⁾ Como tal, as microdelecções AZF podem ser interpretadas como "pré-mutações" que favorecem a perda subsequente de todo o cromossoma Y, aumentando o risco de gerar embriões

45,X.⁽⁵⁾ Embora não tenham sido reportadas anomalias genitais ou outros defeitos somáticos em descendentes de ICSI, o aconselhamento genético deve ter em conta todas estas observações.⁽⁵⁾

Conclusão:

A infertilidade é uma realidade em crescimento, numa sociedade envelhecida, com taxa de natalidade em diminuição e com fácil acesso às últimas técnicas.

Desde 1978, ano em que foi anunciado o nascimento do primeiro “bebé-proveta”, o aperfeiçoamento das técnicas de RMA permitiu o nascimento de mais um milhão e meio de crianças. Perante a ânsia de um casal em ter um filho e apesar de uma eventual concretização com recurso a técnicas de RMA, o lado artificial do processo não pode ser esquecido. Ao transporem os mecanismos e barreiras de selecção natural, estas técnicas favorecem a formação e transmissão de anomalias genéticas à descendência, com repercções clínicas e social ainda por quantificar.

Estudos citogenéticos efectuados ao longo dos últimos 20 anos em gâmetas de homens portadores de alterações genéticas, demonstraram um risco elevado de produzir espermatozóides com aneuploidias. Estes dados foram sustentados pela elevada prevalência de aneuploidias nas crianças, filhas destes indivíduos, geradas por ICSI.

Como tal, é essencial que, durante o processo de avaliação de um casal com infertilidade, se proceda à identificação de possíveis anomalias genéticas, de forma a assegurar um correcto aconselhamento genético.

Referências Bibliográficas:

- 1) **Rutstein S.O., Shah I.H.;** DHS Comparative Reports N°9 - Infecundity, Infertility, and Childlessness in Developing Countries. *World Health Organization*. 2004.
- 2) **Martzuk M.M., Lamb D.L.;** Genetic dissection of mammalian fertility pathways. *Nat. Med.* 2002; 8(1):41-49.
- 3) **Silva Carvalho J.L., Santos A.;** Estudo Afrodite - Caracterização da Infertilidade em Portugal. Estudo na Comunidade.
- 4) **Martin R.H.;** Cytogenetic determinants of male fertility. *Hum Reprod Update*. 2008; 14(4):379-390.
- 5) **Ferlin A., Arredi B., Foresta C.;** Genetic causes of male infertility. *Reprod Toxicol*. 2006; 22:133-141.
- 6) **Mak V., Jarvi K.A.;** The Genetics of Male Infertility. *J Urol*. 1996; 156:1245-1257.
- 7) **Yoshida A., Kazukiyo M., Masafumi S.;** Cytogenetic survey of 1,007 males. *Urol Int*. 1997; 58:166–176. Citado em (4).
- 8) **Tempest H.G., Martin R.H.;** Citogenetic risks in chromosomally normal infertile men. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2009; 21:223-227.
- 9) **Shi Q., Martin R.H.;** Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men. *Reprod*. 2001; 121(5):655-666.
- 10) **Wikström A.M., Dunkel L.;** Testicular Function in Klinefelter Syndrome. *Horm Res*. 2008; 69:317–326.
- 11) **Paduch D.A., Fine R.G., Bolyakov A., Kiper J.;** New concepts in Klinefelter syndrome. *Curr Opin Urol*. 2008; 18:621–627.
- 12) **Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., et al;** The DNA sequence of human X chromosome. *Nature*. 2005; 434:325-337.
- 13) **Vialard F., Pellestor F.;** Intérêt de la cytogénétique des gamètes humain: résultats et perspectives. *Pathol Biol*. 2008; 56:388-399.

- 14) **Lim A.S., Fong Y., Yu S.L.;** Estimates of sperm sex chromosome disomy and diploidy rates in a 47,XXY/46,XY mosaic Klinefelter patient. *Hum Genet.* 1999; 104(5):405-9. Citado em (18).
- 15) **Kruse R., Guttenbach M., Schartmann B., Schubert R., van der Ven H., Schmid M., Propping P.;** Genetic counseling in a patient with XXY/XXXY/XY mosaic Klinefelter's syndrome: estimate of sex chromosome aberrations in sperm before intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1998; 69(3):482-5. Citado em (18).
- 16) **Rives N., Joly G., Machy A., Siméon N., Leclerc P., Macé B.;** Assessment of sex chromosome aneuploidy in sperm nuclei from 47,XXY and 46,XY/47,XXY males: comparison with fertile and infertile males with normal karyotype. *Mol Hum Reprod.* 2000; 6(2):107-12. Citado em (18).
- 17) **Estop A.M., Munné S., Ciepły K.M., Vandermark K.K., Lamb A.N., Fisch H.;** Meiotic products of a Klinefelter 47,XXY male as determined by sperm fluorescence in-situ hybridization analysis. *Hum Reprod.* 1998; 13(1):124-7. Citado em (18).
- 18) **Lanfranco F., Kamischke A., Zitzmann M., Nieschlag E.;** Klinefelter's syndrome. *Lancet.* 2004; 364:273-283.
- 19) **Chan Wong E., Ferguson K.A., Chow V., Ma S.;** Sperm aneuploidy and meiotic sex chromosome configurations in an infertile XYY male. *Hum Reprod.* 2008; 23 (2):374-378.
- 20) **Gonzalez-Merino E., Hans C., Abramowicz M., Englert Y., Emiliani S.;** Aneuploidy study in sperm and preimplantation embryos from nonmosaic 47,XYY men. *Fertil Steril.* 2007; 88(3):600-606.
- 21) **De Braekeleer M., Dao T.N.;** Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod.* 1991; 6:245-250. Citado em (22).
- 22) **Morel F., Douet-Guilbert N., Le Bris M.-J., Le Herry A., Amice V., Amice J., De Braekeleer M.;** Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis. *Int J Androl.* 2004; 27:200-212.

- 23) **Escudero T., Abdelhadi I., Sandalinas M., Munne S.**; Predictive value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis on the outcome of preimplantation genetic diagnosis for translocation. *Fertil Steril.* 2003; 79:1528-1534. Citado em (13).
- 24) **Baccetti B., Bruni E., Colledel G., Gambera L., Morretti E., Marzella R., et al**; 10, 15 reciprocal translocation in an infertile man: ultrastructural and fluorescence in situ hybridization sperm study: case report. *Hum Reprod.* 2003; 18(11):2302-2308. Citado em (13).
- 25) **Alves C., Carvalho F., Cremades N., Sousa M., Barros A.**; Unique (Y;13) translocation in a male with Oligozoospermia: cytogenetic and molecular studies. *Eur J Hum Genet.* 2002; 10:467-474.
- 26) **Martin R.H.**; Cytogenetic analysis of sperm from a male heterozygous for a 13;14 Robertsonian translocation. *Human Genetics.* 1988; 80:357-361. Citado em (22).
- 27) **Syme R.M., Martin R.H.**; Meiotic segregation of a 21;22 Robertsonian translocation. *Human Reprod.* 1992; 7:825-829. Citado em (22).
- 28) **Luciani J.M., Guichaoua M.R., Mattei A., Morazzani M.R.**; Pachytene analysis of a man with 13q;14q translocation and infertility. Behavior of the trivalent and nonrandom association with the sex vesicle. *Cytogenetics and Cell genetics.* 1984; 38:14-22. Citado em (22).
- 29) **Roux C., Tripogney C., Morel F., Joanne C., Fellmann F., Clavequin M.C., et al**; Segregation of chromosomes in sperm of Robertsonian translocation carriers. *Cytogenet Genome Res.* 2005; 111(3-4):291-306. Citado em (13).
- 30) **Ogur G., van Assche E., Vegetti W., Verheyen G., Tournaye H., Bonduelle M., et al**; Chromosomal segregation in spermatozoa of 14 Robertsonian translocation carriers. *Mol Hum Reprod.* 2006; 12(3):209-215. Citado em (13).
- 31) **Moradkhani K., Puechberty J., Bhatt S., Kespinnacle J., Vago P., Lefort G., et al**; Rare Robertsonian translocation and meiotic behavior: sperm FISH analysis of t(13;15) and t(14;15) translocation: a case report. *Hum Reprod.* 2006; 21(12):3193-3198. Citado em (13).

- 32) **Meschede D., Horst J.;** The molecular genetics of male infertility. *Mol Hum Reprod.* 1997; 3(5):419-430.
- 33) **Li Z., Haines J.C., Han Y.;** “Micro-deletions” of the human Y chromosome and their relationship with male infertility. *J Genet Genomics.* 2008; 35:193-199.
- 34) **Costa P., Gonçalves R., Ferrás C., Fernandes S., Fernandes A.T., Sousa M., Barros A.;** Identification of new breakpoints in AZFb and AZFc. *Mol Hum Reprod.* 2008; 14(4):251-258.
- 35) **Sadeghi-Nejad H., Oates R.D.;** The Y chromosome and male infertility. *Curr Opin Urol.* 18:628-632 (2008).
- 36) **Tiepolo L., Zuffardi O.;** Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet.* 1976; 34:119-124.
Citado em (32).
- 37) **Vogt P.H., Falcao C.L., Hanstein R., Zimmer J.;** The AZF proteins. *Int J Androl.* 2008; 31:383-394.
- 38) **Foresta C., Garolla A., Bartoloni L., Bettella A., Ferlin A.;** Genetic abnormalities among severely oligospermic men who are candidates for intracytoplasmatic sperm injection. *J Clin Endocrinol Metab.* 2005; 90:152-156. Citado em (5).