

# CROMOSSOMA Y E INFERTILIDADE MASCULINA

JOÃO GONÇALVES, JOÃO LAVINHA

Departamento de Genética Humana. Instituto Nacional de Saúde Dr. Ricardo Jorge. Lisboa.

## RESUMO

A espermatogénese é um processo fisiológico complexo, caracterizado pela ordenada proliferação e diferenciação das células da linha germinal, que se inicia nas células estaminais espermatogónicas diploides indiferenciadas até aos espermatídeos haploides e que, depois da espermiogénese, termina nos espermatozóides. Sabe-se que a capacidade reprodutora masculina está afectada em cerca de metade dos casais inférteis e que só existe tratamento eficaz para uma pequena fracção destes homens. Para a maioria destes doentes, a causa da infertilidade é desconhecida. Etiologicamente, a infertilidade masculina tem causas genéticas e não genéticas. De entre as causas genéticas que afectam a espermatogénese as anomalias cromossómicas, envolvendo autossomas e/ou os cromossomas sexuais, são as mais conhecidas. Contudo, causas genético-moleculares para a infertilidade masculina idiopática têm vindo a acumular-se, predominantemente localizadas no cromossoma Y, durante os últimos anos. Baseados em evidências citogenéticas, Tiepolo e Zuffardi apresentaram em 1976, a proposta de existência de genes em Yq11 actuando na espermatogénese. Desde então, inúmeros estudos, recorrendo a métodos de genética molecular, apoiaram a proposta inicial com a detecção de microdelecções em Yq11 presentes em homens azoospermicos e com o cromossoma Y citogeneticamente normal. Recentemente, foram clonados e caracterizados quatro genes (ou famílias de genes) ligados ao cromossoma Y, candidatos a ser determinantes da espermatogénese - *RBM*, *DAZ*, *SPGY* e *TSPY*. Na região euromática do braço longo (Yq11) também foram definidos três intervalos - *AZFa*, *AZFb* e o *AZFc* - onde devem estar contidos genes essenciais à espermatogénese. Os quatro genes referidos possuem expressão específica do tecido testicular e três deles (*RBM*, *DAZ* e o *SPGY*) codificam para ribonucleoproteínas com um motivo de reconhecimento de RNA. No intervalo *AZFb* existem alguns elementos da família *RBM*, enquanto no *AZFc* existem os genes *DAZ* e *SPGY*. Delecções de *AZFc* estão associadas tanto a azoospermias como a oligoasteno-teratozoospermias graves, enquanto delecções *AZFa* e *AZFb* causam exclusivamente azoospermia.

## SUMMARY

### Y Chromosome and Male Infertility

Spermatogenesis is a complex physiological process characterized by an orderly proliferation and differentiation of germ cell types, from diploid spermatogonial stem cells to haploid spermatids, and after spermiogenesis to spermatozoa. It is known that male reproductive capacity is deficient in about one half of infertile couples. Effective treatment is available only for a small fraction of these infertile men. In most cases, the cause of male infertility is unknown. Aetiologically, male infertility may result from genetic and non-genetic causes. Among the genetic factors known to disturb spermatogenesis, chromosomal aberrations, involving autosomes and/or sex chromosomes, are well known. However, molecular genetic causes of idiopathic male infertility have been accumulating in the last years, predominantly for the Y chromosome. Localization of genes that control spermatogenesis on Yq11 was first proposed, on cytogenetic evidence, by Tiepolo and Zuffardi in 1976. Since then, many subsequent reports using molecular genetics methods have supported the initial proposal by detecting submicroscopic interstitial deletions on Yq11, present in patients with idiopathic azoospermia and a cytogenetically normal Y chromosome. Recently, four spermatogenesis candidate Y-linked genes (or

gene families), *RBM*, *DAZ*, *SPGY* and *TSPY* have been cloned and characterized. In the euchromatic Y chromosome long arm three intervals - *AZF<sub>a</sub>*, *AZF<sub>b</sub>* and *AZF<sub>c</sub>* - were also defined. All of them may contain genes necessary for normal spermatogenesis. All the four genes have a testis-specific expression and three of them (*RBM*, *DAZ* and *SPGY*) code for ribonucleoproteins with a single RNA recognition motif. Candidate genes within *AZF<sub>b</sub>* are some members of the *RBM* gene family and within *AZF<sub>c</sub>* are the *DAZ* and *SPGY* gene family. While *AZF<sub>c</sub>* deletions are associated with azoospermia or with severe oligoteratoasthenozoospermia, microdeletions involving *AZF<sub>a</sub>* or *AZF<sub>b</sub>* cause azoospermia only.

## INTRODUÇÃO

Actualmente considera-se que a capacidade reprodutora masculina é a causa da infertilidade de cerca de 50% dos casais inférteis<sup>1</sup>. Etiologicamente a infertilidade masculina apresenta causas genéticas e não genéticas. Destas últimas, evidenciam-se infecções gonadais, factores ambientais, obstrução dos canais deferentes, presença de varicocele e distúrbios imunológicos ou endócrinos. De entre as causas genéticas que influenciam a espermatogénese, as anomalias cromossómicas, envolvendo autossomas e/ou os cromossomas sexuais, são as mais frequentes. Assim, 12% dos homens com azoospermia ou oligozoospermia (com contagens de espermatozoides inferiores  $10 \times 10^6/\text{ml}$ ) apresentam cariotipo anómalo no sangue periférico<sup>2</sup>. Nestes homens inférteis, as alterações cromossómicas mais frequentemente encontradas são nomeadamente: a presença de um cromossoma X extra (47,XXY), translocações Robertsonianas, translocações equilibradas e anomalias estruturais do cromossoma Y. Por outro lado, demonstrou-se igualmente que 8% dos homens inférteis apresentavam anomalias cromossómicas na meiose<sup>2</sup>. Assim, cerca de 20% dos homens inférteis possuirão aberrações cromossómicas a nível mitótico ou meiótico. Atendendo ao título da presente revisão, interessa aprofundar os conhecimentos sobre a patologia molecular do cromossoma Y associada a infertilidade masculina.

## INFERTILIDADE MASCULINA E CROMOSSOMA Y: PRIMEIRAS EVIDÊNCIAS CITOGENÉTICAS.

As primeiras evidências que permitiram postular a existência, no cromossoma Y (nomeadamente no braço longo - Yq), de factores genéticos associados a infertilidade masculina, surgiram na década de 70 com o estudo citogenético de homens azoospermicos. Nestes homens, a análise cromossómica efectuada no sangue periférico, permitiu detectar, para além de um cromossoma X e dos autossomas aparentemente normais, a presença de cromossomas Y em anel ou com o braço longo delecção-

do<sup>3-5</sup>. Em 1976 o postulado anterior foi confirmado com base na análise cromossómica de 1171 homens azoospermicos, dos quais, seis apresentavam uma delecção da região euromática distal do braço longo do cromossoma Y. Baseados nesta evidência experimental, Tiepolo e Zuffardi propuseram a existência de factores genéticos determinantes da espermatogénese (*AZF* - *Azoospermia factor*) na região distal euromática do braço longo do cromossoma Y (Yq11)<sup>6</sup> (Figura 1A). Posteriormente, diferentes estudos citogenéticos realizados em homens inférteis possuindo delecções ou rearranjos cromossómicos envolvendo o braço longo do cromossoma Y, reforçaram a proposta da existência de sequências génicas essenciais à espermatogénese em Yq11<sup>7-14</sup> e proximais à região heterocromática.

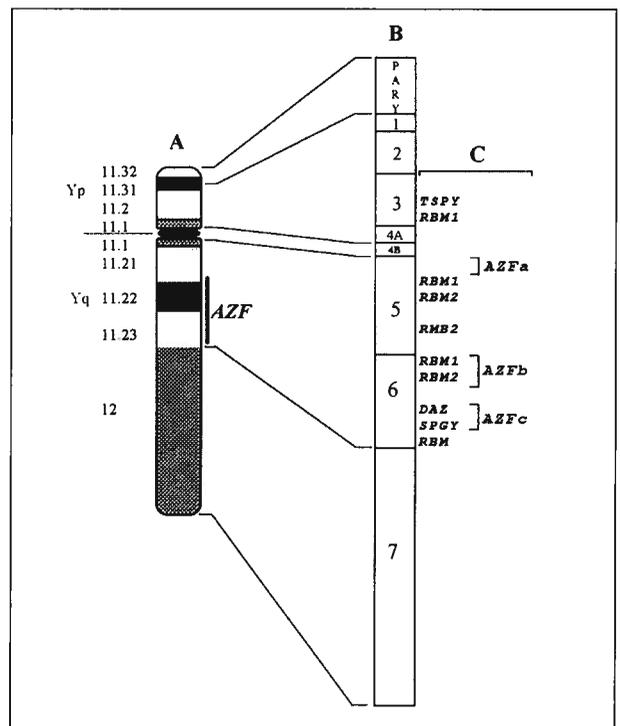


Fig. 1A - Representação do cromossoma Y com localização do AZF (*Azoospermia factor*) atribuída à região distal euromática de Yq11. B - Divisão do cromossoma Y em 8 intervalos distintos. C - Localização relativa dos diferentes genes candidatos a determinantes da espermatogénese e respectivas regiões AZF atribuídas aos intervalos 5 e 6.

## CONTRIBUIÇÃO DA GENÉTICA MOLECULAR PARA A DEMONSTRAÇÃO DA EXISTÊNCIA DE GENES DETERMINANTES DA ESPERMATOGÉNESE EM Yq11.23

O estudo molecular de cromossomas Y estruturalmente anormais, por recurso à hibridação com sondas genómicas do referido cromossoma, levou à elaboração de um mapa físico do cromossoma Y dividindo-o em 8 intervalos<sup>15</sup> (Figura 1B). Esta divisão, revelou-se extremamente útil para a caracterização molecular de cromossomas Y, estruturalmente anómalos ou translocados, presentes em homens azoospermicos. Assim, foi possível atribuir, pela primeira vez, a localização do *AZF* ao intervalo 6 do referido cromossoma<sup>16-19</sup>. Dado que a análise citogenética clássica, e mesmo um cariotipo de alta resolução, só permite detectar deleções intersticiais ou terminais da ordem de 1-2 Mb, e como a análise molecular por *Southern-blotting* (tecnologia que tem um limite de detecção inferior a 1 kb) permite detectar deleções submicroscópicas ou microdeleções não diagnosticáveis citogeneticamente, esta última abordagem permitiu demonstrar a existência de microdeleções intersticiais em Yq11.23, presentes em homens azoospermicos com cariotipo 46,XY, em que o cromossoma Y se apresentava aparentemente intacto<sup>20-23</sup>. Estes resultados, para além de valorizarem o intervalo 6 como putativo local do *AZF*, contribuíram decisivamente para a pesquisa dos genes determinantes da espermatogénese em Yq11.23. A publicação de um novo mapa do cromossoma Y<sup>24</sup>, dividindo-o em 43 subintervalos, e baseado em STS (*sequence-tagged site*, um STS é uma pequena extensão de sequência genómica, que pode ser detectada por amplificação enzimática do DNA - PCR - e cuja localização cromossómica se conhece; cada STS funciona assim, como um marcador genómico específico) veio facilitar e acelerar a pesquisa de microdeleções em Yq11. Esta nova estratégia de pesquisa de microdeleções, STS-PCR, permitiu, com grande sensibilidade, especificidade e rapidez, detectar diferentes microdeleções nos intervalos 5 e 6, presentes em 3-18% dos homens com azoospermia ou oligozoospermia idiopáticas<sup>25-31</sup>. Estes novos resultados, sugeriram a possibilidade de existência de mais do que um gene em Yq11 envolvido no processo fisiológico de proliferação e diferenciação celular que é a espermatogénese.

### OS GENES CANDIDATOS A *AZF*

**A família de genes *RBM*** - As primeiras tentativas para a identificação molecular do *AZF*, basearam-se na existência de duas microdeleções intersticiais distintas,

detectadas em rastreios moleculares dos intervalos 5 e 6 do cromossoma Y, existentes em dois homens com azoospermia idiopática, com cariotipo aparentemente normal, sem qualquer evidência citogenética de deleções em Yq11.23<sup>21,22</sup>. Essas duas microdeleções, pelo facto de não serem subreponíveis, reforçaram a hipótese de que o *locus AZF* poderia ser extenso, ou conter mais do que um gene. Esta primeira pesquisa do *AZF* culminou, em 1993, com a identificação da família de genes *YRRM* (*Y chromosome RNA recognition motif*) em Yq11.23<sup>32</sup>. Demonstrou-se que estes genes eram expressos especificamente no tecido testicular e postulou-se que os dois cDNAs inicialmente isolados codificariam para duas proteínas (*YRRM1* e *YRRM2*) com um motivo de reconhecimento de RNA. Por analogia com proteínas contendo motivos idênticos, propôs-se que, *YRRM1* e *YRRM2* exerceriam a sua função a nível do processamento ou controlo da tradução de mRNA. Embora tenha sido inicialmente descrito que a família *YRRM* (posteriormente designada por *RBM - RNA binding motif*) possuiria pelo menos três cópias nos intervalos 5 e 6, confirmou-se posteriormente, que a família *RBM* é numerosa, localizando-se distribuída pelo braço longo e pela região proximal do braço curto do cromossoma Y<sup>27,33</sup>. Contudo, permanece desconhecido o número exacto de genes *RBM* activos, assim como de pseudo-genes.

**O intervalo 6 e os genes *DAZ* e *SPGY*** - A investigação mais exaustiva que culminou com a identificação de um gene candidato a *AZF*, foi levada a cabo por Reijo et al<sup>27</sup>. Da pesquisa de microdeleções em Yq11, por STS-PCR, em que foram estudados 89 homens com azoospermia idiopática, encontraram-se microdeleções em 13% destes homens inférteis. Estas microdeleções possuíam em comum uma região de cerca de 500 kb contida no intervalo 6, o que permitiu definir uma nova região *AZF*. Nesta região foi identificado um novo gene designado por *DAZ* (*deleted in azoospermia*). Tal como o *RBM*, o *DAZ* também é expresso especificamente no tecido testicular (espermátogónias e espermátócitos primários) e, possivelmente, codifica também para uma proteína com um motivo de reconhecimento de RNA<sup>27,34</sup> - *RRM* (*RNA recognition motif*). Assim, a proteína codificada pelo *DAZ* desempenhará uma função muito semelhante à desempenhada pela proteína *RBM*, podendo estar envolvida também no processamento e tráfego de mRNA entre núcleo e citoplasma. Apesar de o *DAZ* estar deleccionado nos 12 homens azoospermicos com

microdeleções em Yq11 não foi possível estabelecer, pelo estudo da histologia testicular, uma boa correlação genótipo/fenótipo, já que, para a mesma região *AZF* deleccionada (incluindo o *DAZ*)- foram observados, histologicamente, diversos defeitos espermatogénicos, indo desde a ausência completa de células da linha germinal (síndrome de só-células-de-Sertoli), à paragem da espermatogénese no estadió de espermatócito primário ou à ocasional produção de espermátídeos.

Neste intervalo, foi recentemente isolado um segundo gene, designado por *SPGY1* (*spermatogenesis gene on the Y chromosome*) que também é expresso no tecido testicular<sup>35</sup>. Codifica igualmente para uma proteína com um motivo RRM e possui 12 repetições em *tandem* com 72 nucleótidos cada. Para além de a proteína *SPGY1* desempenhar, possivelmente, uma função semelhante à proteína *DAZ*, a nível da sua sequência nucleotídica os dois genes respectivos são altamente homólogos (85 a 100%). Pelas características comuns que possuem, *DAZ* e *SPGY1* foram incluídos numa mesma família génica localizada em Yq11.23.

**A família de genes *TSPY*** - A família de genes *TSPY* (*testis specific protein Y-encoded*) encontra-se localizada na região proximal do braço curto do cromossoma Y e está incluída numa unidade de sequências repetitivas em *tandem* designada por *DYZ5*<sup>36,37</sup>. Embora não se saiba o número total de cópias dos genes da família *TSPY* que é expresso, foi possível isolar e caracterizar molecularmente o cDNA e o gene estrutural correspondente de um elemento desta família. O *TSPY* funcional, com 6 exões e 5 intrões, é expresso especificamente no tecido testicular fetal (vigésima segunda e vigésima sexta semanas de gestação) e adulto<sup>38</sup>. Recentemente, demonstrou-se por imuno-histo-química, que este gene é expresso nas espermatogónias, antes da transição para espermatócito<sup>39</sup>. Esta evidência experimental permitiu postular que o *TSPY* poderá estar envolvido na proliferação desta população de células da linha germinal, marcando a divisão entre proliferação mitótica e diferenciação meiótica. Assim, embora não tenha sido encontrado ainda nenhum rearranjo estrutural ou mutação pontual na família de genes *TSPY* associados a infertilidade masculina, é legítimo esperar, dado o padrão espaço-temporal de expressão do gene em causa, que mutações no *TSPY* possam ser a causa de algumas formas de infertilidade masculina idiopática.

## DIFERENTES SUBREGIÕES DE Yq11 IMPLICADAS NA INFERTILIDADE MASCULINA

Quando em 1995 foi proposto, por Reijo et al<sup>27</sup>, que o *AZF* se limitava a uma pequena região genómica com cerca de 500 kb em Yq11.23 e desde a identificação do gene *DAZ* nessa região, era pouco previsível que se retomasse a problemática da subdivisão de Yq11 em várias regiões *AZF*. No entanto, em meados de 1996, Peter Vogt<sup>30</sup>, com o objectivo de clarificar se o *AZF* se limitaria somente a um *locus* na região distal de Yq11, publica um exaustivo estudo de análise molecular deleccional nesta região, realizado em 370 homens inférteis com azoospermia idiopática ou com oligozoospermia grave ( $< 2 \times 10^6$  espermatozóides/ml). Neste estudo, identificaram-se 12 indivíduos com microdeleções *de novo*, envolvendo vários *loci* presentes em diferentes subregiões de Yq11. Estes resultados permitiram propôr a existência em Yq11 de três *loci* *AZF* (*AZFa*, *AZFb*, e *AZFc*) implicados na espermatogénese (Figura 1C). Com base na histologia testicular, estudada nos homens inférteis com as diferentes regiões *AZF* deleccionadas, foi possível estabelecer as seguintes correlações: i) Deleções de *AZFa* estão associadas a ausência completa de células da linha germinal, sendo visualizadas somente células de Sertoli nos túbulos seminíferos. Consequentemente, na ausência do *AZFa*, a espermatogénese será interrompida, provavelmente, muito antes da puberdade, numa fase muito inicial de proliferação mitótica das espermatogónias, levando à existência do síndrome de só-células-de-Sertoli. ii) Quando o *locus* *AZFb* está deleccionado, não são detectadas células pós-meióticas nos túbulos seminíferos, embora a população de espermatogónias e de espermatócitos nos mesmos seja aparentemente normal. A paragem da espermatogénese ocorrerá antes ou durante os estadios iniciais da meiose, ainda na fase de espermatócito, numa altura em que a puberdade já foi iniciada. iii) Na ausência do *AZFc*, a maioria dos túbulos apresentam somente células de Sertoli; contudo, em alguns túbulos são detectadas células da linha germinal nas diferentes fases da espermatogénese, variando a população de células germinais quantitativa e qualitativamente, de doente para doente. No entanto, e surpreendentemente, a maioria dos doentes estudados com o *AZFc* deleccionado, produzem espermatozoides em baixo número ( $0,1-2 \times 10^6/ml$ ) na sua maioria morfológicamente anormais. Assim, foi sugerido que o efeito primário de deleções do *AZFc* consistirá em afectar a espermatogénese já numa fase pós-meiótica, provavelmente a nível da maturação espermatogénica com implicações na espermiogénese. iv)

Verificou-se também que o volume testicular é menor quando associado a deleções de *AZFa* (cerca de 8 ml), apresentando valores médios superiores -13 e 15 ml - respectivamente para as deleções de *AZFb* ou *AZFc*. Ou seja, histologicamente, quanto mais grave for o defeito espermato gênico (síndrome de só-células-de-Sertoli), menor será o volume testicular que lhe estará associado. Daqui depreende-se que o volume testicular poderá ser um bom indicador clínico relativamente à presença/ausência de espermatogênese nos túbulos seminíferos.

## DISCUSSÃO

A análise citogenética convencional, realizada no sangue periférico de homens azoospermicos, contribuiu inequivocamente para a proposta de existência do *AZF* na região euromática do braço longo do cromossoma Y. No entanto, a análise molecular subsequente, tendo por referência o primeiro mapa físico do cromossoma Y, assim como o mapa de STS do mesmo cromossoma, contribuiu de forma decisiva para a identificação de microdeleções em Yq11, presentes em homens com azoospermia idiopática. Embora os primeiros estudos moleculares tenham sugerido a possibilidade de existência de mais do que um *locus* determinante da espermatogênese no braço longo do cromossoma Y, só recentemente foi possível demonstrar que a base molecular da infertilidade masculina ligada ao cromossoma Y está associada à existência de vários genes, ou famílias de genes, activos em Yq e em Yp. Esta evidência ficou a dever-se quer à utilização de uma metodologia de análise molecular de maior resolução, a STS-PCR, quer à demonstração experimental de que os genes *RBM*, *DAZ*, *SPGY1* e *TSPY*, candidatos a *AZF*, possuem expressão específica nas células da linha germinal, espermato gônias e espermato citos.

Apesar de ter sido feita a demonstração inequívoca da relação causa/efeito entre a presença de deleções em Yq e a infertilidade masculina, a existência de uma grande heterogeneidade clínica desta patologia contribuiu, inicialmente, para que indivíduos oligozoospermicos ou com oligoteratoastenozoospermia (OTA) não fossem incluídos em estudos moleculares conjuntamente com homens azoospermicos, por se considerar que os primeiros, possuíam uma etiologia molecular distinta da do último grupo. Actualmente, a pesquisa molecular de microdeleções em Yq11 já demonstrou, que homens azoospermicos, oligozoospermicos ou com OTA, podem possuir deleções na mesma região em Yq11.23, nomeadamente no *locus AZFc* onde se encontra o gene *DAZ* <sup>27,30,40-42</sup>. Por outro lado já foi demonstrado que

dois homens inférteis herdaram dos seus progenitores férteis microdeleções abrangendo o *DAZ*<sup>30,41</sup>. Pelo que é legítimo questionar se o *DAZ*, é ou não um gene essencial para a meiose masculina normal. Admitindo a existência de um único *AZF*, do qual o *DAZ* seria o único representante, e numa tentativa para explicar a existência da variabilidade de fenótipos associados ao mesmo defeito molecular (deleção do *AZF/DAZ*), tem-se invocado a existência de uma expressividade variável de indivíduo para indivíduo, que poderá ser modulada, por factores ambientais, por efeitos estocásticos ou por factores genéticos exteriores ao próprio *AZF*. Na verdade, é possível que o tecido testicular germinal, de diferentes indivíduos, possua maior ou menor sensibilidade a factores ambientais que condicionem o sucesso da espermatogênese. Por outro lado, dada a existência de múltiplos genes no cromossoma Y com expressão específica da linha germinal, também é possível que a gravidade do fenótipo espermato gênico seja proporcional ao número de genes afectados. Ou seja, para um único gene *AZF* delecionado ou mutado, o defeito espermato gênico poderá manifestar-se sob a forma de oligozoospermia (fenótipo suave). Consequentemente, as azoospermias (fenótipo grave) resultarão da afecção da totalidade ou de múltiplos genes *AZF*. O mesmo é dizer que, para que ocorra no homem uma espermatogênese normal, é provavelmente necessário que todos os genes determinantes da espermatogênese estejam activos. Bastará que um único desses genes esteja mutado para que a infertilidade se manifeste, embora não na sua forma mais grave. Curiosamente, as deleções detectadas citogeneticamente que envolvem os intervalos 5 e 6 de Yq, estão sempre associadas a azoospermia. Pelo que a proposta de Peter Vogt, sugerindo a existência de três factores determinantes da espermatogênese, *AZFa*, *AZFb* e *AZFc* em Yq, é reforçada relativamente à possibilidade de existência de um único *AZF*. Ou seja, o modelo proposto por Peter Vogt, para além de ser suportado pela evidência experimental de que extensas deleções em Yq causam azoospermia, por todos os *AZF* estarem delecionados, demonstra, com base nos estudos histológicos e nas respectivas microdeleções encontradas em homens com infertilidade idiopática, que é possível a existência de diferentes genes em Yq determinantes da espermatogênese que se expressam em diferentes períodos do desenvolvimento do tecido germinal testicular. Este modelo é compatível com a existência de microdeleções nos intervalos 5 e 6 (loci *AZFa* e *AZFb*) que causam azoospermia, não sendo necessário invocar a existência de outros *loci* determinantes da espermatogé-

nese. De notar que é no locus *AZFc*, associado a *OTA*, que se localizam os genes *DAZ* e *SPGYI*. Embora estejam associados a *AZFc* e a *DAZ* os mesmos defeitos espermatogénicos, postula-se que o *AZFc* seja expresso depois de concluída a meiose masculina, já numa fase de diferenciação celular germinal compatível com a espermiogénese. No entanto, os estudos de expressão do gene *DAZ* demonstram que o mesmo é expresso anteriormente à meiose, nas espermatogónias e nos espermátocitos primários. Para resolver esta contradição, poderá postular-se, que o *SPGYI* terá expressão pós-meiótica, ou invocar-se que os estudos de expressão do *DAZ* foram realizados somente a nível de mRNA e que a tradução do mesmo em proteína poderá ocorrer mais tardiamente, depois da meiose estar concluída.

Embora os genes *RBM* sejam distintos, a nível nucleotídico, dos genes *DAZ* e *SPGYI*, possuem características comuns assinaláveis: i) Codificam para proteínas com um único motivo de ligação a RNA, sendo por isso semelhantes à família de proteínas hnRNP (heterogeneous nuclear ribonucleoproteins). As hnRNP, abundantes no núcleo celular, actuam tanto a nível de transporte de mRNA entre o núcleo e o citoplasma, como no processamento do RNA e eventualmente na regulação da sua tradução<sup>43</sup>. ii) É provável que a função desempenhada pelas proteínas *RBM*, *DAZ*, *SPGYI* e hnRNP seja semelhante, embora as três primeiras desempenhem a sua função especificamente nas células da linha germinal. iii) As sequências codificantes dos genes *RBM*, *DAZ* e *SPGYI* possuem repetições em *tandem*. Os genes *RBM1* e *RBM2* possuem quatro repetições com 111 nucleótidos cada, o *DAZ* e *SPGYI* possuem 7 e 12 repetições, respectivamente, com 72 nucleótidos cada. iv) Os quatro genes apresentam o mesmo padrão de expressão, sendo transcritos nas espermatogónias e nos espermátocitos primários.

Para além da sequência nucleotídica que distingue os genes *RBM1* e *DAZ*, a diferença mais significativa situa-se a nível filogenético. O gene *RBM1* está presente no cromossoma Y de todos os mamíferos euterianos estudados (do murganho ao homem) assim como em marsupiais<sup>32,44,45</sup>. No entanto, sequências homólogas do gene *DAZ*, ligadas ao cromossoma Y, só foram detectadas em primatas do Velho Mundo. Nos restantes mamíferos euterianos e em marsupiais, as mesmas sequências só existem a nível autossómico - comuns, portanto, a machos e a fêmeas<sup>45-48</sup>. O facto de se manterem conservadas no cromossoma Y sequências homólogas do gene *RBM1* desde os marsupiais até ao homem, sugere que *RBM1* desempenha uma função essencial, específica

e comum a todos os mamíferos do sexo masculino, que é compatível com a espermatogénese. Pelo que, filogeneticamente, a família *RBM* sai reforçada como candidata a *AZF*, em detrimento do gene *DAZ*.

Retomando a hipótese de existência de múltiplos genes no cromossoma Y associados a infertilidade masculina, dada a diversidade de fenótipos presentes em doentes aparentemente com microdelecções comuns e porque a maioria desses genes possui semelhanças estruturais (domínios de ligação ao RNA e repetições em *tandem*), ainda existe a possibilidade de que os diferentes genes actuem de forma complementar ou cooperativa. A consequência directa dessa possibilidade será que o defeito espermatogénico estará dependente, não só da microdelecção que afecta um único gene, mas também, de outros alelos *AZF* presentes num dado indivíduo. Pelo que é de considerar, a possibilidade de existência de penetrância incompleta, nomeadamente, quando pai e filho, possuindo a mesma microdelecção, manifestam um fenótipo espermatogénico distinto, respectivamente, fertilidade e azoospermia.

Do exposto depreende-se que o desenvolvimento recente da investigação na procura da base molecular da infertilidade masculina idiopática ligada ao cromossoma Y, contribuiu, por um lado, para a identificação da causa genética da azoospermia presente em 3 - 18% dos homens com infertilidade idiopática e, por outro, levou à identificação, não de um único gene mas, surpreendentemente, de múltiplos genes existentes no cromossoma Y e implicados na gametogénese masculina. A pesquisa de microdelecções em Yq11.23 permite, assim, explicar cerca de 10% dos casos de infertilidade de etiologia desconhecida. Por outro lado, antevê-se que a identificação dos múltiplos genes *AZF* venha a proporcionar a identificação de mutações pontuais nos mesmos e, assim, contribuir para esclarecer grande parte da diversidade fenotípica da infertilidade masculina idiopática. A intensa investigação actualmente em curso (inclusivamente no nosso laboratório) poderá contribuir para o estabelecimento de estratégias terapêuticas que solucionem, eficazmente, a maioria das diferentes formas de infertilidade masculina. Essa contribuição terá implicações, directamente para a fertilidade/procriação do indivíduo e indirectamente, para a saúde mental e social dos indivíduos atingidos e suas famílias, já que a reprodução humana não é um fenómeno somente biológico, coexistindo associados à mesma valores culturais e emocionais. A esta investigação está inerente, para além das implicações sócio-familiares, a indispensável cooperação entre diferentes competências que vão desde a avaliação

clínica dos doentes nas suas diferentes vertentes (urologia, endocrinologia, cirurgia, anatomia patológica, psicologia), a análise citogenética clássica e genética molecular, até às especializações em tecnologias de reprodução medicamente assistida e ao aconselhamento genético. A mesma investigação, contribuirá, a nível fundamental, para aprofundar conhecimentos naquele que é um fenómeno fisiológico comum a todos os mamíferos, a meiose. Meiose que encerra segredos essenciais à procriação, à geração de diversidade fenotípica e consequentemente à preservação e evolução das espécies biológicas.

## BIBLIOGRAFIA

1. ROWE PJ, COMHAIRE FH, HARGREAVE TB, MELLOUS HJ: WHO manual for the standardized investigation and diagnosis of the infertile couple. World Health Organization 1993. Cambridge University Press, Cambridge.
2. DE BRAEKELEER M, DAO TN: Cytogenetic studies in male infertility: a review. *Hum Reprod* 1991; 6:245-50.
3. CHANDLEY AC, EDMOND P: Meiotic studies on a subfertile patient with a ring Y chromosome. *Cytogenet* 1971; 10:295-304.
4. NEU RL, BARLOW MJ, GARDNER LI: A 46,XYq- male with aspermia. *Fertil Steril* 1973; 24:811-3.
5. MAEDA T, OHNO M, ISHIBASHI A, SAMEJIMA M, SASAKI M: Ring Y chromosome: 45,X/46,X,r(Y) chromosome mosaicism in a phenotypically normal male with azoospermia. *Hum Genet* 1976; 34:99-102.
6. TIEPOLO L, ZUFFARDI O: Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent portion of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet* 1976;34:119-4.
7. YUNIS E, GARCÍA-CONTI F, TORRES DE CABALLERO O M, GIRALDO A: Yq deletion, aspermia, and short stature. *Hum Genet* 1977; 39:117-22.
8. STEINBACH P, FABRY H, SCHOLZ W: Unstable ring Y chromosome in an aspermic male. *Hum Genet* 1979; 47:227-31.
9. KOSZTOLÁNYI G, TRIXLER M: Yq deletion with short stature, abnormal male development, and schizoid character disorder. *J Med Genet* 1983; 20: 393-4.
10. COHEN G, MANUEL A, COHEN M, FAGAN K, GRUNSTEIN H: A deletion of heterochromatin only of the Y chromosome in an azoospermic male. *Hum Genet* 1983; 64:297-300.
11. MARTÍN M J, RODRIGUEZ M T, ALLER V, ABRISQUETA J A, ROJO J M: Yq deletion (q11.21) in a H-Y+ azoospermic male. *Clin Genet* 1985; 28:80-3.
12. SCHEMPP W, WEBER B, SERRA A, NERI G, GALA, WOLF U: A 45,X male with evidence of a translocation of Y euchromatin onto chromosome 15. *Hum Genet* 1985; 71:150-4.
13. FITCH N, RICHER C, PINSKY L, KAHN A: Deletion of the long arm of the Y chromosome and review of Y chromosome abnormalities. *Am J Med Genet* 1985; 20:31-42.
14. CHANDLEY AC, AMBROS P, McBEATH S, HARGREAVE TB, KILANOWSKI F, SPOWART G: Short arm dicentric Y chromosome with associated statural defects in a sterile man. *Hum Genet* 1986; 73:350-3.
15. VERGNAUD G, PAGE DC, SIMMLER M-C et al: A deletion map of the human Y chromosome based on DNA hybridization. *Am J Hum Genet* 1986; 38: 109-24.
16. GAL A, WEBER B, NERI G et al: A 45,X male with Y-specific DNA translocated onto chromosome 15. *Am J Hum Genet* 1987; 40:477-88.
17. ANDERSSON M, PAGE DC, PETTAY D et al: Y; autosome translocations and mosaicism in the aetiology of 45,X maleness: assignment of fertility factor to distal Yq11. *Hum Genet* 1988;79:2-7.
18. CHANDLEY AC, GOSDEN JR, HARGREAVE TB, SPOWART G, SPEED RM, McBEATH S: Deleted Yq in the sterile son of a man with a satellited Y chromosome (Yqs). *J Med Genet* 1989; 26:145-53.
19. BARDONI B, ZUFFARDI O, GUIOLI S et al: A deletion map of the human Yq11 region: implications for the evolution of the Y chromosome and tentative mapping of a locus involved in spermatogenesis. *Genomics* 1991;11:443-51.
20. JOHNSON MD, THO SPT, BEHZADIAN A, McDONOUGH PG: Molecular scanning of Yq11 (interval 6) in men with Sertoli-cell-only syndrome. *Am J Obstet Gynecol* 1989; 161:1732-7.
21. MA K, SHARKEY A, KIRSCH S et al: Towards the molecular localisation of the AZF locus: mapping of microdeletions in azoospermic men within 14 subintervals of interval 6 of the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* 1992; 1:29-33.
22. VOGT P, CHANDLEY AC, HARGREAVE TB, KEIL R, MA K, SHARKEY A: Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome of males with idiopathic sterility point to disruption of AZF, a human spermatogenesis gene. *Hum Genet* 1992; 89:491-6.
23. NAGAFUCHI S, NAMIKI M, NAKAHORY Y, KONDOH N, OKUYAMA A, NAKAGOME Y: A minute deletion of the Y chromosome in men with azoospermia. *J Urol* 1993; 150:1155-7.
24. VOLLRATH D, FOOTE S, HILTON A et al: The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 1992; 258:52-9.
25. KOBAYASHI K, MIZUNO K, HIDA A et al: PCR analysis of the Y chromosome long arm in azoospermic patients: evidence for a second locus required for spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1965-7.
26. HENEGARIU O, HIRSCHMANN P, KILIAN K et al: Rapid screening of the Y chromosome in idiopathic sterile men, diagnosis for deletions in AZF, a genetic Y factor expressed during spermatogenesis. *Androl* 1994; 26: 97-106.
27. REIJO R, LEE T-Y, SALO P et al: Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nature Genet* 1995;10: 383-93.
28. NAJMABADI H, HUANG V, YEN P et al: Substantial prevalence of microdeletions of the Y-chromosome in infertile men with idiopathic azoospermia and oligozoospermia detected using a sequence-tagged site-based mapping strategy. *J Clin Endocrinol Metab* 1996; 81:1347-52.
29. STUPPIA L, MASTROPRIMIANO G, CALABRESE G, PEILA R, TENAGLIA R, PALKA G: Microdeletions in interval 6 of the Y chromosome detected by STS-PCR in 6 of 33 patients with idiopathic oligo- or azoospermia. *Cytogenet Cell Genet* 1996; 72:155-8.
30. VOGT P, EDELMANN A, KIRSCH S et al: Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 933-43.
31. GONÇALVES J, ROCHA T, MARQUES R et al: Delineation of the genetic basis of azoospermia. *Eur J Hum Genet* 1996; 4 suppl 1:21.
32. MA K, INGLIS J D, SHARKEY A et al: A Y chromosome gene family with RNA-binding protein homology: candidates for the azoospermia factor AZF controlling human spermatogenesis. *Cell* 1993; 75: 1287-5.
33. CHANDLEY A, COOKE H: Human male fertility-Y-linked genes and spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 1994; 3: 1449-52.
34. MENKE DB, MUTTER GL, PAGE DC: Expression of DAZ, an azoospermia factor candidate, in human spermatogonia. *Am J Hum Genet* 1997; 60:237-41.
35. MAIWALD R, SEEBACHER T, EDELMANN A et al: A human Y-chromosomal gene mapping to distal Yq11 is expressed in spermatogenesis. In: Report of the Second International Workshop on Y Chromosome Mapping, Asimolar 1995. *Cytogenet Cell Genet* 1996; 73:4.
36. ARNEMANN J, JAKUBICZKA S, THÜRING S, SCHMIDTKE J: Cloning and sequence analysis of human Y-chromosome-derived, testicular cDNA, TSPY. *Genomics* 1991; 11: 108-14.
37. MANZ E, SCHNIEDERS F, MÜLLER BRECHLIN A,

- SCHMIDTKE J: TSPY-related sequences represent a microheterogeneous gene family organized as constitutive elements in DYZ5 tandem repeat units on the human Y chromosome. *Genomics* 1993; 17: 726-31.
38. ZHANG JS, YANG-FENG TL, MULLER U, MOHANDAS TK, DE JONG PJ, LAU Y-F C: Molecular isolation and characterization of an expressed gene from the human Y chromosome. *Hum Mol Genet* 1992; 1: 717-26.
39. SCHNIEDERS F, DÖRK T, ARNEMANN J, VOGEL T, WERNER M, SCHMIDTKE J: Testis-specific protein, Y-encoded (TSPY) expression in testicular tissues. *Hum Mol Genet* 1996; 5: 1801-7.
40. REIJO R, ALAGAPPAN RK, PATRIZIO P, PAGE DC: Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. *The Lancet* 1996; 347: 1290-3.
41. PRYOR JL, KENT-FIRST M, MUALLEM A et al: Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med* 1997; 336: 534-9.
42. GONÇALVES J, MEDEIROS S, VALE F et al: Screening for microdeletions in oligoasthenoteratozoospermic patients. *Proceeding of the international symposium on Genetics of Human Male Fertility*. Edição Barratt C, De Jonge C, Mortimer D, Parinaud J, E.D.K., Paris, 1997; 353-355.
43. DREYFUSS G, MATUNIS M, PIÑOL-ROMA S, BURD C: hnRNP proteins and the biogenesis of mRNA. *Ann Rev Biochem* 1993;62:289-321.
44. SCHEMPP W, BINKELE A, ARNEMANN J et al: Comparative mapping of YRRM- and TSPY-related cosmids in man and hominoid apes. *Chrom Res* 1995; 3: 227-34.
45. DELBRIDGE ML, HARRY JL, TODER R et al: A human candidate spermatogenesis gene, RBM1, is conserved and amplified on the marsupial Y chromosome. *Nature Genet* 1997; 15: 131-6.
46. COOKE HJ, LEE M, KERR S, RUGGIU M: A murine homologue of the human DAZ gene is autosomal and expressed only in male and female gonads. *Human Mol Genet* 1996; 5: 513-6.
47. REIJO R, SELIGMAN J, DINULOS MB et al: Mouse autosomal homolog of DAZ, a candidate male sterility gene in humans, is expressed in male germ cells before and after puberty. *Genomics* 1996; 35: 346-52.
48. SEBOUN E, BARBAUX S, BOURGERON T et al: Gene sequence, localization, and evolutionary conservation of DAZLA, a candidate male sterility gene. *Genomics* 1997; 41: 227-35.