

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO
DEPARTAMENTO DE GENÉTICA

Fatores genéticos
na espermatogênese de homens
inférteis

Maria Silvana Juchniuk de Vozi

Ribeirão Preto
2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Maria Silvina Juchniuk de Vozzi

**Fatores genéticos
na espermatogênese de homens
inférteis**

**Genetic factors in the spermatogenesis
of infertile males**

Tese apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da
Universidade de São Paulo para a
obtenção do título de Doutora em
Ciências, área de concentração Genética.

Orientadora: Profa. Dra. Lucia Martelli

Ribeirão Preto
2010

FICHA CATALOGRÁFICA

Juchniuk de Vozzi, Maria Silvina

Fatores genéticos na espermatogênese de homens inférteis.
Ribeirão Preto, 2010.

81 p. : il. ; 30cm

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Medicina de
Ribeirão Preto/USP. Área de concentração: Genética.

Orientador: Martelli, Lucia.

1. espermatozóide . 2. infertilidade. 3. segregação meiótica.
4. FISH. 5. apoptose

Data da Defesa: ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof.Dr. _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedicatória

*A meus pais,
a Alejandro,
a Francisco e Victoria.*

Agradecimentos

À Profa. Lucia pelos ensinamentos, amizade, paciência e as lembranças vividas.

Ao Silvio pela ajuda interminável.

Ao Ciro pelas discussões acadêmicas e pela amizade.

À Juliana e Fernanda pela grata amizade, e a alegria compartilhada, especialmente a Ju pelos ensinamentos em biologia molecular.

À Leniza pela colaboração na cito.

À Cidhina, e à Marilda pela ajuda e os ensinamentos.

Ao Reginaldo, Marli, obrigado pela amizade e a sua disposição.

Ao Bloco C, muitos anos e muita sabedoria.

Ao Laboratório de Ginecologia e Obstetrícia, pelo bom recebimento e Laboratório de Citogenética pela ajuda com os microscópios.

À Profa. Ana Carolina pela disposição a ajuda nos momentos mais precisos e a Profa. Paula pela ajuda em todo momento.

Aos pesquisadores Dra. Maisa Yoshimoto, Jennifer Good, e ao Prof.Dr. Jeremy Andrew Squire, do Department of Pathology and Molecular Medicine da Queen's University, Kingston, Ontario, Canadá, agradeço a incalculável colaboração no projeto.

Ao Departamento de Genética pelos ensinamentos, as secretarias pela boa disposição.

À pós-graduação do Departamento de Genética.

Ao CNPq, FAEPA-HC-FMRP, pela bolsa e auxílios para minha formação acadêmica.

Ao Ale pela alegria e amor compartilhados.

À minha família pelo apoio, paciência e constante incentivo para crescer.

Resumo

Juchniuk de Vozzi, M S. **Fatores genéticos na espermatogênese de homens inférteis.** 2010, Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

A infertilidade masculina é responsável por 50% dos casos de Fertilização *in vitro*, sendo a maioria classificada como idiopática. A análise do sêmen para avaliação do fator masculino constitui a primeira etapa de investigação de infertilidade. Adicionalmente, a análise genética do espermatozóide fornece informação sobre anormalidades cromossômicas numéricas e estruturais que conseguiram finalizar a meiose sem serem detectadas pelos *checkpoints* meióticos. A apoptose é um tipo de morte celular envolvida em diferentes passos da espermatogênese, primeiro na puberdade, no início da espermatogênese e posteriormente nas gônadas adultas, controlando a espermatogênese normal. Vários estudos demonstraram que a desregulamentação do processo de apoptose nas células germinativas pode resultar em infertilidade masculina. O objetivo principal do presente trabalho foi avaliar a segregação meiótica e a frequência de gametas apoptóticos em células germinativas de homens oligozoospermicos com diagnóstico de infertilidade. Foram avaliadas amostras de sêmen de quinze homens inférteis (grupo I) e de sete homens normais controles, com fertilidade comprovada (grupo II). Foi também realizado estudo citogenético de sangue periférico dos dois grupos. Para avaliar a segregação meiótica dos cromossomos 3, 13, 21, 22, X e Y foi utilizada a técnica de Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) em gametas descondensados e para avaliar a presença de apoptose foi detectada a externalização de fosfatidilserina utilizando anexina V marcada. O grupo de homens inférteis apresentou heteromorfismos do cromossomo 9 em 13,3 % dos cariótipos e um individuo apresentou cromossomo marcador. A frequência de aneuploidias totais dos cromossomos envolvidos foi de 6, 88% nos espermatozóides de homens inférteis e 3,98% nos controles. As frequências de dissomias dos cromossomos 3, 13, 21, 22, XY, XX e YY foram respectivamente 0,34%, 0,51%, 0,77%, 0,65%, 0,68%, 0,19% e 0,20% nos pacientes inférteis. Homens inférteis e controles apresentaram diferenças significativas ($p < 0,05$) nas frequências de aneuploidias dos cromossomos 13, 21, 22 e de dissomias XY. As diferenças entre os grupos estudados podem ser explicadas por falha na recombinação meiótica, interferindo no processo correto de segregação. Evidenciamos também diferença significativa entre a incidência de células apoptóticas em homens inférteis e controles ($p < 0,05$). O aumento das frequências de gametas apoptóticos em homens inférteis poderia ser justificado pelo processo denominado apoptose abortiva. A possível relação entre dissomias totais e morfologia espermática sugere que a seleção de gametas seja estritamente controlada na espermatogênese, sendo desregulada em homens oligozoospermicos.

Palavras-chaves: espermatozóide, infertilidade, segregação meiótica, FISH, apoptose.

Abstract

Juchniuk de Vozzi, M S. **Genetic factors in the spermatogenesis of infertile males.** 2010, Tese (Doutorado) Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2010.

Male infertility is responsible for 50% of *in vitro* fertilization procedures, the majority of the cases classified as idiopathic. Semen analysis to assess the male factor is the first step for infertility investigation. Additionally, genetic analysis of sperm provides information about numerical and structural chromosomal aberrations which were able to finish meiosis without being detected by meiotic checkpoints. Apoptosis is a type of cell death involved in different steps of spermatogenesis, first at puberty, at the beginning of spermatogenesis and subsequently in adult gonads, controlling the normal spermatogenesis. Several studies have shown that the deregulation of apoptosis in germ cells can result in male infertility. The main objective of this study is to evaluate the meiotic segregation of gametes and the frequency of apoptotic germ cells of oligozoospermic men with a diagnosis of infertility. We have studied semen samples of fifteen infertile men (group I) and seven male normal controls with proven fertility (group II). Cytogenetic studies of peripheral blood were also carried out for both groups. The fluorescent *in situ* hybridization (FISH) technique was used for evaluation of the meiotic segregation of chromosomes 3, 13, 21, 22, X and Y in the gametes. The presence of apoptosis was detected by externalization of phosphatidylserine using annexin V-labeled fluorescein. We have detected heteromorphism of chromosome 9 in 13.3% of the infertile man karyotypes and one patient had a marker chromosome. The frequency of total aneuploidies of chromosomes was 6, 88% in infertile men and 3.98% in the control group. The frequencies of disomies of chromosome 3, 13, 21, 22, XY, XX and YY respectively was 0.34%, 0.51%, 0.77%, 0.65%, 0.68%, 0, 19% and 0.20% in infertile patients. Infertile men and controls showed significant differences ($p < 0.05$) in the frequencies of aneuploidies of chromosomes 13, 21, 22 and XY disomy. The differences between the groups could be explained by failure in meiotic recombination, interfering with the correct process of segregation. Our results revealed a significant difference between the incidence of apoptotic cells in infertile men and controls ($p < 0.05$). The increased frequencies of apoptotic gametes in infertile men could be explained by the process called abortive apoptosis. The possible relationship between total disomies and sperm morphology suggests that the selection of gametes would be strictly controlled in spermatogenesis, being unregulated in oligozoospermic patients.

Keywords: sperm, infertility, meiotic segregation, FISH, apoptosis.

Sumário

I. Introdução	10
I.1. Infertilidade masculina.....	11
I.2. Análise da segregação meiótica do espermatozóide.....	13
I.3. Análise da Apoptose em espermatozoides.....	17
I.4. Análise de microdeleções do cromossomo Y.....	19
I.5. Justificativa	22
II. Objetivos	23
III. Material e Métodos	25
III.1. Casuística.....	26
III.2. Amostra	26
III.3. Metodologia	27
III.3.1. Estudo citogenético (Moorhead <i>et al.</i> , 1960 modificada por Ferrari, 1968).....	27
III.3.2. FISH (hibridação <i>in situ</i> fluorescente)	28
III.3.2.1. Pré-tratamento da amostra de sêmen	28
III.3.2.2. Protocolo para descondensação	29
III.3.2.3. Técnica de FISH	29
III.3.2.4. Metodologia de análise	31
III.3.3. Detecção de Apoptose	31
III.3.4. Microdeleção da região AZF do cromossomo Y.....	32
III.3.5. Análise Estatística	34
IV. Resultados	35
IV.1. Estudo Citogenético	36
IV.2. Análise dos Espermogramas	37
IV.3. Segregação meiótica	39
IV.4. Detecção da apoptose	44
IV.5. Microdeleções da região AZF do cromossomo Y.....	46
IV.6. Correlação entre dados de segregação meiótica, presença de apoptose e parâmetros do espermograma	47

V. Discussão	48
VI. Conclusões	55
VII. Referencias bibliográficas	57
VIII. Anexos	68
IX. Artigo publicado	75

I. Introdução

I.1. Infertilidade masculina

O casal infértil é definido como aquele que não obteve gravidez após relacionamentos sexuais durante um ano, sem o emprego de qualquer método de anticoncepção (HEALY et al.,1994; GNOTH et al.,2005). A infertilidade masculina é responsável por 50% dos casos de Fertilização *in vitro* e a maioria dos casos de infertilidade masculina é classificada como idiopática (NANASSY e CARRELL, 2008). A análise do sêmen para avaliação do fator masculino constitui a primeira etapa de investigação de infertilidade. A técnica de ICSI (Injeção Intra Citoplasmática do Espermatozóide) é amplamente utilizada no tratamento de homens inférteis com parâmetros seminais alterados. Esta metodologia apresenta-se como uma técnica eficiente na prática clínica, mas existem relatos de aumento da transmissão de defeitos citogenéticos à descendência (BONDUELLE et al., 1998, 2002; VAN STEIRTEGHEM et al., 2002a e 2002b).

O espermograma convencional abrange o estudo dos aspectos particulares da função espermática, como concentração, motilidade e morfologia. Segundo as normas da OMS (Organização Mundial da Saúde) (2002) a concentração dos espermatozóides é caracterizada como (1) Normozoospermia, quando a concentração encontra-se $\geq 20 \times 10^6$ espermatozóides/ml; (2) Oligozoospermia, quando $< 20 \times 10^6$ espermatozóides/ml; (3) Polizoospermia, quando $\geq 200 \times 10^6$ espermatozóides/ml; (4) Azoospermia, quando não há nenhum espermatozóide no ejaculado.

A motilidade, também classificada pela OMS (1992), pode ser diferenciada em Tipo A, quando os espermatozóides são móveis com progressão rápida; Tipo B, para

espermatozoides móveis com progressão lenta; Tipo C, quando há espermatozoides móveis sem progressão e Tipo D quando os espermatozoides encontram-se imóveis.

A morfologia é avaliada pela coloração de Shorr e os espermatozoides são classificados em dois grupos: (A) Normal, sendo a cabeça levemente oval, única e lisa sem gotas citoplasmáticas e o acrossoma ocupando cerca de 40% a 70% da cabeça. O diâmetro varia de 3 a 5 μl , podendo apresentar até dois vacúolos citoplasmáticos. A peça intermediária deve medir de 6 a 10 μm e a cauda deve ser única e desenrolada, com um tamanho de 45 μm . (B) Anormal, com diferentes alterações: (B1) No acrossoma, que pode ser pequeno (<40%) ou grande ($\geq 70\%$); (B2) No corpo e peça intermediária, que podem ser alterações da peça intermediária larga, da gota intracitoplasmática ou da peça intermediária separada; (B3) Alterações estruturais, que incluem forma piriforme, achatada, forma de ampulheta, superfície irregular, presença de mais de dois vacúolos, forma achatada no sitio de implantação da cauda ou forma redonda; (B4) Alterações da cauda, divididas em inserção anômala, cauda espiralada, ângulo $>90^\circ$ e formas imaturas.

A vitalidade é avaliada através da combinação dos corantes eosina e nigrosina. O resultado é apresentado em porcentagem total dos espermatozoides vivos. Os não corados conservam a sua membrana íntegra. Para considerar entre os parâmetros normais a amostra deve apresentar mais do 50% dos espermatozoides vivos (OMS, 2002).

I.2. Análise da segregação meiótica do espermatozóide

A análise do espermatozóide fornece informação sobre anormalidades numéricas e estruturais que conseguiram finalizar a meiose sem serem detectadas pelos *checkpoints* meióticos. O espermatozóide pode ser analisado por duas diferentes metodologias: (1) fecundação *in vitro* heteróloga e (2) Hibridação *in situ* fluorescente (FISH) em núcleos descondensados.

A fecundação *in vitro* heteróloga permite a análise direta da constituição cromossômica do espermatozóide (RUDAK et al., 1978). A técnica é baseada na fusão de ovócitos de hamster com espermatozóides humanos e subsequente análise dos cromossomos do pró-núcleo masculino. Os cromossomos obtidos por este método podem ser analisados por técnicas convencionais de citogenética e por FISH.

A Hibridação *In Situ* Fluorescente (FISH), utilizando sondas de DNA marcadas com fluorocromos, permite a detecção de seqüências específicas de DNA para identificar mudanças numéricas ou estruturais presentes nas células. Constitui uma técnica rápida e alternativa para detecção de anomalias cromossômicas em espermatozóides. Não é necessária a habilidade de fertilizar ou motilidade para o sucesso da FISH, sendo que pacientes com 100% de espermatozóides anormais podem ser avaliados pela técnica. As primeiras publicações sobre esta utilização da FISH foram realizadas por ROBBINS e colaboradores (1993) e por HOLMES & MARTIN (1993). Uma década antes, JOSEPH e colaboradores (1984) estudaram as aneuploidias em espermatozóides com a técnica de hibridação *in situ* (ISH) não fluorescente.

A meiose masculina foi primeiramente analisada registrando as anomalias cromossômicas numéricas. Com as diferentes sondas de DNA disponíveis no mercado foi possível também analisar a segregação meiótica de pacientes portadores de translocações e inversões (VAN HUMMELEN et al., 1996). Atualmente é plausível fazer combinações de sondas para estudar a segregação meiótica de determinados pacientes com aneuploidias, assim como também pacientes portadores de rearranjos estruturais. Pacientes expostos a determinados agentes mutagênicos também têm sido avaliados (MARTIN AND BARCLAY, 1996) para análise de segregação e futuro aconselhamento genético.

Para o estudo de aneuploidias podem ser utilizadas as sondas de enumeração, sendo estas centroméricas (CEP) (PELLESTOR et al., 2001), ou sondas de sequência única (LSI). Para rearranjos estruturais utilizaram-se combinações de sondas CEP, LSI ou teloméricas de acordo com o rearranjo a ser analisado (OLIVER-BONET et al., 2002; CIFUENTES et al., 1998) e sondas WCP (whole chromosome painting), que podem também avaliar translocações robertsonianas, diferenciando os gametas normais e balanceados na segregação alternada (MOREL et al., 2001).

A literatura apresenta dados de frequências de aneuploidias de vários cromossomos em pacientes inférteis com parâmetros seminais normais e anormais (DURAKBASI-DURSun et al., 2008 ; VEGETTI et al., 2000; PANG et al., 1999;). As frequências de aneuploidias para os cromossomos variam de acordo com a presença de oligozoospermia leve ou severa, teratozoospermia e astenozoospermia, assim como a combinação dessas alterações nos parâmetros seminais (MARTIN et al., 2003).

As anormalidades cromossômicas apresentam-se mais frequentes em espermatozoides de homens inférteis que na população geral, predominando as

anormalidades de cromossomos sexuais (NICOPOULLOS et al., 2008). A frequência de dissomias varia entre 0,15%-5,4% (SANCHEZ-CASTRO et al., 2009; PANG et al., 1999). MARTIN e colaboradores (2003) determinaram as frequências de dissomias para os cromossomos 13, 21, X e Y em grupos de oligozoospermicos leve, moderado e severo. Nestes subgrupos as frequências variaram entre 0,30%; 0,24%; 0,17% , respectivamente para o cromossomo 13, sendo 0,58%; 0,44%; 0,22% para o cromossomo 21. Para o par sexual as frequências variaram de 0,04% para YY (leve) a 0,25% para dissomia XY.

Resultados publicados sobre pacientes inférteis têm demonstrado que homens com parâmetros seminais alterados apresentam aumento da incidência de aneuploidias e diploidias em comparação com a população geral (BERNARDINI et al., 1998; ARÁN et al., 1999; PANG et al., 1999; EGOZCUE et al., 2000; VEGETTI et al., 2000; CALOGERO et al., 2001; MARTIN et al., 2003). Alguns autores consideram que o aumento da taxa de anormalidades cromossômicas é inversamente proporcional à concentração espermática (VEGETTI et al., 2000; MARTIN et al., 2003). Estudos genéticos têm sugerido que as anormalidades cromossômicas podem ser explicadas por erros meióticos (SARRATE et al., 2005) sendo os erros associados às mutações em genes meióticos específicos envolvidos no processo sináptico de recombinação e reparo do DNA (BAARENDS et al., 2001) e fatores ambientais (MROZ et al., 1999; EGOZCUE et al., 2000). Alguns estudos relataram mutações gênicas no bloqueio meiótico, que é considerado o início da produção de gametas cromossomicamente não balanceados (MIYAMOTO et al., 2003; JUDIS et al., 2004; SCIURANO et al., 2006).

A introdução da técnica de ICSI (PALERMO et al., 1992) revolucionou o tratamento de casais inférteis com fator masculino severo. O estudo da relação entre

parâmetros alterados do sêmen e o aumento da incidência de aneuploidias nos espermatozoides de homens inférteis tornou-se de suma importância devido ao possível risco de transmissão de aneuploidias aos descendentes (SANCHEZ-CASTRO et al., 2009). Considerando este aspecto, alguns estudos têm analisado as repercussões clínicas das anormalidades cromossômicas dos espermatozoides para ciclos de Fecundação *in vitro* (FIV). Os resultados demonstraram que as aneuploidias e as diploidias em homens inférteis estavam diretamente relacionadas às falhas de implantação recorrentes depois de ciclos de ICSI (BURELLO et al., 2003; NICOPOULLOS et al., 2008), abortos recorrentes (PANG et al., 1999; RUBIO et al., 2001) e ao aumento da frequência de aneuploidias em recém-nascidos (BONDUELLE et al., 2002; DEVROEY e VAN STEIRTEGHEM, 2004).

As trissomias de origem paterna apresentam uma importante variação, de acordo com o cromossomo envolvido. A não-disjunção paterna é responsável por aproximadamente 50% dos casos 47,XXY, 100% dos 47,XYY e 5 a 10% dos casos de trissomias dos cromossomos 13, 14, 15, 21 e 22 (HASSOLD et al., 1996).

As aneuploidias originam-se de erros na meiose I ou meiose II. A teoria mais aceita é a não-disjunção de bivalentes (ZENZES et al., 1992; KAMIGUCHI et al., 1993; DAILEY et al., 1996). Os mecanismos que poderiam levar a não-disjunção podem ser apresentados como redução na recombinação meiótica e defeitos na sinapse dos cromossomos (MARTIN et al., 2005).

UROZ e colaboradores (2008) relataram a existência de separação prematura de cromátides irmãs, o que explicaria o ganho e a perda de cromátides. Este modelo foi proposto por ANGELL em 1991, ao observar cromátides extras em fixações de oócitos em metáfase II (MII). A pré-divisão de cromátides irmãs pode ser equilibrada

ou desequilibrada, podendo ou não causar perdas e ganhos de material genético. A separação prematura das cromátides também tem sido frequentemente observada em síndromes de instabilidade cromossômica. Estudos em células somáticas sugerem que a base desse fenômeno seja erros no processo de *checkpoint* (MATSUURA et al., 2000).

I.3. Análise da Apoptose em espermatozóides

A formação do espermatozóide é um processo único envolvendo uma série de mitoses e meiose, mudanças na arquitetura do citoplasma, substituição das histonas por proteínas de transição e a adição final das protaminas, levando à cromatina fortemente compactada (KUMAROO et al., 1975). Falhas na compactação do DNA por protaminação inadequada, levariam a presença de “cortes” ou chanfraduras no DNA, próprios do processo de protaminação. A presença de chanfraduras endógenas em espermatozóides é característica de células apoptóticas (GORCZYCA et al., 1993a,b). A Apoptose é um tipo de morte celular envolvida em diferentes passos da espermatogênese, primeiro na puberdade, no início da espermatogênese e nas gônadas adultas controlando a espermatogênese normal. Vários estudos demonstraram que a desregulamentação do processo de apoptose nas células germinativas poderia resultar em infertilidade masculina (SAKKAS et al., 1999). Em pacientes oligozoospermicos, a proporção de células apoptóticas (determinada por ter a sinalização da proteína Fas) seria maior que em pacientes normozoospermicos (SAKKAS et al., 1999) pela presença de apoptose “abortiva”. As células germinativas,

presentes em baixo número, não seriam eliminadas para atingir a capacidade das células de Sertoli para completar o processo de proliferação e diferenciação celular (SAKKAS et al., 1999) (Figura 1). Ainda não está claro porque marcadores apoptóticos em espermatozóides poderiam ser resíduos de uma apoptose “abortiva”, pois depende se o processo iniciou antes da ejaculação, ou se a apoptose foi iniciada após ejaculação (SAKKAS et al., 1999a,b; TESARIK et al., 2002; LACHAUD et al., 2004). Vários estudos têm explorado a relação entre parâmetros seminais e apoptose no sêmen ejaculado, mas a relação entre morfologia e apoptose não está bem caracterizada (AZIZ et al., 2007). A relação entre aneuploidias cromossômicas e apoptose em pacientes oligozoospermicos ainda não foi descrita na literatura.

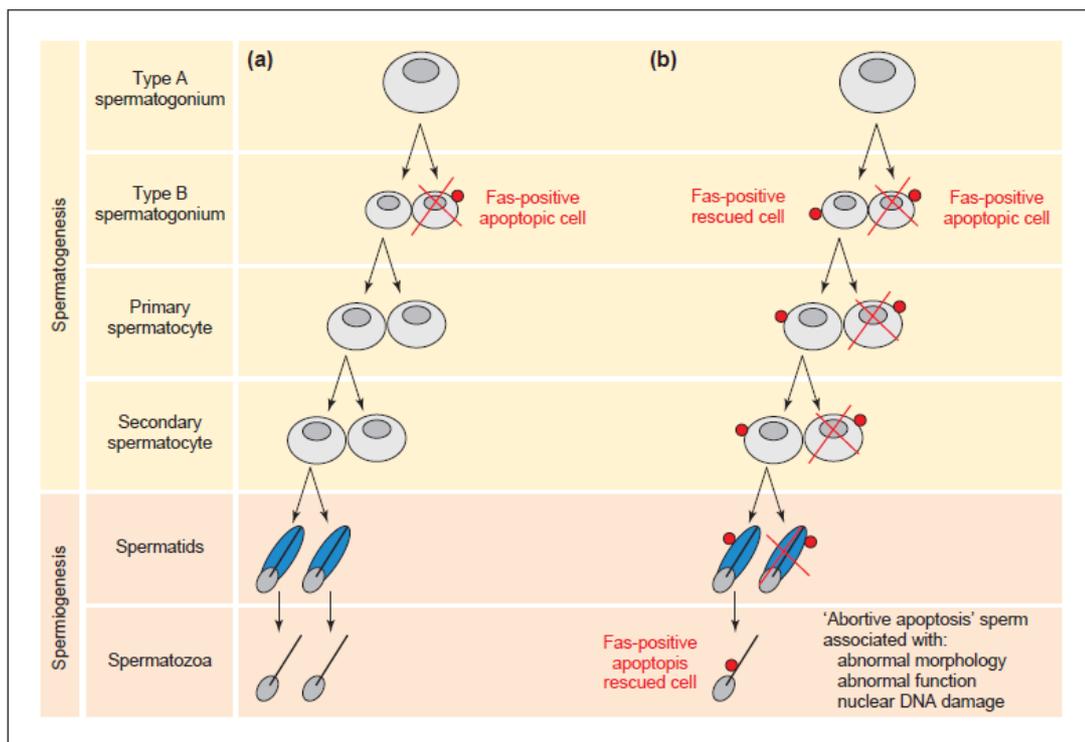


Figura1: Espermatogênese de homens com parâmetros seminais: a) normais b) anormais.

A detecção de células apoptóticas pode ser realizada pela quantificação de células com a presença de indicadores apoptóticos como a proteína Fas ou Caspase-3 e

Caspase-8, assim como detecção de quebras na fita de DNA (uso de corantes específicos) e detecção de mudanças nas mitocôndrias (Haugland, 1996). Também pode ser detectada a presença da proteína de membrana fosfatidilserina, própria da face interna da membrana celular, a qual é exposta exteriormente, sinalizando a apoptose. A externalização da fosfatidilserina implica no reconhecimento e fagocitose pelos macrófagos. A detecção da fosfatidilserina é utilizada como um marcador tardio da apoptose. Na técnica emprega-se o anticoagulante anexina V, que é uma proteína de união a fosfolipídios dependente de cálcio e apresenta alta afinidade pela fosfatidilserina. A anexina V é marcada com molécula fluorescente (FITC = *fluorescein*), possibilitando a identificação de células apoptóticas pela exposição da fosfatidilserina ao exterior da membrana plasmática. Para a detecção de células necróticas, pode ser utilizado o corante PI (propidium iodide). Esta técnica permite a detecção dos resultados com citometria de fluxo e o uso de microscópio de fluorescência. Vários kits de diferentes empresas existem no mercado com diferentes fluorocromos e corantes vitais. O kit Vybrant Apoptosis Assay Kit #3 permite observar células apoptóticas em coloração verde (FITC) e células necróticas em vermelho (PI), com fácil observação em microscópio de fluorescência (VERMES et al., 1995)

I.4. Análise de microdeleções do cromossomo Y

Diferentes microdeleções do cromossomo Y foram descritas recentemente. As microdeleções causam falhas na espermatogênese resultando em infertilidade masculina. A região gênero específica do cromossomo Y (MSY), que compreende 95%

do cromossomo, é franqueada pelas regiões pseudo-autossômicas (SKALESKY et al., 2003). A MSY pode ser afetada por deleções que classicamente são subdivididas em três regiões chamadas AZFa, AZFb, AZFc (VOGT et al., 1996). As microdeleções são relativamente frequentes entre homens inférteis. Homens azoospérmicos apresentam incidência mais alta que oligozoospérmicos, e conseqüentemente a frequência relatada varia entre 2 a 10%, de acordo com as características da amostra da população estudada (KRAUSZ and MCELREAVEY, 1999; KRAUSZ et al., 2001).

O mapa físico completo do cromossomo Y foi descrito por Skalesky e colaboradores, em 2003. Três classes de seqüências foram descritas no MSY: transposta do X, genes degenerados ligados ao X ou pseudo-genes homólogos ligados ao X e seqüências de *amplicon*. As seqüências *amplicon* foram caracterizadas por seqüências pareadas mostrando identidade quase completa (99%), organizada em palíndromos. Posteriormente, a caracterização da região MSY descreveu 156 unidades de transcrição, incluindo 78 genes codificantes de 27 proteínas. A seqüência *amplicon* incluía 60 genes e 74 unidades não codificantes (SIMONI et al., 2004).

Três regiões foram caracterizadas originalmente por mapeamento da região MSY de homens que apresentavam microdeleções, ainda quando a seqüência completa do cromossomo Y não era conhecida completamente (VOGT et al., 1996).

A região AZFa apresenta 1100 kb e inclui uma única cópia do gene DFFRY (USP9) e DBY. Recentemente dados obtidos de vários grupos descrevem a origem da deleção completa de AZFa. A recombinação homóloga entre seqüências retrovirais idênticas do HERVq1 e HERVq2 explicaria o mecanismo da deleção (BLANCO et al., 2000; KAMP et al., 2000; SUN et al., 2000). Dentre esses retrovírus, a recombinação pode ocorrer entre um ou dois blocos de seqüências idênticas denominadas ID1 e ID2,

induzindo dois padrões de deleção diferentes de AZFa (KAMP et al., 2000, 2001; SUN et al., 2000). A deleção completa remove 792 Kb, incluindo os genes USP9 e DBY.

Os mecanismos e os tipos de deleções das regiões AZFb e AZFc foram elucidados na última década (KURODA-KAWAGUCHI et al., 2001). Ambas regiões compreendem 24 genes, a maioria em múltiplas cópias. A deleção completa da AZFb remove 6,2 Mb e resulta da recombinação homóloga de sequências palindrômicas P5/P1 proximal (REPPING et al., 2002). A região AZFc contém 12 genes com número variável de cópias (REPPING et al., 2003). A deleção clássica da AZFc, a mais frequente em homens que apresentam microdeleções do cromossomo Y, remove 3,5 Mb, originada da recombinação homóloga entre os *amplicons* b2 e b4 e sequências palindrômicas P3 e P1, respectivamente (KURODA-KAWAGUCHI et al., 2001). Deleções das regiões AZFb e AZFc ocorrem frequentemente envolvendo recombinação homóloga (REPPING et al., 2002).

As microdeleções clinicamente relevantes abrangem as regiões AZFa, AZFb, AZFbc e AZFc, detectadas em homens azoospermicos e oligozoospermicos. O “Manual de Boas Práticas para o Diagnóstico Molecular de Microdeleções do Cromossomo Y” (SIMONI et al., 2004) determina os *primers* e as condições para a definição do diagnóstico. Recomenda-se o número mínimo de seis pares de *primers* para as regiões AZF, além de dois *primers* controles do gene ZFY e SRY. Os *primers* utilizados para a região AZFa são sY84, sY86; para AZFb: sY127, sY134; para AZFc: sY254, SY255.

As microdeleções da região AZFa resultam em Síndrome de célula única de Sertoli e azoospermia (VOGT et al., 1996; KRAUSZ et al., 2000; KAMP et al., 2001; KLEIMAN et al., 2001; HOPPS et al., 2003). Deleções completas da região AZFb e AZFc resultam em interrupção da espermatogênese com Síndrome de célula única de Sertoli e azoospermia (KRAUSZ et al., 2000; HOPPS et al., 2003). Homens portadores de

microdeleção da região AZFc podem apresentar fenótipo variável (REIJO et al., 1996; LUETJENS et al., 2002; OATES et al., 2002).

I.5. Justificativa

Apesar de existirem alguns relatos na literatura sobre as frequências de aneuploidias em espermatozóides, não encontramos resultados associando as aberrações cromossômicas à morfologia celular e à caracterização da apoptose em células germinativas de pacientes oligozoospermicos.

Alguns estudos foram publicados sobre as frequências dos cromossomos envolvidos. Entretanto, a amostra é heterogênea, incluindo tanto olizoospermicos, oligoastenoospermicos, oligoteratoospermicos, oligoastenoteratoospermicos como pacientes normais e pacientes com cariótipo normal e alterado (TEMPEST *et al.*, 2004). Até o momento não há referência na literatura sobre a segregação dos cromossomos 3, 13, 21, 22, X e Y em pacientes inférteis .

A informação sobre as frequências de células apoptóticas e necróticas em pacientes oligozoospermicos, adicionada à frequência de aneussomias cromossômicas em células germinativas possibilitará melhor conhecimento sobre a etiologia da infertilidade.

Adicionalmente, para correlacionar erros de segregação meióticas e o efeito da apoptose em pacientes inférteis que apresentam oligozoospermia, é imperioso determinar *a priori* o cariótipo do paciente e a presença de microdeleções do cromossomo Y.

II. Objetivos

O objetivo principal deste projeto foi avaliar a segregação meiótica em espermatozóides de pacientes inférteis, oligozoospermicos.

Os objetivos intermediários foram:

- Determinar a frequência de dissomias dos cromossomos 3, 13, 21, 22, X e Y em espermatozóides de homens inférteis, oligozoospermicos.
- Determinar a presença de espermatozóides intactos ou viáveis, apoptóticos e necróticos, para correlação morfológica.
- Correlacionar os dados da segregação meiótica e a incidência de células germinativas apoptóticas nos pacientes inférteis.
- Comparar os dados obtidos no grupo controle, composto por homens com fertilidade comprovada.

III. Material e Métodos

III.1. Casuística

O Grupo I foi composto de quinze pacientes oligozoospermicos, oligoastenoospermicos, oligoteratoospermicos, oligoastenoteratoospermicos com diagnóstico de infertilidade, encaminhados ao Ambulatório de Esterilidade (AEST) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina (HC-FMRP) da Universidade de São Paulo. Os pacientes foram informados e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP-HCRP nº 5465/2008), referente à participação no projeto de pesquisa. Para correlação estatística, foram ainda obtidas as seguintes informações, a partir de pesquisa autorizada no prontuário HCRP dos pacientes: idade, resultado do espermograma, presença de outras doenças agudas ou crônicas e resultado dos níveis hormonais. As informações estavam contidas na anamnese aplicada para diagnóstico de infertilidade pelo Ambulatório de Esterilidade do HCRP-FMRP-USP.

O Grupo controle (grupo II) foi composto por sete homens férteis, normozoospermicos, que apresentavam cariótipo normal em sangue periférico e histórico de fertilidade comprovada. Os mesmos foram informados sobre o projeto e assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido aprovado pela CEP-HCRP (processo nº 5465/2008).

III.2. Amostra

Foram utilizadas amostras de sêmen dos quinze pacientes do grupo I e amostras de sêmen dos sete homens do grupo controle, todas coletadas no Laboratório de Reprodução Humana do Departamento de Ginecologia e Obstetrícia da FMRP-USP, em

condições estéreis. As amostras foram analisadas no Laboratório de Citogenética Molecular Humana do Departamento de Genética da FMRP-USP (bloco C), utilizadas exclusivamente para esta pesquisa e descartadas segundo o protocolo da OMS.

Foram também coletadas amostras de sangue periférico de todos os indivíduos de ambos os grupos para estudo citogenético e definição do cariótipo. O estudo citogenético foi realizado no Laboratório de Citogenética Molecular Humana do Departamento de Genética da FMRP-USP (bloco C).

III.3. Metodologia

III.3.1. Estudo citogenético (Moorhead *et al.*, 1960 modificada por Ferrari, 1968).

A amostra de sangue periférico (500 ul) coletada dos pacientes e controles foram cultivados em 5 ml de meio RPMI-1640 (cat n° 11875, GIBCO, Invitrogen) com L-glutamina, 2% de fitohemaglutinina (cat n° 10576-015, GIBCO, Invitrogen), 1,2% de estreptomicina/penicilina (cat n° 15140-148, GIBCO, Invitrogen) e 20% soro bovino fetal (cat n° 12657-029, GIBCO, Invitrogen em estufa a 37°C por 72 horas. As células foram bloqueadas em metáfase após 71 horas e meia por meio da adição de 250 ul de colchicina a 0,0016% (cat n° C3915-1G, Sigma). Após trinta minutos, foi realizada centrifugação a 1000 rpm por 10 minutos, sendo o sobrenadante retirado e adicionados 5 ml de solução hipotônica (KCL 0,075M) a 37° C seguido de incubação em banho Maria por 10 minutos. Adicionaram-se 10 gotas de solução Carnoy (3 metanol: 1 ácido acético) para bloquear a

ação da solução hipotônica a após homogeneização, foi realizada centrifugação a 1000 rpm por 10 minutos. O sobrenadante foi retirado e iniciou-se a fase de fixação com adição de 5 ml de solução de Carnoy . O material foi homogeneizado e deixado em repouso por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, centrifugado a 1000 rpm por 10 minutos e o sobrenadante removido, sendo este procedimento repetido mais duas vezes. A suspensão celular foi armazenada em tubos cônicos a -20°C. As células em metáfase obtidas a partir da suspensão celular foram transferidas para lâminas e coradas por 5 minutos com corante Giemsa (Merck) em tampão fosfato 0,06M pH=6,8 (1:30) para análise citogenética convencional. Uma gota de suspensão celular de cada amostra foi transferida para uma lâmina para obtenção do bandeamento GTG. Esta lâmina foi submetida a um tratamento com solução de tripsina (DIFCO 1:250) diluída a 0,1% em tampão fosfato (0,06 M, pH=6,8) e corada por corante Giemsa (Scheres, 1972). Foram analisadas 100 metáfases de cada paciente a fim de descartar a hipótese de mosaicismo cromossômico a nível de 3% (Hook et al., 19e77). A análise foi realizada em microscópio Axiophoto (Zeiss), com objetiva PlanApo100X, acoplado a sistema computadorizado de análise MetaSystem, utilizando software IKARO para documentação dos resultados.

III.3.2. FISH (hibridação *in situ* fluorescente)

III.3.2.1. Pré-tratamento da amostra de sêmen

As amostras de sêmen fresco foram coletadas em frascos estéreis e após liquificação tratadas com solução de 0,01M Tris e 0,9% NaCl e centrifugadas a 1000

rpm durante 5 minutos por três vezes. As lâminas foram confeccionadas com 5 µl da amostra, secas em temperatura ambiente e desidratadas em metanol 80% à -20°C por 20 minutos e armazenadas a -20°C para conservação.

III.3.2.2. Protocolo para descondensação

Para a descondensação do núcleo dos espermatozóides foram utilizados 20 mM DTT (dithiothreitol) (cat n° 20710, Serva) em 0,1 M Tris (cat n°, Invitrogen) (solução 1), agente que induz a redução das pontes de dissulfeto, e 10 mM LIS (lithium diiodosalicylic acid) (cat n° 413290050, Acrós organics) e 1 mM de DTT em 0,1 M Tris (solução 2) para conservar a forma oval da cabeça do espermatozóide. Em média, o tratamento com 20 mM DTT (dithiothreitol) em 0,1 M Tris durou de 20 a 35 minutos, tempo suficiente para que o núcleo dos espermatozóides ficasse cerca de duas vezes e meia maior que o normal. As lâminas que passaram por um tratamento 20 minutos na solução 1 permaneceram por duas horas na solução 2, e as que necessitaram de um tratamento de 35 minutos na solução 1, passaram por um tratamento de 3 horas na solução 2. Após secas a temperatura ambiente, as lâminas foram rapidamente imersas em solução de 2x SSC e desidratadas em Metanol 80% a -20°C.

III.3.2.3. Técnica de FISH

As lâminas foram mergulhadas em solução de pepsina 0,005% em 10 mM HCl a 37° por dez minutos, lavadas em PBS/MgCl₂ por cinco minutos com agitação à temperatura ambiente, em PBS/MgCl₂/formaldeído sem agitação por dez minutos,

lavadas em PBS por cinco minutos e desidratadas em série de etanol (70, 90 e 100%) por cinco minutos cada.

A hibridação foi realizada em duas etapas (3/X/Y e 13/21/22) para cada paciente. Para avaliar os cromossomos X, Y e 3 foram utilizadas as sondas específicas para os cromossomos X (CEP X, *Locus DXZ1, PlatinumBright550*; Poseidon, Kreatech), Y (SE Y class q arm, Yqh, *PlatinumBright495*; Poseidon, Kreatech) e duas sondas para o cromossomo 3 (SE 3, *Locus D3Z1, PlatinumBright495*; Poseidon, Kreatech e SE 3, *Locus D3Z, PlatinumBright550*; Poseidon, Kreatech) com a finalidade de detectar a coloração amarela. No set de hibridação 13/21/22 aplicaram-se as sondas 21 (LSI 21, região 21q22.13 – q22.2, *SpectrumOrange*; Vysis), 22 (LSI 22, região 22q11.2, *SpectrumGreen*; Vysis) e duas sondas para o 13 (LSI RB1, *Locus RB1 SpectrumOrange*; Vysis e LSI RB1, *Locus RB1, SpectrumGreen*; Vysis) também com a finalidade de observar a coloração amarela.

A denaturação foi realizada em solução de Formamida (cat n° 1.09684.1000, Merck) 70% em 2XSSC a 74°C em banho-maria, seguida de banho em etanol a 70% a -20°C, 90% e 100% a temperatura ambiente. A solução composta por 1ul de cada sonda e 7ul de solução tampão foi denaturada à temperatura determinada pelo fabricante das sondas. Imediatamente, foi adicionada à lâmina e coberta por lamínula 22X 22mm. A lâmina foi mantida em câmara úmida *overnight* a 37°C.

As lâminas foram lavadas em Formamida 50%/2XSSC a 46°C por cinco minutos, três vezes seguidas. Posteriormente as lâminas foram submetidas a um banho de 2XSSC à 46°C por cinco minutos e um último banho em solução de 2XSSC/0,1% NP40 (Nonidet P-40)(cat n° 0896, Sigma) a 46°C por cinco minutos. Todos os banhos foram realizados com agitação. O contracorante utilizado foi o DAPI (75ng/ml) diluído em antifade (Vector, CA).

III.3.2.4. Metodologia de análise

Foram analisadas 2000 células para sondas dos cromossomos 3, X e Y e 2000 células para as sondas dos cromossomos 13, 21 e 22 totalizando 4000 gametas de cada indivíduo. Foi utilizado microscópio Olympus BX-40 acoplado a sistema computadorizado de análise do Laboratório de Citogenética do HCRP. Para análise, utilizou-se o software FISH Review EXPO (ASI Ltda, Israel).

O critério de análise e contagem de sinais foram descritos por Downie e colaboradores (1997). Os critérios determinam que sejam avaliados espermatozóides com sinais de igual tamanho e intensidade. Se o gameta apresentar dois sinais, devem estar separados por ao menos um domínio de distancia. Os sinais devem estar posicionados dentro do núcleo. Quando o espermatozóide apresentar dois sinais, checar sobreposição de gametas. Avaliar a presença de caudas para não incluir células somáticas. Espermatozóides sobrepostos foram eliminados da contagem, assim como sinais não classificáveis.

III.3.3. Detecção de Apoptose

A detecção da externalização da fosfatidilserina foi obtida com o kit *Vybrant Apoptosis Assay* da Invitrogen Ltd (UK). O kit é composto por annexin V conjugado com FITC e Iodeto de Propídeo, capazes de diferenciar células viáveis, apoptóticas e células necróticas.

Uma alíquota das amostras de sêmen foi lavada duas vezes em solução de PBS, utilizando 2 ml de PBS para cada ml de amostra. Após centrifugação a 1000 rpm por 5 minutos, 5 µl do pellet (aproximadamente 10^6 células) foram ressuspensos em tampão 1X *annexin-binding*. Foram adicionados 15 µl de anexina V conjugada e 1 µl de solução de PI (iodeto de propideo) 100 µg/ml. O tempo de espera foi de 15 minutos. Foram realizadas lavagens com tampão 1X *annexin-binding* e confeccionada a lâmina com 5 µl do pellet. Após secagem, foram adicionados 15 µl de antifade (Vector) em lamínula.

A contagem e a observação dos espermatozoides foram realizadas em microscópio epifluorescente Olympus BX-40 acoplado a sistema computadorizado de análise, com auxílio do software FISH View EXPO (ASI Ltda., Israel). Para cada amostra, 500 gametas foram analisados. Espermatozoides intatos (sem cor) e necróticos (vermelhos) foram diferenciados pela cor emitida, luz UV. Além disso, foram diferenciadas células apoptóticas iniciais (verdes) e células no final do processo apoptótico (verdes e vermelhas).

III.3.4. Microdeleção da região AZF do cromossomo Y

Duas reações de PCR multiplex foram desenhadas para a análise das três regiões AZF do cromossomo Y. Ambas apresentavam 5 fragmentos, três locos AZF e dois fragmentos controles SRY e ZFY. O protocolo foi descrito por SIMONI e col. (2004). Os primers empregados foram:

A and B ZFY-F: 5' - ACC RCT GTA CTG ACT GTG ATT ACA C – 3'
 ZFY-R: 5' - GCA CYT CTT TGG TAT CYG AGA AAG T – 3'

A and B SRY -F: 5' - GAA TAT TCC CGC TCT CCG GA – 3'
 SRY -R: 5' - GCT GGT GCT CCA TTC TTG AG – 3'

A. sY86-F: 5' - GTG ACA CAC AGA CTA TGC TTC – 3'
 sY86-R: 5' - ACA CAC AGA GGG ACA ACC CT – 3'

A. sY127-F: 5' - GGC TCA CAA ACG AAA AGA AA – 3'
 sY127-R: 5' - CTG CAG GCA GTA ATA AGG GA – 3'

A. sY254-F: 5' - GGG TGT TAC CAG AAG GCA AA – 3'
 sY254-R: 5' - GAA CCG TAT CTA CCA AAG CAG C – 3'

B. sY84-F: 5' - AGA AGG GTC TGA AAG CAG GT – 3'
 sY84-R: 5' - GCC TAC TAC CTG GAG GCT TC – 3'

B. sY134-F: 5' - GTC TGC CTC ACC ATA AAA CG – 3'
 sY134-R: 5' - ACC ACT GCC AAA ACT TTC AA – 3'

B. sY255-F: 5' - GTT ACA GGA TTC GGC GTG AT – 3'
 sY255-R: 5' - CTC GTC ATG TGC AGC CAC- 3'

Para a reação de PCR foi utilizado o kit Quiagen PCR multiplex (cat. N° 206143, Quiagen, Hilden, Germany).

A reação de PCR incluiu: 25 µl da Master Mix, 5 µl de primer mix A ou B e 200ng de DNA. As condições de amplificação começaram com um passo de ativação de 15 minutos a 95° C, seguido de 35 ciclos de 30 segundos de desnaturação (94°C), 90 segundos de anelamento (57°C) e 60 segundos de alongação, finalizando 10 minutos a 4° C.

Os produtos de reação foram separados em gel de agarose (Invitrogen) 2% em TBE (Tris, ácido Borico, EDTA). Utilizamos o marcador DNA Agar (Serva, Germany) tamanho???...kb. O tempo de corrida foi de 5 horas a 100V.

Quando ocorre deleção completa, não há amplificação dos dois marcadores específicos da região. Se ocorrer deleção parcial, em AZFa ou AZFb, somente um dos marcadores desta região será amplificado. Se ocorrer deleção eletiva dos marcadores sY254 e sY255, o resultado deve ser cautelosamente confirmado, para excluir artefato de técnica.

III.3.5. Análise Estatística

A análise estatística dos dados foi realizada com o software SAS (2001) e para confecção de gráficos e tabelas foi utilizado o software EXCEL, de Microsoft Office 2000.

IV. Resultados

IV.1. Estudo Citogenético

Todos os homens do grupo II, correspondente ao grupo controle, apresentaram cariótipo normal 46, XY, compatível com normalidade para o sexo masculino.

A tabela I descreve os resultados dos cariótipos dos pacientes inférteis, do grupo I. Dois pacientes apresentaram mosaïcismo cromossômico com cromossomo marcador extra-numerário (O15 e O23) e dois pacientes (O6 e O19) apresentaram polimorfismo na região heterocromática do braço longo do cromossomo 9 (O6 e O19) (Anexo IV).

Tabela I: Cariótipo dos pacientes do grupo 1.

Paciente	Cariótipo
O1	46,XY
O2	46,XY
O3	46,XY
O4	46,XY
O6	46,XY,9qh+
O7	46,XY
O8	46,XY
O9	46,XY
O13	46,XY
O15	46,XY[97]/47,XY,+mar[3]
O19	46,XY,9qh+
O20	46,XY
O21	46,XY
O23	46,XY[93]/47,XY,+mar[7]
O24	46,XY
O25	46,XY

IV.2. Análise dos Espermogramas

Análise dos espermogramas evidenciou oligoastenoteratozoospermia em todos os pacientes inférteis. Os indivíduos O1, O3, O4, O6, O8, O9, O13 (tabela II) foram classificados como oligozoospermicos severos ($\leq 5 \cdot 10^6$ spz/ml). Diferenças significativas na concentração espermática, motilidade (subgrupo D), vitalidade e morfologia ($p < 0,05$) foram evidenciadas após comparação dos dados dos espermogramas dos pacientes e dos controles, utilizando o teste T (Student).

Tabela II: Resultados dos espermogramas dos pacientes inférteis.

ESPERMOGRAMA	O1	O2	O3	O4	O6	O7	O8	O9	O13	O15	O19	O20	O23	O24	O25	
abstinencia (dias)	3	6	7	3	5	4	3	5	1	5	5	4	3	4	1	
liquefação (min)	10	20	25	15	15	20	20	35	10	7	35	10	60	20	25	
volume (ml)	4,5	2	4	5,2	2,7	4,5	2,5	1,6	2,8	2,1	6	3,6	1,8	3,1	4,5	
viscosidade	normal	normal	normal	normal	normal	normal	aumentada	Normal	normal	normal	aumentada	normal	aumentada	normal	aumentada	
ph		9	8,5	8,5	8,5	9	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8,5	8	8,5	9
conc 10 6 spz/ml	4,05	5,95	0,1	3	< 0,1	25	1,95	3,9	0,65	11,5	6,1	19	9	10	11,5	
conc total 10 6 spz	18,22	11,9	0,4	15,6	< 0,27	112,5	4,88	6,24	1,82	24,15	36,6	68,4	16,2	31	51,75	
A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	
B	17	0	0	4	0	7	0	0	8	21	14	34	17	21	29	
C	45	46	32	26	4	38	21	31	59	45	47	41	34	47	44	
D	38	54	68	70	96	55	79	69	33	34	39	25	49	32	27	
vitalidade %	75	79	61	89	57	88	44	85	89	85	88	95	86	87	89	
morfologia %	2	0	0	4	0	1	0	1		7	1	1	1	3	4	

IV.3. Segregação meiótica

Para a análise da segregação meiótica dos cromossomos 3, 13, 21, 22, X e Y foram avaliados 67.126 espermatozoides de quinze pacientes com diagnóstico de infertilidade e oligozoospermia. Foram avaliados 30.061 gametas dos indivíduos do grupo controle. As frequências de dissomias dos cromossomos 3, X e Y estão sumarizadas na tabela III e dos cromossomos 13, 21 e 22 na tabela IV. As médias das frequências de dissomias podem ser observadas nas figuras 2 e 3 nos pacientes e controles.

A porcentagem de aneuploidia (2x dissomia) total referente aos seis cromossomos estudados foi de 6,88 % (2x 3,44%) para o grupo 1 e de 3,98% (2x 1,99%) para os controles. A frequência de dissomias dos cromossomos autossômicos foi de 2,29% no grupo infértil e 1,99% nos controles. Considerando os cromossomos sexuais, a incidência foi de 1,04% no grupo 1 e de 0,58% no grupo 2.

Tabela III: Porcentagens de euploidia, dissomia dos cromossomos 3, X e Y e diploidia no grupo 1

Paciente	euploide X (%)	euploide Y (%)	XY (%)	XX (%)	YY (%)	dissomia 3 (%)	Diploidia (%)
O1	49,91	46,88	1,40	0,35	0,17	0,64	0,64
O2	48,30	49,60	0,45	0,30	0,30	0,45	0,60
O3	48,32	50,00	0,63	0,14	0,14	0,49	0,28
O4	49,75	48,46	0,70	0,20	0,10	0,25	0,55
O6	49,44	47,38	0,77	0,24	0,24	0,64	1,30
O7	43,82	54,75	0,54	0,10	0,10	0,2	0,49
O8	50,69	46,14	1,06	0,11	0,32	1,05	0,63
O9	49,35	48,25	0,75	0,25	0,40	0,1	0,90
O13	50,83	47,58	0,83	0,08	0,08	0,17	0,42
O15	44,81	53,73	0,69	0,23	0,15	0,23	0,15
O19	48,80	49,10	0,80	0,25	0,05	0,55	0,45
O20	46,18	52,52	0,45	0,05	0,15	0,1	0,55
O23	48,33	50,47	0,35	0,20	0,20	0,2	0,25
O24	48,75	49,55	0,55	0,10	0,15	0,25	0,65
O25	50,35	47,76	0,55	0,25	0,40	0,25	0,45
Média	48,51	49,48	0,70	0,19	0,20	0,37	0,55

Tabela IV: Porcentagens de euploidia, dissomia dos cromossomos 13, 21, 22 e diploidia no grupo 1.

Paciente	Euploide (%)	dissomia 13 (%)	dissomia 21 (%)	dissomia 22 (%)	Diploidia (%)
O1	94,99	0,67	1,54	0,87	1,93
O2	97,01	0,79	0,71	0,55	0,87
O3	97,74	0,45	0,84	0,26	0,64
O4	97,4	0,54	0,64	0,49	0,83
O6	97,46	0,67	0,6	0,27	0,87
O7	97,35	0,4	0,4	0,6	0,95
O8	97,28	0,31	0,54	0,78	0,78
O9	96,91	0,38	1,09	0,52	1,00
O13	98,95	0,3	0,3	0,5	0,45
O15	97,98	0,5	1,05	0,95	0,78
O19	97,86	0,66	0,81	0,9	0,96
O20	97,78	0,55	1	0,65	1,2
O23	97,68	0,75	1,05	0,95	0,95
O24	98,43	0,4	0,65	0,6	0,75
O25	98,3	0,65	0,95	0,65	0,57
Média	97,54	0,53	0,81	0,64	0,90

Nas tabelas V e VI sumarizam-se as freqüências de euploidia, diploidia e dissomias dos cromossomos estudados observadas no grupo controle.

Tabela IV: freqüências dos cromossomos 3, X, Y no grupo 2 (controles).

controle	Euploide X (%)	Euploide Y (%)	XY (%)	XX (%)	YY (%)	Dissomia 3 (%)	Diploidia (%)
C1	50,57	48,54	0,20	0,15	0,15	0,15	0,25
C2	44,30	54,25	0,65	0,25	0,20	0,05	0,30
C3	49,61	49,30	0,16	0,05	0,10	0,21	0,57
C4	50,57	49,08	0,15	0,05	0,05	0,05	0,05
C7	52,00	46,35	0,45	0,30	0,10	0,45	0,35
C8	49,48	49,63	0,15	0,15	0,15	0,1	0,35
C9	45,13	53,79	0,25	0,15	0,20	0,05	0,44
média	48,81	50,13	0,29	0,16	0,14	0,15	0,33

Tabela V: freqüências dos cromossomos 13, 21, 22 no grupo 2.

controle	Euploide (%)	Dissomia 13 (%)	Dissomia 21 (%)	Dissomia 22 (%)	Diploidia (%)
C1	99,23	0,25	0,35	0,3	0,33
C2	98,20	0,20	0,45	0,15	0,90
C3	97,25	0,35	0,70	0,45	1,15
C4	97,40	0,80	0,65	0,50	0,65
C7	98,20	0,30	0,50	0,50	0,50
C8	98,55	0,35	0,45	0,35	0,25
C9	98,22	0,25	0,44	0,54	0,49
média	98,15	0,36	0,51	0,40	0,61

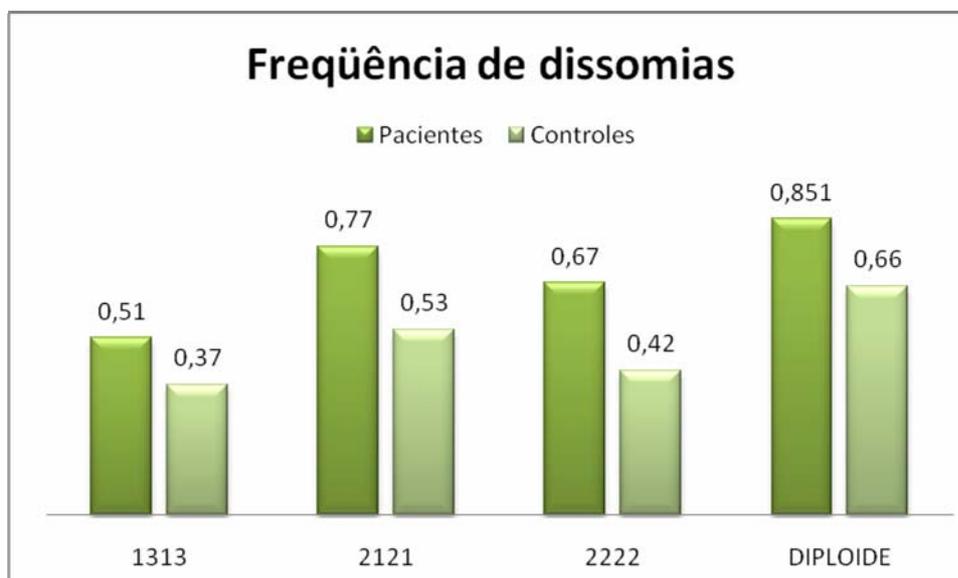


Figura 2: Médias das freqüências de dissomias dos cromossomos 13, 21, 22 nos pacientes e controles.

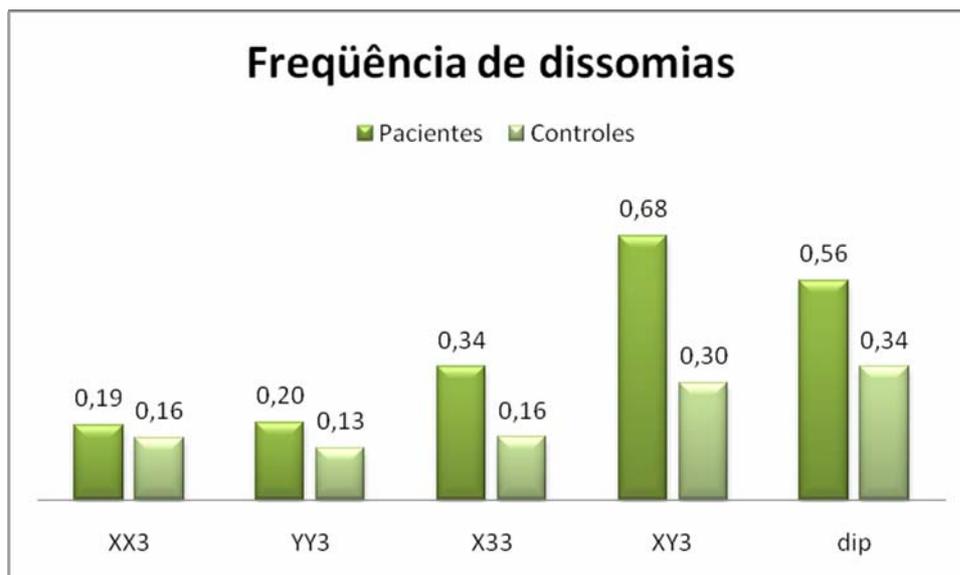


Figura 3: Médias das frequências de dissomias dos cromossomos 3, X e Y.

Utilizando o test T para comparação das médias entre pacientes inférteis e controles, evidenciamos diferenças significativas para os cromossomos autossômicos 13, 21, 22 ($p < 0,05$) assim como para a dissomia XY ($p < 0,05$). Para a dissomia do cromossomo 3, a diferença não foi significativa ($p=0,05$).

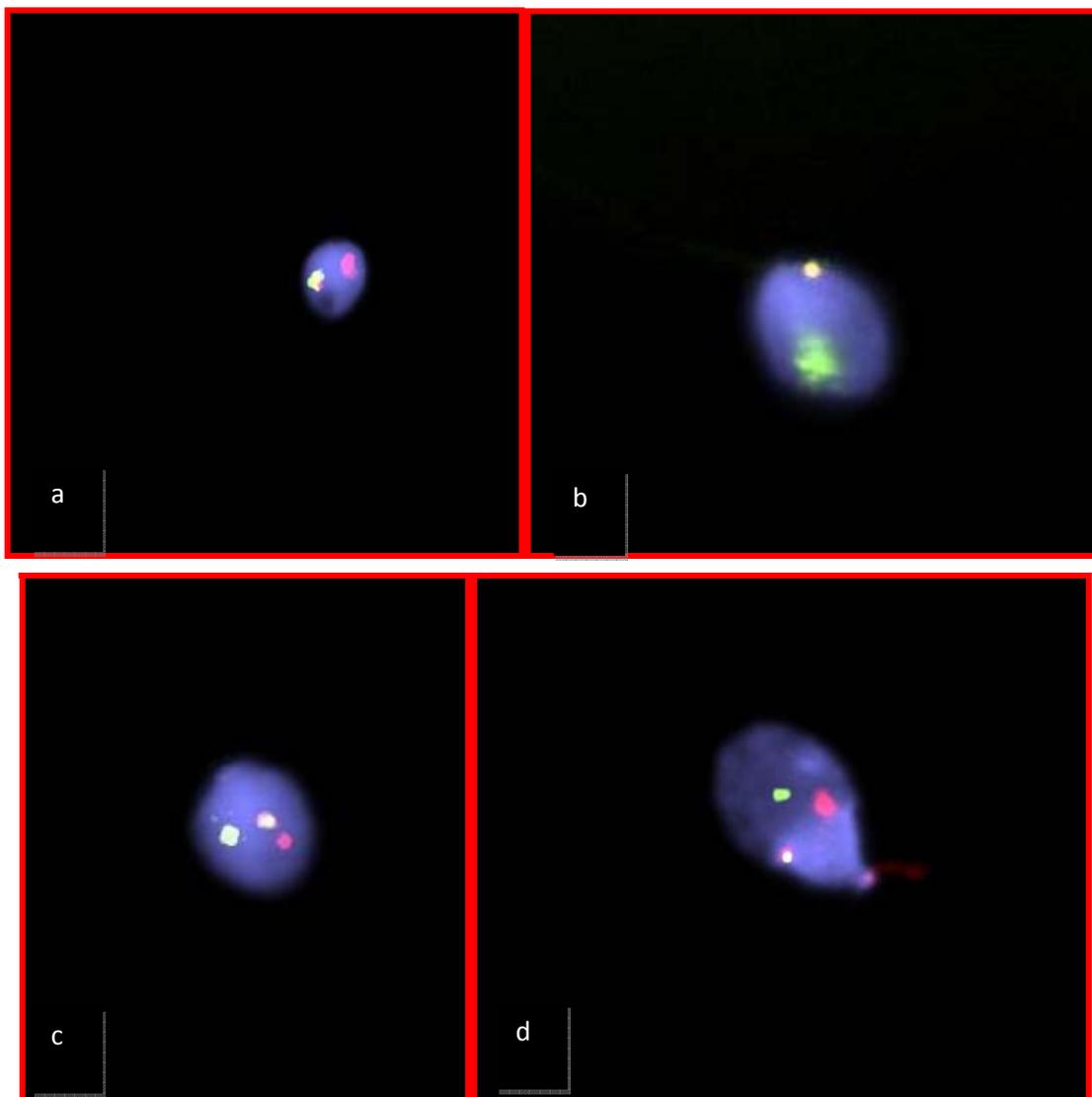


Figura 4: Resultado da hibridação das sondas dos cromossomos 3(amarelo), X (vermelho) e Y (verde) em espermatozóides: a) cromossomo Y e cromossomo 3; b) cromossomo X e 3; c) dissomia 3 e cromossomo X; d) dissomia XY e cromossomo 3.

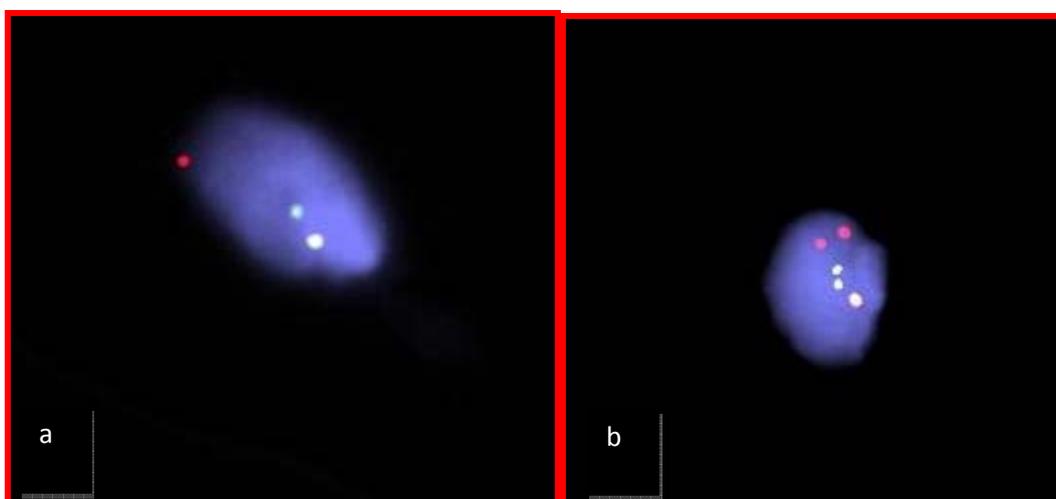


Figura 5: a) gameta normal para os cromossomos 13 (amarelo), 21 (vermelho) e 22 (verde) b) dissomia 21, 22 e monossomia de 13.

IV.4. Detecção da apoptose

Foram avaliados 9.079 espermatozóides referentes a pacientes (n=5578) e controles (n=3501). A percentagem média de espermatozóides apoptóticos foi de 15,72%, a percentagem de gametas necróticos foi de 10,64%, sendo consideradas normais 73,07% das células germinativas dos pacientes inférteis (figura 6). Nos controles (grupo II), a frequência média de gametas apoptóticos foi de 6,48%, 6,88% necróticos e 86,4% normais. A comparação entre as frequências de espermatozóides apoptóticos em inférteis e controles, utilizando o teste T de Student, demonstrou diferença significativa ($p < 0,05$) entre as populações celulares estudadas.

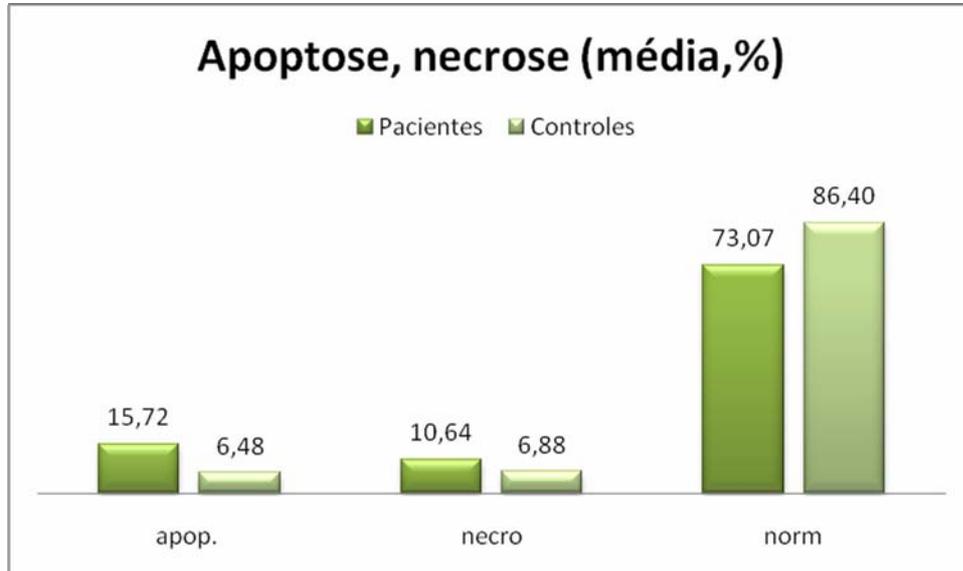


Figura 6: Médias (%) entre pacientes e controles de gametas apoptóticos e necróticos.

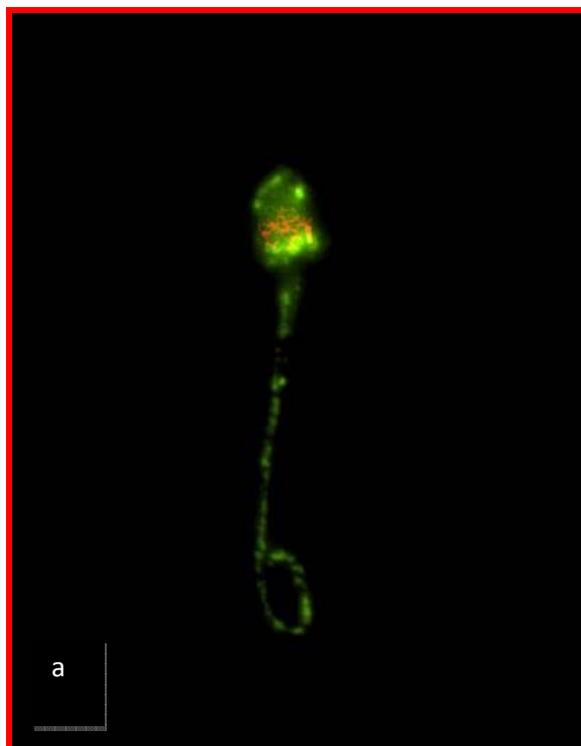


Figura 7: a) espermatozóide apoptótico, observa-se a externalização da fosfatidilserina da membrana celular marcada com FITC, espermatozóides necróticos corados com PI e gametas viáveis sem corar.

IV.5. Microdeleções da região AZF do cromossomo Y

Os 15 indivíduos avaliados do grupo 1 não apresentaram microdeleções da região AZF. Foram adicionados controles positivos e negativos nas reações de PCR, gentilmente cedidos pelo professor João Monteiro de Pina Neto (figura 8).

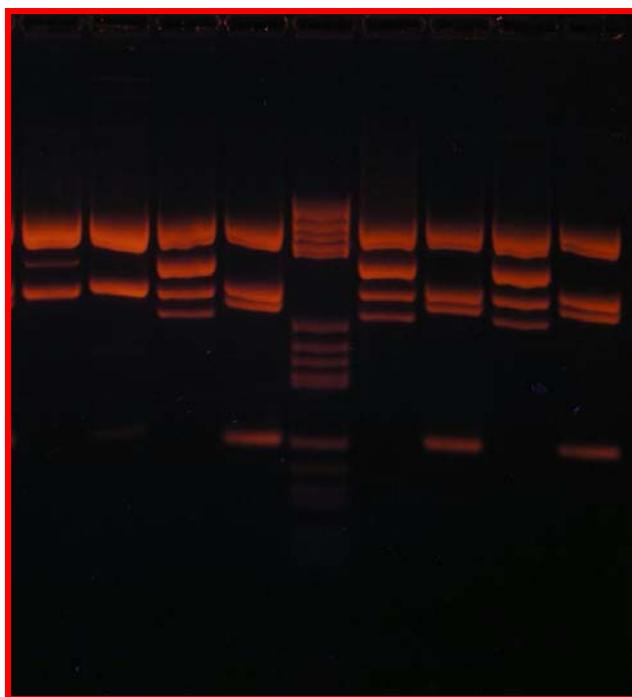


Figura 8: Microdeleções da região AZF nos pacientes inférteis, duas colunas por indivíduo (multiplex A e multiplex B). Coluna 1 e 2 (controle positivo, deleção da região AZFb (sY134); coluna 3 e 4: controle negativo; coluna 5: marcador molecular; coluna 6 e 7: paciente O2 e coluna 8 e 9: paciente O3.

IV.6. Correlação entre dados de segregação meiótica, presença de apoptose e parâmetros do espermograma

Ao correlacionar os resultados de dissomias totais e frequências de apoptose, utilizando a correlação de Pearson, observamos uma correlação de 48,89% entre as duas variáveis. Entretanto, os resultados referentes a diploidia e apoptose não demonstraram correlação.

Ao analisar as variâncias (proc_glm) entre os dados do espermograma especificamente a morfologia e frequência de dissomias totais, inferimos que a morfologia espermática exerceu um efeito significativo na frequência de dissomias ($p < 0,05$).

V. Discussão

O presente estudo descreve a segregação meiótica de diferentes cromossomos em espermatozóides e a presença de gametas apoptóticos de pacientes inférteis, assim como a correlação entre os parâmetros avaliados.

O grupo de homens inférteis apresentou cariótipos caracterizados por cromossomos marcadores e polimorfismos do cromossomo 9 (13,3%) sugerindo que as alterações cromossômicas podem estar relacionadas ao fenótipo de infertilidade. A frequência de cromossomos marcadores na população geral é de 0,3/1000 nascidos vivos (BUCKTON et al., 1985). Estão associados a grande variabilidade fenotípica, sendo que marcadores pequenos já foram descritos e relacionados à infertilidade (LIEHR et al., 2007).

Na década passada, alguns estudos forneceram valiosa informação sobre a constituição genética do espermatozóide em homens normais (TEMPLADO et al., 2005; DOWNIE et al., 1997). Dependendo do método usado para determinar a frequência de aneuploidias, o valor pode variar de 1,9 a 2,9% (PANG et al., 1999). É possível estimar a frequência de aneuploidia determinando este valor como 2X a frequência de dissomia. Desta forma, a frequência não seria superestimada, pois artefatos de técnica, como a ausência de sinais na análise da hibridação *in situ* poderia ser interpretada como gametas nulissômicos (DOWNIE et al., 1997).

Na amostra estudada, a frequência de aneuploidia total no grupo infértil foi de 6,88% para os 6 cromossomos avaliados, 2x 3,44%. Nos resultados da segregação meiótica para os cromossomos 13, 21, 22 o aumento das frequências poderia ser explicado por falhas na correta segregação (por mecanismos de não-disjunção) devido a defeitos de recombinação meiótica. Sabe-se que os cromossomos 13, 21 e 22 apresentam um único ponto de *crossing over* no braço longo, com uma frequência de

100% (Laurie et al., 1985). Se o processo de recombinação não ocorrer corretamente, há interferência na segregação do bivalente, produzindo gametas aneuplóides.

A frequência de dissomias do cromossomo 13 em espermatozóides de homens normais foi descrita como 0,2% (TEMPLADO et al., 2005). Em homens inférteis, esta incidência variou entre 0,17 a 2,76% (MARTIN et al., 2003; PANG et al., 1999; KIRKPATRICK et al., 2008). Em nosso estudo, esta porcentagem foi de 0,53% sendo o aumento moderado, mas estatisticamente significativo.

O cromossomo 21 apresenta-se na literatura como um dos mais avaliados pela técnica de FISH sendo a frequência de dissomia em espermatozóides de homens normais de 0,18%. Em nossos controles foi de 0,53% , pois fatores inter-individuais e intra-individuais, além de fatores ambientais podem influenciar esse resultado (TEMPEST et al., 2009). Na literatura, esta frequência em pacientes inférteis variou entre 0,6 a 3,4% (PANG et al., 1999), sendo que na amostra estudada a frequência foi de 0,77%.

Em relação ao cromossomo 22, a frequência de dissomia no grupo infértil foi de 0,67%, sendo que na literatura variou entre 0,13% a 1,21% (RIVES et al., 1999; MARTIN et al., 1999). Para homens normais, foi de 0,47% (TEMPLADO et al., 2005). As frequências dos cromossomos acrocêntricos estudados permaneceram no intervalo de variações publicado na literatura, confirmando o aumento destas em pacientes oligozoospermicos. As frequências de não-disjunção do cromossomo 21 e 22 apresentaram comportamento similar e poderiam ser explicadas pelas características dos cromossomos. O cromossomo 21 tem sido amplamente estudado não sendo assim para o cromossomo 22 e possivelmente os mesmos mecanismos possam estar envolvidos na não-disjunção destes cromossomos.

Na literatura, a frequência de dissomia do cromossomo 3 é de 0,20% em homens normais (DOWNIE et al., 1997). No presente estudo, a frequência de dissomia foi de 0,67% em oligozoospermicos e 0,42% nos controles. As diferenças das frequências não foram estatisticamente significativas, mas observamos uma tendência de aumento nos homens inférteis.

O par sexual deve ser considerado separadamente, pois os cromossomos X e Y apresentam uma maior susceptibilidade de ocorrência de erros meióticos e a maturação espermiática é mais tolerante aos erros na segregação destes cromossomos (KIRKPATRICK et al., 2008). O pareamento meiótico está restrito às regiões pseudo-autossômicas, no entanto nos cromossomos autossômicos, o complexo sinaptonêmico acompanha os homólogos ao longo de toda sua extensão. Ferguson et al., (2007) analisaram a recombinação meiótica e aneuploidia em homens oligozoospermicos e descreveram defeitos na recombinação dos cromossomos sexuais. Este mecanismo não seria um fator importante para o possível aumento da frequência, sendo que a frequência de dissomia XY em homens normais varia entre 0,05 e 0,44% (KIRKPATRICK et al., 2008). Em nosso trabalho, a frequência nos controles foi de 0,30% e nos homens inférteis foi de 0,68%. Várias publicações descreveram frequências de dissomias XY entre 0,03-18,63% (KIRKPATRICK et al., 2008; PANG et al., 1999; MARTIN et al., 2003). Valores extremos de dissomias devem ser criteriosamente discutidos já que o critério de análise ou artefatos da técnica podem interferir nas observações.

A observação dos cromossomos XY em um único espermatozóide reflete erro meiótico na Meiose I, com a não-disjunção do bivalente sexual. Assim dissomias XX e YY ostentam não-disjunção de cromátides irmãs, erro de meiose II. A não-disjunção do par XY e a separação prematura de cromátides irmãs foram recentemente descritas na

literatura em gametas masculinos (UROZ et al.,2008). Erros de meiose I apareceram na amostra estudada corroborando dados da literatura (KIRKPATRICK et al., 2008; PANG et al., 1999; MARTIN et al., 2003). Em nosso estudo, as freqüências de dissomias XX e YY não apresentaram diferenças significativas entre controles e pacientes inférteis.

Os cariótipos dos pacientes O6 e O19 apresentaram heteromorfismo do cromossomo 9, sendo sugerido que a maior quantidade da heterocromatina aumenta a probabilidade de que o cromossomo seja deslocado da placa metafásica (FORD e LESTER, 1982). Porém quando se comparam as freqüências, não encontramos diferenças significativas, sugerindo que a presença da heterocromatina não predispõe estes cromossomos a não-disjunção durante a espermatogênese, embora ainda não existam trabalhos com dados consistentes sobre as variantes polimórficas dos cromossomos 1, 9, 16 e Y. No paciente O23 foi realizada hibridação com sonda WCP X *SpectrumOrange* (cat. N° 33-122023-5, Vysis) para descartar Síndrome de Klinefelter. O marcador apresentava tamanho de um cromossomo do grupo C, porém devido a sua baixa freqüência (mosaicismo 7%), não foi possível determinar sua origem pela técnica de FISH.

Sanchez-Castro (2009) sugere um valor limiar de dissomias e diploidia para 5 cromossomos (X, Y, 13, 18 e 21) de 3% em paciente oligozoospermicos. Anormalidades cromossômicas dos gametas podem apresentar conseqüências clínicas definidas na progênie (principalmente trissomias). O risco de produzir anormalidades cromossômicas numéricas na descendência está aumentado nestes pacientes e o aconselhamento genético é indicado, já que o estudo da segregação meiótica ofereceu informação detalhada sobre a composição genética dos gametas.

Vários autores observaram que o espermatozóide diferenciado apresentava sinais peculiares de dano celular, relatando a apoptose (GORCZYCA et al., 1993; SUN et al., 1997; SHEN et al., 2002), embora os gametas masculinos não apresentem atividade transcricional e contenham pequena quantidade de citoplasma (WEIL et al., 1998). Ainda não está claro como os marcadores apoptóticos detectados no espermatozóide são resíduos de um processo apoptótico abortivo antes da ejaculação (SAKKAS et al., 1999) ou se resultam de apoptose iniciada após a ejaculação. Na nossa amostra, observamos células apoptóticas nas amostras de controles e pacientes, sendo que foram detectadas diferenças nas frequências dos dois grupos. A frequência de células necróticas foi similar nos dois grupos. Existem diferenças se compararmos a porcentagem de gametas não vitais do espermograma e a porcentagem de células necróticas, sendo que a técnica empregada para determinar a vitalidade no espermograma cora células que apresentam a membrana celular não íntegra. No entanto, para que o PI core o DNA, deve ocorrer tanto a ruptura da membrana celular como da nuclear.

As diferenças nas frequências de células apoptóticas entre grupo controle e pacientes podem ser explicadas por apoptose abortiva. Deste modo, espermatozoides apoptóticos abortariam o processo de morte celular, embora sejam anormais morfológicamente por apresentarem alterações bioquímicas (HUSZAR et al., 1997) ou dano de DNA (SAKKAS et al., 1999).

A correlação estatística entre dados de apoptose e frequência de dissomias totais infere que a presença de apoptose em células aneuplóides indica que foram selecionadas e não completaram o processo de morte celular. A formação e maturação

de gametas permitiriam a passagem de células apoptóticas e provavelmente aneuplóides excluindo os controles da regulação da espermatogênese.

Oosterhuis et al. (2000) supuseram que a baixa concentração poderia causar alta porcentagem de apoptose. Shen e col.(1997) utilizando a técnica de TUNEL para determinar fragmentação de DNA observaram correlação negativa entre apoptose e concentração espermática. Em contraste, Shen et al. (2002) reportaram uma correlação positiva entre concentração utilizando anexina V e técnica de TUNEL.

Os gametas masculinos apresentando não-disjunção e possivelmente apoptóticos permaneceriam no ejaculado por falha de *checkpoint* meióticos ou a regulação provavelmente estaria relaxada pela baixa concentração de espermatozóides.

Foram analisadas as variâncias entre morfologia espermática e as dissomias totais e os resultados indicam que a morfologia é um efeito significativo na frequência de dissomias. Para interpretar este resultado deve-se avaliar o teste abordado. Deste modo, existe uma relação entre as variáveis, mas não existe uma correlação entre as mesmas. Embora as variáveis estejam relacionadas, também os erros meióticos e um processo anômalo em geral interferem na espermatogênese.

VI. Conclusões

- O uso da técnica de FISH possibilitou avaliar a segregação meiótica de espermatozoides de pacientes inférteis apresentando oligozoospermia.
- A frequência de aneuploidia total nas células germinativas do grupo infértil foi de 6,88% e de 3,98% nos controles.
- Observamos diferenças significativas nas frequências de dissomias dos cromossomos autossômicos 13, 21, 22 entre homens inférteis e controles.
- Detectamos diferenças significativas nas frequências de dissomia do par sexual entre o grupo infértil e o grupo controle.
- As frequências de espermatozoides apoptóticos, necróticos e viáveis no grupo infértil (15,72%; 10,68% e 73,07%) e no grupo controle (6,48%; 6,88% e 86,40%) demonstraram aumento significativo de células germinativas apoptóticas em homens inférteis.
- A correlação positiva entre a presença de apoptose e a frequência de dissomias totais sugere relação entre o processo biológico de morte celular programada e a não-disjunção meiótica nas células germinativas.
- A análise de variância considerando as variáveis dissomias totais e morfologia espermática indicou o efeito da morfologia sobre as frequências de dissomias.

VII. Referências Bibliográficas

ANGELL, R. R. Predivision in human oocytes at meiosis I: a mechanism for trisomy formation in man. **Hum Genet**, v. 86, n. 4, p. 383–87, 1991.

ARÁN, B.; BLANCO, J.; VIDAL, F.; VENDRELL, J. M.; EGOZCUE, S.; BARRI, P. N.; EGOZCUE, J.; VEIGA, A. Screening for abnormalities of chromosomes X, Y, and 18 and for diploidy in spermatozoa from infertile men participating in an in vitro fertilization-intracytoplasmic sperm injection program. **Fertil Steril**, v. 72, n. 4, p. 696–701, 1999.

AZIZ, N.; SAID, T.; PAASCH, U.; AGARWAL, A. The relationship between human sperm apoptosis, morphology and the sperm deformity index. **Hum Reprod**, v. 22, n. 5, p. 1413-9, 2007.

BAARENDS, W. M.; VAN DER LAAN, R.; GROOTEGOED, J. A. DNA repair mechanisms and gametogenesis. **Reproduction**, v. 121, p. 31–39, 2001.

BERNARDINI, L.; BORINI, A.; PRETI, S.; CONTE, N.; FLAMIGNI, C.; CAPITANIO, G. L.; VENTURINI, P. L. Study of aneuploidy in normal and abnormal germ cells from semen of fertile and infertile men. **Hum Reprod**, v. 13, n. 12, p. 3406–13, 1998.

BLANCO, P.; SHLUMUKOVA, M.; SARGENT, C. A.; JOBLING, M. A.; AFFARA, N.; HURLES, M. E. Divergent outcomes of intrachromosomal recombination on the human Y chromosome: male infertility and recurrent polymorphism. **J Med Genet**, v. 37, n. 10, p. 752–58, 2000.

BONDUELLE, M.; JORIS, H.; HOFMANS, K.; LIEBAERS, I.; VAN STEIRTEGHEM, A. Mental development of 201 ICSI children at 2 years of age. **Lancet**, v. 351, n. 9115, p. 1553, 1998.

BONDUELLE, M.; VAN ASSCHE, E.; JORIS, H.; KEYMOLEN, K.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM, A.; LIEBAERS, I. Prenatal testing in ICSI pregnancies: incidence of chromosomal anomalies in 1586 karyotypes and relation to sperm parameters. **Hum Reprod**, v. 17, n.10, p. 2600–14, 2002.

BUKTON, K E; SPOWART, G; NEWTON, M S. Forty four probands with an additional “marker” chromosome. *Hum Genet* v. 69, n.4, p. 353-370, 1985.

BURRELLO, N.; VICARI, E.; SHIN, P.; AGARWAL, A.; DE PALMA, A.; GRAZIOSO, C.; D’AGATA, R.; CALOGERO, A. E. Lower sperm aneuploidy frequency is associated with high pregnancy rates in ICSI programmes. **Hum Reprod**, v. 18, n. 7, p. 1371–76. 2003

CALOGERO, A. E.; DE PALMA, A.; GRAZIOSO, C.; BARONE, N.; BURRELLO, N.; PALERMO, I.; GULISANO, A.; PAFUMI, C.; D'AGATA, R. High sperm aneuploidy rate in unselected infertile patients and its relationship with intracytoplasmic sperm injection outcome. **Hum Reprod**, v. 16, n. 7, p. 1433-9, 2001.

CIFUENTES, P.; NAVARRO, J.; MIGUEZ, L. Sperm segregation analysis of a complex chromosome rearrangement, 2;22;11, by whole chromosome painting. **Cytogenet Cell Genet**, v. 82, n. 3-4, p. 204-9, 1998.

DAILEY, T.; DALE, B.; COHEN, J.; MUNNE, S. Association between nondisjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes. **Am J Hum Genet**, v. 59, n. 1, p. 176-184, 1996.

DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM, A. A review of ten years experience of ICSI. **Hum Reprod Update**, v. 10, n. 1, p. 19-28, 2004.

DOWNIE, S. E.; FLAHERTY, S. P.; MATTHEWS, C. D. Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization. **Mol Hum Reprod**, v. 3, n. 7, p. 585-98, 1997.

DOWNIE, S E; FLAHERTY, S. P.; SWANN, N J; MATTHEWS C D. Estimation of aneuploidy for chromosomes 3, 7, 16, X and Y in spermatozoa from 10 normospermic men using fluorescence in-situ hybridization. **Molecular Human Reproduction** vol.3 no.9 pp. 815-819, 1997

DURAKBASI-DURSUN, H. G.; ZAMANI, A. G.; KUTLU, R.; GÖRKEMLI, H.; BAHCE, M.; ACAR, A. A new approach to chromosomal abnormalities in sperm from patients with oligoasthenoteratozoospermia: detection of double aneuploidy in addition to single aneuploidy and diploidy by five-color fluorescence in situ hybridization using one probe set. **Fertil Steril**, v. 89, n. 6, p. 1709-17, 2008.

EGOZCUE, S.; BLANCO, J.; VENDRELL, J. M.; GARCIA, F.; VEIGA, A.; ARAN, B.; BARRI, P. N.; VIDAL, F.; EGOZCUE, J. Human male infertility: chromosome anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. **Hum Reprod Update**, v. 6, p. 93-105, 2000.

FERGUSON, K. A.; WONG, E. C.; CHOW, V.; NIGRO, M.; MA, S. Abnormal meiotic recombination in infertile men and its association with sperm aneuploidy. **Hum Mol Genet**, v. 16, n. 23, p. 2870-9, 2007.

FORD, J. H.; LESTER, P. Factors affecting the displacement of human chromosomes from the metaphase plate. **Cytogenet Cell Genet**, v. 33, n. 4, p. 327-32, 1982.

GNOTH, C.; GODEHARDT, E.; FRANK-HERRMANN, P.; FRIOL, K.; TIGGES, J.; FREUNDL G. Definition and prevalence of subfertility and infertility. **Human Reproduction**, v. 20, n. 5, p. 1144-7, 2005.

GORCZYCA, W.; TRAGANOS, F.; JESIONOWSKA, H.; DARZYNKIEWICZ, Z. Presence of strand breaks and increased sensitivity of DNA *in situ* to denaturation in abnormal human sperm cells: analogy to apoptosis of somatic cells. **Experimental Cell Research**, n. 207, n. 1, p. 202–05, 1993a.

HASSOLD, T.; ABRUZZO, M.; ADKINS, K.; GRIFFIN, D.; MERRILL, M.; MILLIE, E.; SAKER, D.; SHEN, J.; ZARAGOZA, M. Human aneuploidy: incidence, origin, and etiology. **Environ Mol Mutagen**, v. 28, n. 3, p. 167-75, 1996.

HAUGLAND, R. Assays for apoptosis. In: Handbook of fluorescent probes and Research Products. Ninth Edition, p 647, 1996.

HEALY, D. L.; TROUSON, A. O.; ANDERSEN, N. A. Female infertility: causes and treatment. **Lancet**, v. 343, p. 373-82, 1994.

HOLMES, J. M.; MARTIN, R. H. Aneuploidy detection in human sperm nuclei using fluorescence in situ hybridization. **Hum Genet**, v. 91, n. 1, p. 20-4. 1993.

HOPPS, C. V.; MIELNIK, A.; GOLDSTEIN, M.; PALERMO, G. D.; ROSENWAKS, Z.; SCHLEGEL, P. N. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. **Human Reproduction**, v. 18, n. 8, p. 1660–5, 2003.

HUSZAR, G.; SBRACIA, M.; VIGUE, L.; MILLER, D. J.; SHUR, B. D. Sperm plasma membrane remodelling during spermiogenetic maturation in men: relationship among plasma membrane beta 1,4-galactosyltransferase, cytoplasmic creatine phosphokinase, and creatine phosphokinase isoform ratios. **Biology of Reproduction**, v. 56, n. 4, p. 1020–4, 1997.

JOSEPH, A. M.; GOSDEN, J. R.; CHANDLEY, A. C. Estimation of aneuploidy levels in human spermatozoa using chromosome specific probes and in situ hybridization. **Hum Genet**, v. 66, n. 2-3, p. 234-8, 1984.

JUDIS, L.; CHAN, E. R.; SCHWARTZ, S.; SEFTEL, A.; HASSOLD, T. Meiosis I arrest and azoospermia in an infertile male explained by failure of formation of a component of the synaptonemal complex. **Fertil Steril**, v. 81, n. 1, p. 205–9, 2004.

KAMIGUCHI, Y.; ROSEBUSCH, B.; STERZIK, K.; MIKAMO, K. Chromosomal analysis of unfertilized human oocytes prepared by a gradual fixation-air drying method. **Hum Genet**, v. 90, n. 5, p. 533-41, 1993.

KAMP, C.; HIRSCHMANN, P.; VOSS, H.; HUELLEN, K.; VOGT, P. H. Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. **Human Molecular Genetics**, v. 9, n. 17, p. 2563-72, 2000.

KIRKPATRICK, G.; FERGUSON, K. A.; GAO, H.; TANG, S.; CHOW, V.; YUEN, B. H.; MA, S. A comparison of sperm aneuploidy rates between infertile men with normal and abnormal karyotypes. **Hum Reprod**, v. 23, n. 7, p. 1679-83, 2008.

KLEIMAN, S. E.; BAR-SHIRA, M. B.; YOGEV, L.; PAZ, G.; YAVETZ, H. The prognostic role of the extent of Y microdeletion on spermatogenesis and maturity of Sertoli cells. **Human Reproduction**, v. 16, n. 3, p. 399-402, 2001.

KRAUSZ, C.; MCELREAVEY, K. Y chromosome and male infertility. **Front Biosci**, v. 4, p. E1-8, 1999.

KRAUSZ, C.; QUINTANA-MURCI, L.; MCELREAVEY, K. Prognostic value of Y deletion analysis: what is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? **Human Reproduction**, v. 15, n. 7, p. 1431-4, 2000.

KRAUSZ, C.; RAJPERT-DE MEYTS, E.; LARSEN-FRYDELUND, L.; QUINTANA-MURCI, L.; MCELREAVEY, K.; SKAKKEBAEK, N. E. Double-blind Y chromosome microdeletion analysis in men with known sperm parameters and reproductive hormone profiles: microdeletions are specific for spermatogenic failure. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 86, n. 6, p. 2638-42, 2001.

KUMAROO, K. K.; JAHNKE, G.; IRVIN, J. L. Changes in basic chromosomal proteins during spermatogenesis in the mature rat. **Arch of Biochem Biophys**, v. 168, n. 2, p. 413-24, 1975.

KURODA-KAWAGUCHI, T.; SKALETSKY, H.; BROWN, L. G.; MINX, P. J.; CORDUM, H. S.; WATERSTON, R. H.; WILSON, R. K.; SILBER, S.; OATES, R.; ROZEN, S.; PAGE, D. C. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. **Nature Genetics**, v. 29, n. 3, p. 279-86, 2001.

LACHAUD, C.; TESARIK, J.; CAÑADAS, M. L.; MENDOZA C. Apoptosis and necrosis in human ejaculated spermatozoa. **Hum Reprod**, v. 19, n. 3, p. 607-10, 2004.

LAURIE, D. A.; HULTÉN, M. A. Further studies on bivalent chiasma frequency in human males with normal karyotypes. **Ann Hum Genet**, v. 49, Pt. 3, p. 189-201, 1985.

LIEHR T, WEISE A. Frequency of small supernumerary marker chromosomes in prenatal, newborn, developmentally retarded and infertility diagnostics. *Int J Mol Med*. 2007 May;19(5):719-31.

LUETJENS, C. M.; GROMOLL, J.; ENGELHARDT, M.; VON ECKARDSTEIN, S.; BERGMANN, M.; NIESCHLAG, E.; SIMONI, M. Manifestation of Y-chromosomal deletions in the human testis: a morphometrical and immunohistochemical evaluation. **Hum Reprod**, v. 17, n. 9, p. 2258–66, 2002.

MARTIN, R. H.; BARCLAY, L. Sperm aneuploidy and diploidy frequencies after treatments of psoriatic arthritis with methotrexate. **Ind J Hum Genet**, v. 2, n. 1, p. 65-67, 1996.

MARTIN, R. H.; RADEMAKER, A. W. Nondisjunction in human sperm: comparison of frequencies in acrocentric chromosomes. **Cytogenet Cell Genet**, v. 86, n. 1, p. 43-5, 1999.

MARTIN, R. H.; RADEMAKER, A. W.; GREENE, C.; KO, E.; HOANG, T.; BARCLAY, L.; CHERNOS, J. A comparison of the frequency of sperm chromosome abnormalities in men with mild, moderate, and severe oligozoospermia. **Biol Reprod**, v. 69, n. 2, p. 535-9, 2003.

MARTIN, R. H. Mechanisms of nondisjunction in human spermatogenesis. **Cytogenet Genome Res**, v. 111, n. 3-4, p. 245-9, 2005.

MATSUURA, S.; ITO, E.; TAUCHI, H.; KOMATSU, K.; IKEUCHI, T.; KAJII, T. Chromosomal instability syndrome of total premature chromatid separation with mosaic variegated aneuploidy is defective in mitotic-spindle checkpoint. **Am J Hum Genet**, v. 67, n. 2, p. 483-86, 2000.

MIYAMOTO, T.; HASUIKE, S.; YOGEV, L.; MADURO, M. R.; ISHIKAWA, M.; WESTPHAL H.; LAMB, D. J. Azoospermia in patients heterozygous for a mutation in SYCP3. **Lancet**, v. 362, n. 9397, p. 1714–9, 2003.

MOREL, F.; ROUX, C.; BRESSON, J. L. FISH analysis of the chromosomal status of spermatozoa from three men with 45,XY,der(13;14)(q10;q10) karyotype. **Mol Hum Reprod**, v. 7, n. 5, p. 483–8, 2001.

MOORHEAD, P. S.; NOWELL, P. C.; MELLMAN, W. J.; BATTIPS, D. M.; HUNGERFORD, D. A. Chromosome of leucocytes cultured from human peripheral blood. **Exp Cell Res**, v. 20, p. 613-6, 1960.

MROZ, K.; HASSOLD, T. J.; HUNT, P. A. Meiotic aneuploidy in the XXY mouse: evidence that a compromised testicular environment increases the incidence of meiotic errors. **Hum Reprod**, v. 14, n. 5, p. 1151-6, 1999.

NANASSY, L.; CARRELL, D. T. Paternal effects on early embryogenesis. **J Exp Clin Assist Reprod**, v. 16, n.5, p. 2, 2008.

RIVES, N.; SAINT CLAIR, A.; MAZURIER, S.; SIBERT, L.; SIMÉON, N.; JOLY, G.; MACÉ, B. Relationship between clinical phenotype, semen parameters and aneuploidy frequency in sperm nuclei of 50 infertile males. **Hum Genet**, v. 105, n. 3, p. 266-72, 1999.

NICOPOULLOS, J. D.; GILLING-SMITH, C.; ALMEIDA, P. A.; HOMA, S.; NICE, L.; TEMPEST, H.; RAMSAY, J. W. The role of sperm aneuploidy as a predictor of the success of intracytoplasmic sperm injection? **Hum Reprod**, v. 23, n. 2, p. 240-50, 2008.

OATES, R. D.; SILBER, S.; BROWN, L. G.; PAGE, D. C. Clinical characterization of 42 oligospermic or azospermic men with microdeletion of the AZFc region of the Y chromosome, and of 18 children conceived via ICSI. **Human Reproduction**, v. 17, n. 11, p. 2813-24, 2002.

OLIVER-BONET, M.; NAVARRO, J.; CARRERA, M.; EGOZCUE, J.; BENET, J. Aneuploid and unbalanced sperm in two translocation carriers: evaluation of the genetic risk. **Mol Hum Reprod**, v. 8, n. 10, p. 958-63, 2002.

OOSTERHUIS, G. J.; MULDER, A. B.; KALSBEK-BATENBURG, E.; LAMBALK, C. B.; SCHOEMAKER, J.; VERMES I. Measuring apoptosis in human spermatozoa: a biological assay for semen quality? **Fertil Steril**, v. 74, n. 2, p. 245-50, 2000.

PALERMO, G.; JORIS, H.; DEVROEY, P.; VAN STEIRTEGHEM, A. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. **Lancet**, v. 340, n. 8810, p. 17-18, 1992.

PANG, M. G.; HOEGERMAN, S. F.; CUTICCHIA, A. J.; MOON, S. Y.; DONCEL, G. F.; ACOSTA, A. A.; KEARNS, W. G. Detection of aneuploidy for chromosomes 4, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 17, 18, 21, X and Y by fluorescence in-situ hybridization in spermatozoa from nine patients with oligoasthenoteratozoospermia undergoing intracytoplasmic sperm injection. **Hum Reprod**, v. 14, n. 5, p. 1266-73, 1999.

PELLESTOR, F.; IMBERT, I.; ANDRÉO, B.; LEFORT, G. Study of the occurrence of interchromosomal effect in spermatozoa of chromosomal rearrangement carriers by fluorescence in-situ hybridization primed in-situ labelling techniques. **Hum Reprod**, v. 16, n. 6, p. 1155–64, 2001.

REIJO, R.; ALAGAPPAN, R. K.; PATRIZIO, P.; PAGE, D. C. Severe oligozoospermia resulting from deletions of azoospermia factor gene on Y chromosome. **Lancet**, v. 347, n. 9011, p. 1290–3, 1996.

REPPING, S.; SKALETSKY, H.; LANGE, J.; SILBER, S.; VAN DER VEEN, F.; OATES, R. D.; PAGE, D. C.; ROZEN, S. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. **Am J Hum Genet**, v. 71, n. 4, p. 906–22, 2002.

REPPING, S.; SKALETSKY, H.; BROWN, L.; VAN DAALLEN, S. K.; KORVER, C. M.; PYNTIKOVA, T.; KURODA-KAWAGUCHI, T.; DE VRIES, J. W.; OATES, R. D.; SILBER, S.; VAN DER VEEN, F.; PAGE, D. C.; ROZEN, S. Polymorphism for a 1.6-Mb deletion of the human Y chromosome persists through balance between recurrent mutation and haploid selection. **Nature Genetics**, v. 35, n. 3, p. 247–51, 2003.

ROBBINS, W. A.; SEGRAVES, R.; PINKEL, D.; WYROBEK, A. J. Detection of aneuploid human sperm by fluorescence in situ hybridization: Evidence for a donor difference in frequency of sperm disomic for chromosomes 1 and Y. **Am J Hum Genet**, v. 52, n. 4, p. 799–807, 1993.

RUBIO, C.; GIL-SALOM, M.; SIMON, C.; VIDAL, F.; RODRIGO, L.; MINGUEZ, Y.; REMOHÍ, J.; PELLICER, A. Incidence of sperm chromosomal abnormalities in a risk population: relationship with sperm quality and ICSI outcome. **Hum Reprod**, v. 16, n. 10, p. 2084–92, 2001.

RUDAK, E.; JACOBS, A.; YANAGIMACHI, R. Direct analysis of the chromosome constitution of human spermatozoa. **Nature**, v. 274, n. 5674, p. 911–3, 1978.

SAKKAS, D.; MARIETHOZ, E.; ST JOHN, J. C. Abnormal sperm parameters in humans are indicative of an abortive apoptotic mechanism linked to the Fas-mediated pathway. **Exp Cell Res**, v. 251, n. 2, p. 350–5, 1999a.

SAKKAS, D.; MARIETHOZ, E.; MANICARDI, G.; BIZZARO, D.; BIANCHI, P. G.; BIANCHI U. Origin of DNA damage in ejaculated human spermatozoa. **Rev Reprod**, v. 4, n. 1, p. 31–7, 1999b.

SÁNCHEZ-CASTRO, M.; JIMÉNEZ-MACEDO, A. R.; SANDALINAS, M.; BLANCO, J. Prognostic value of sperm fluorescence in situ hybridization analysis over PGD. **Hum Reprod**, v. 24, n. 6, p. 1516-21, 2009.

SARRATE, Z.; BLANCO, J.; ANTON, E.; EGOZCUE, S.; EGOZCUE, J.; VIDAL, F. FISH studies of chromosome abnormalities in germ cells and its relevance in reproductive counseling. **Asian J Androl**, v. 7, n. 3, p. 227-36, 2005.

SCIURANO, R. B.; RAHN, M. I.; PIGOZZI, M. I.; OLMEDO, S. B.; SOLARI, A. J. An azoospermic man with a double-strand DNA break-processing deficiency in the spermatocyte nuclei: case report. **Hum Reprod**, v. 21, n. 5, p. 1194–203, 2006.

SHEN, H. M.; CHIA, S. E.; NI, Z. Y.; NEW, A. L.; LEE, B. L.; ONG, C. N. Detection of oxidative DNA damage in human sperm and the association with cigarette smoking. **Reprod Toxicol**, v. 11, n. 5, p. 675-80, 1997.

SHEN, H. M.; DAI, J.; CHIA, S. E.; LIM, A.; ONG, C. N. Detection of apoptotic alterations in sperm in subfertile patients and their correlations with sperm quality. **Hum Reprod**, v. 17, n. 5, p. 1266-73, 2002.

SIMONI, M.; BAKKER, E.; KRAUSZ, C. EAA/EMQN best practice guidelines for molecular diagnosis of y-chromosomal microdeletions. State of the art 2004. **Int J Androl**, v. 27, n. 4, p. 240-9, 2004.

SKALETSKY, H.; KURODA-KAWAGUCHI, T.; MINX, P. J.; CORDUM, H. S.; HILLIER, L.; BROWN, L. G.; et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. **Nature**, v. 423, n. 6942, p. 825–37, 2003.

SUN, J. G.; JURISICOVA, A.; CASPER, R. F. Detection of deoxyribonucleic acid fragmentation in human sperm: correlation with fertilization *in vitro*. **Biol Reprod**, v. 56, n. 3, p. 602–7, 1997.

SUN, C.; SKALETSKY, H.; ROZEN, S.; GROMOLL, J.; NIESCHLAG, E.; OATES, R.; PAGE, D. C. Deletion of azoospermia factor a (AZFa) region of human Y chromosome caused by recombination between HERV15 proviruses. **Hum Mol Genet**, v. 9, n. 15, p. 2291–6, 2000.

TEMPLADO C, BOSCH M, BENET J. Frequency and distribution of chromosome abnormalities in human spermatozoa *Cytogenet Genome Res*;v. 111(3-4),p.199-205, 2005.

TEMPEST, H. G.; HOMA, S. T.; DALAKIOURIDOU, M.; CHRISTOPIKOU, D.; WRIGHT, D.; ZHAI, X. P.; GRIFFIN, D. K. The association between male infertility and sperm disomy: evidence for variation in disomy levels among individuals and a correlation between particular semen parameters and disomy of specific chromosome pairs. **Reprod Biol Endocrinol**, v. 2, p. 82, 2004.

TEMPEST, H G; KO, E; RADEMAKER, A; CHAN, P; ROBAIRE, B; MARTIN, R H. Intra-individual and inter-individual variations in sperm aneuploidy frequencies in normal men. *Fertil and Sterility*, v. 91, n 1, p. 185-192, 2007.

TESARIK, J.; MARTINEZ, F.; RIENZI, L.; IACOBELLI, M.; UBALDI, F.; MENDOZA, C.; GRECO, E. In-vitro effects of FSH and testosterone withdrawal on caspase activation and DNA fragmentation in different cell types of human seminiferous epithelium. **Hum Reprod**, v. 17, n. 7, p. 1811-9, 2002.

UROZ, L.; RAJMIL, O.; TEMPLADO, C. Premature separation of sister chromatids in human male meiosis. **Hum Reprod**, v. 23, n. 4, p. 982-7, 2008.

VAN HUMMELEN, P.; LOWE, X. R.; WYROBEK, A. J. Simultaneous detection of structural and numerical chromosome abnormalities in sperm of healthy men by multicolor fluorescence in situ hybridization. **Hum Genet**, v. 98, n. 5, p. 608-15, 1996.

VAN STEIRTEGHEM A.; BONDUELLE, M.; DEVROEY, P.; LIEBAERS, I. Follow-up of children born after ICSI. **Hum Reprod Update**, v. 8, n. 2, p. 111-6, 2002a.

VAN STEIRTEGHEM, A.; BONDUELLE, M.; LIEBAERS, I.; DEVROEY, P. Children born after assisted reproductive technology. **Am J Perinatol**, v. 19, n. 2, p. 59-65, 2002b.

VEGETTI, W.; VAN ASSCHE, E.; FRIAS, A.; VERHEYEN, G.; BIANCHI, M. M.; BONDUELLE, M.; LIEBAERS, I.; VAN STEIRTEGHEM, A. Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men. **Hum Reprod**, v. 15, n. 2, p. 351-65, 2000.

VERMES I, HAANEN C, STEFFENS-NAKKEN H, REUTELINGSPERGER C. A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V. *J Immunol Methods*. v. 184(1) p.39-51, 1995.

VOGT, P. H.; EDELMANN, A.; KIRSCH, S.; HENEGARIU, O.; HIRSCHMANN, P.; KIESEWETTER, F.; et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. **Hum Mol Genet**, v. 5, n. 7, p. 933-43, 1996.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Laboratory Manual for the Examination of Human Semen and Sperm-Cervical Mucus Interaction**. Cambridge University Press, Cambridge, 1992.

ZENZES, M. T.; CASPER, R. F. Cytogenetics of human oocytes, zygotes and embryos after in vitro fertilization. **Hum Genet**, v. 88, n. 4, p. 367-75, 1992.

VIII. Anexos

Anexo I



HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA
DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

www.hcrp.fmrp.usp.br



Ribeirão Preto, 05 de agosto de 2008

Ofício nº 2834/2008
CEP/MGV

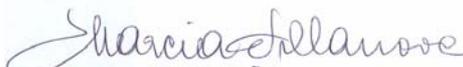
Prezadas Senhoras,

O trabalho intitulado "**FATORES GENÉTICOS NA ESPERMATOGÊNESE DE HOMENS INFÉRTEIS**", foi analisado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, em sua 271ª Reunião Ordinária realizada em 04/08/2008 e enquadrado na categoria: **APROVADO, bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, de acordo com o Processo HCRP nº 5465/2008.

Este Comitê segue integralmente a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (IGH-GCP), bem como a Resolução nº 196/96 CNS/MS.

Lembramos que devem ser apresentados a este CEP, o Relatório Parcial e o Relatório Final da pesquisa.

Atenciosamente.


DRª MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em
Pesquisa do HCRP e da FMRP-USP

Ilustríssimas Senhoras
MARIA SILVINA JUCHNIUK DE VOZZI
PROFª DRª LÚCIA REGINA MARTELLI (Orientadora)
Depto. de Genética

Comitê de Ética em Pesquisa HCRP e FMRP-USP - Campus Universitário
FWA - 0000 2733; IRB - 0000 2186 e Registro SISNEP/CONEP nº 4
Fone (16) 3602-2228 - E-mail : cep@hcrp.fmrp.usp.br
Monte Alegre 14048-900 Ribeirão Preto SP

Anexo II

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos convidando-o a participar de um projeto do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto intitulado "Fatores genéticos na espermatogênese de homens inférteis", que tem como objetivo estudar a qualidade de espermatozóides em homens que apresentem baixo número de espermatozóides, comparando com um grupo controle. Este projeto tem como pesquisador responsável Maria Silvína Juchniuk de Vozzi.

Informamos que:

1. Sua participação é espontânea e opcional;
2. Caso você decida não participar, ou desista participar da pesquisa a qualquer momento, você não perderá nenhum benefício ou tratamento que estiver fazendo neste Hospital;
3. Você estará colaborando para aumentar nosso conhecimento sobre os motivos que podem causar a infertilidade masculina.

Se você concordar em participar, informamos que:

1. Será necessária a coleta de uma amostra de esperma ejaculado. Essa coleta é utilizada de rotina para o tratamento médico. Estamos pedindo sua permissão para utilizar a amostra em nosso estudo;
2. Os resultados de nosso estudo podem não trazer benefício imediato para seu tratamento;
3. A amostra será estudada no Laboratório de Citogenética Molecular Humana do Departamento de Genética da FMRP-USP;
4. Os resultados demoram algumas semanas para ficarem prontos e serão colocados em seu prontuário médico;
5. O material após a utilização será devidamente descartado no lixo hospitalar seguindo as regras já determinadas;
6. A informação das amostras será utilizada exclusivamente para os fins informados, após sua permissão;
7. O desenvolvimento deste projeto não trará custos nem acarretará prejuízos para sua saúde, excluindo, portanto, qualquer tipo de indenização. Sua identidade será mantida em absoluto sigilo.

Eu

Tendo sido esclarecido sobre as condições que constam neste documento, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

1. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida relativa aos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa.
2. A liberdade de retirar meu consentimento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuidade do atendimento.
3. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação.

Declaro, que concordo com as condições que foram apresentadas e aceito participar de referido projeto.

Ribeirão Preto,de de 20....

.....

Assinatura do paciente

.....

Maria S. Juchniuk de Vozzi

Pesquisador responsável

.....

Prof. Dra. Lucia R. Martelli

Orientadora do projeto

Anexo III

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DO CONTROLE

Estamos convidando-o a participar de um projeto do Departamento de Genética da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto intitulado "**Fatores genéticos na espermatogênese de homens inférteis**", que tem como objetivo estudar a qualidade de espermatozoides em homens que apresentem baixo número de espermatozoides, comparando com um grupo controle. Este projeto tem como pesquisador responsável Maria Silvína Juchniuk de Vozzi.

Informamos que:

4. Sua participação é espontânea e opcional;
5. Você estará colaborando para aumentar nosso conhecimento sobre os motivos que podem causar a infertilidade masculina.

Se você concordar em participar, informamos que:

8. Será necessária a coleta de uma amostra de esperma ejaculado. Essa coleta é utilizada de rotina para o tratamento médico. Estamos pedindo sua permissão para utilizar a amostra em nosso estudo;
9. Os resultados de nosso estudo podem não trazer benefício imediato para seu tratamento;
10. A amostra será estudada no Laboratório de Citogenética Molecular Humana do Departamento de Genética da FMRP-USP;
11. Os resultados demoram algumas semanas para ficarem prontos e serão colocados em seu prontuário médico;
12. O material após a utilização será devidamente descartado no lixo hospitalar seguindo as regras já determinadas;
13. A informação das amostras será utilizada exclusivamente para os fins informados, após sua permissão;
14. O desenvolvimento deste projeto não trará custos nem acarretará prejuízos para sua saúde, excluindo, portanto, qualquer tipo de indenização. Sua identidade será mantida em absoluto sigilo.

Eu

Tendo sido esclarecido sobre as condições que constam neste documento, declaro que tenho pleno conhecimento dos direitos e das condições que me foram assegurados, a seguir relacionados:

4. A garantia de receber a resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento de qualquer dúvida relativa aos procedimentos, riscos, benefícios e de outras situações relacionadas com a pesquisa.
5. A liberdade de retirar meu consentimento e deixar de participar do estudo, sem que isso traga prejuízo à continuidade do atendimento.
6. A segurança de que não serei identificado e que será mantido o caráter confidencial da informação.

Declaro, que concordo com as condições que foram apresentadas e aceito participar de referido projeto.

Ribeirão Preto,de de 20....

.....

Assinatura do paciente

.....

Maria S. Juchniuk de Vozzi

Pesquisador responsável

.....

Prof. Dra. Lucia R. Martelli

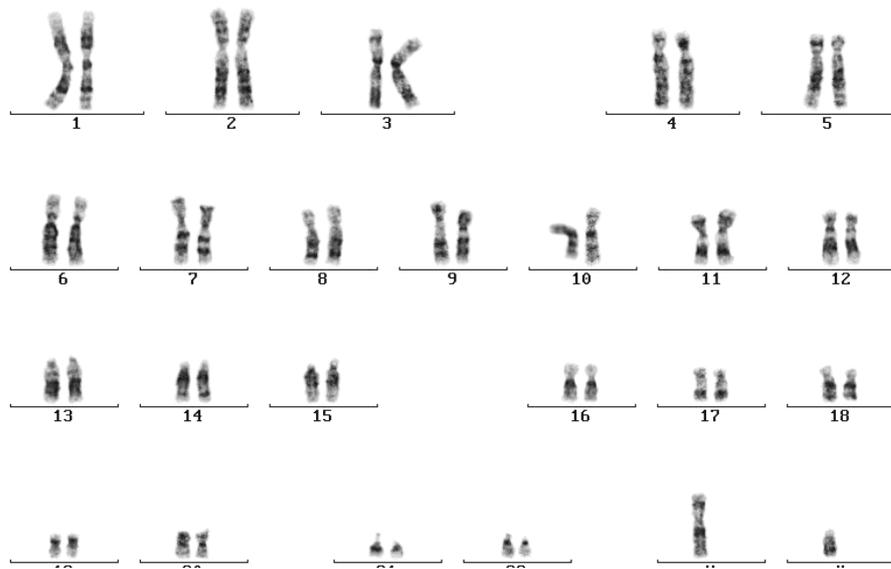
Orientadora do projeto

Anexo IV

Paciente O6

Cariótipo com bandeamento GTG e técnica com DAPI para evidenciar heterocromatina

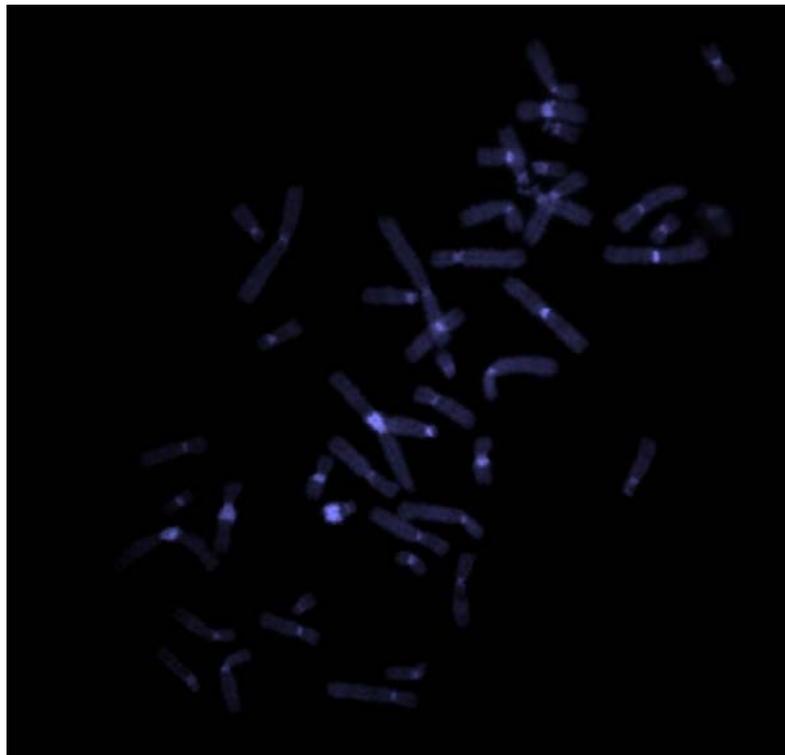
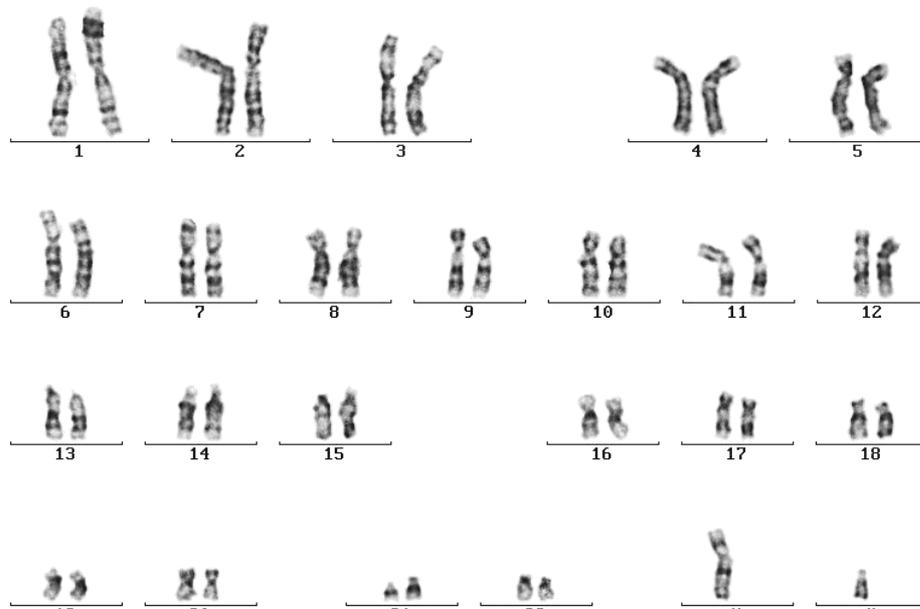
46,XY,9qh+



Paciente O19

Cariótipo com bandeamento GTG e técnica com DAPI para evidenciar heterocromatina

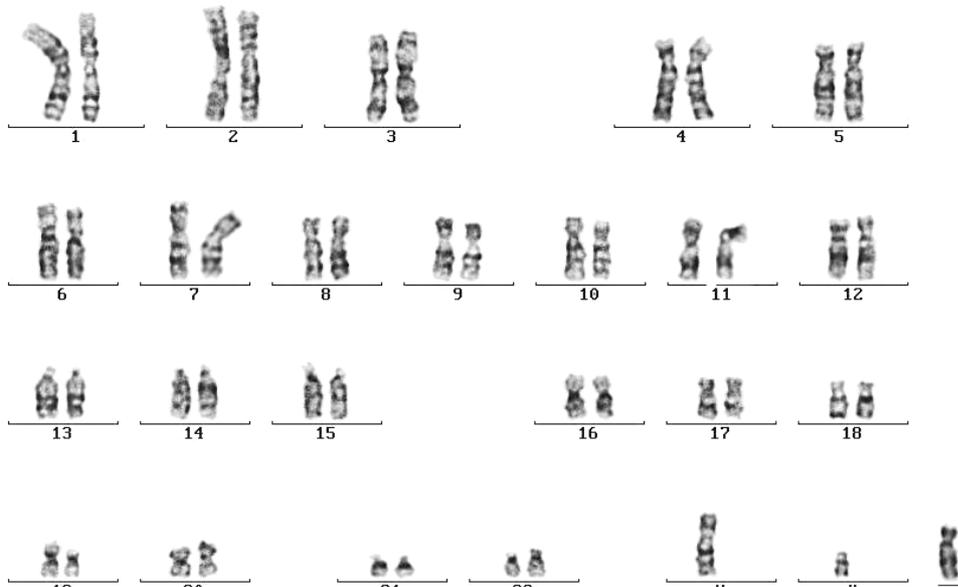
46,XY,9qh+



Paciente O23

Cariótipo com bandeamento GTG e FISH com sonda WCP para o cromossomo X.

46,XY[93]/47,XY,+mar[7]



IX. Artigo publicado

Case report

Open Access

Meiotic segregation and interchromosomal effect in the sperm of a double translocation carrier: a case report

Maria S Juchniuk de Vozzi¹, Silvio A Santos¹, Ciro S Pereira¹,
Juliana F Cuzzi^{1,2}, Lucimar AF Laureano¹, José G Franco Jr³ and
Lucia Martelli*¹

Address: ¹Department of Genetics, School of Medicine of Ribeirão Preto, University of São Paulo, Ribeirão Preto, SP, Brazil, ²Genesis Genetics Brasil, Rua Mato Grosso, 306 cjt 506, 01239-040, São Paulo, SP, Brazil and ³Center for Human Reproduction Prof Franco Junior, Av Prof João Fiusa, 689, 14025-310, Ribeirão Preto, SP, Brazil

Email: Maria S Juchniuk de Vozzi - juchniuk@rge.fmrp.usp.br; Silvio A Santos - sasantos@rge.fmrp.usp.br; Ciro S Pereira - cirosilveira@usp.br; Juliana F Cuzzi - jfcuzzi@yahoo.com; Lucimar AF Laureano - laflaureano@hotmail.com; José G Franco Jr - franco@crh.com.br; Lucia Martelli* - lrmartel@fmrp.usp.br

* Corresponding author

Published: 1 December 2009

Received: 13 July 2009

Molecular Cytogenetics 2009, **2**:24 doi:10.1186/1755-8166-2-24

Accepted: 1 December 2009

This article is available from: <http://www.molecularcytogenetics.org/content/2/1/24>

© 2009 Juchniuk de Vozzi et al; licensee BioMed Central Ltd.

This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/2.0>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Abstract

Background: Infertility is a natural mechanism of selection intended to prevent the delivery of a child with malformations or mental retardation. Male infertility is closely related to chromosomal abnormalities. This study was focused on the analysis of meiotic segregation involving a Robertsonian translocation, 45,XY,der(13;13) [56]/45,XY,der(13;14) [44] and the evaluation of possible interchromosomal effects.

Results: Hybridisation with LSI 13q14 and subtelomere 14q probes and WCP13 SpectrumGreen and WCP14 SpectrumOrange probes showed a high proportion of unbalanced gametes, corresponding to 71.2% of the spermatozoa. The disomic frequencies of the sexual chromosomes and chromosome 18 of the patient were higher (5.28% and 2.55%, respectively) than those of the control (0.6% and 0.59%, respectively).

Conclusion: Meiotic segregation studies in sperm are an important tool for genetic counselling of chromosomal aberrations, allowing for a prediction of the risks and consequent implications for the reproductive life. The patient with this rare translocation exhibited meiotic segregation fidelity, and a high rate of unbalanced gametes with disomic spermatozoa.

Background

Infertility is a natural selective mechanism that affects one in six couples [1] that is intended to prevent the delivery of a child with congenital anomalies or mental retardation. Pregnancy can be difficult to achieve when previous attempts have been associated with recurrent abortions or implantation failures. Several studies investigating the dif-

ferent causes of infertility have included cytogenetic investigations to better understand the meiotic process [2-5]. Meiosis is a complex process and is monitored by different checkpoints, which are essential for proper cell division. Male and female gametes present different secondary responses to meiotic alterations. When an alteration occurs during spermatogenesis, meiosis halts, and

apoptosis begins. On the other hand, if a problem occurs during oogenesis, meiosis continues to completion, thus generating aneuploid gametes. This fact could explain why the same chromosomal rearrangement causes male but not female infertility [6]. However, aneuploid gametes could still be generated during spermatogenesis if the meiotic checkpoints fail [7,8].

Male infertility is closely related to somatic chromosomal abnormalities. Many studies have demonstrated that chromosomal aberrations that cause meiotic interruption can lead to oligozoospermia or azoospermia, which produce abnormal gametes and lead to infertility [9].

The genetic causes of male infertility include chromosomal (aneusomies, translocations, Y microdeletions, inversions), genetic, mitochondrial and genomic imprinting factors. The most common abnormalities are gonosomal aneuploidies and Robertsonian translocations [10]. Aneuploidies can be caused by meiotic segregation errors, non-disjunction due to recombination defects, paternal age effects and kinetochore and microtubule alterations. In contrast, structural abnormalities require DNA breakage as a prerequisite for the formation of rearrangements in other chromosomes. During meiotic recombination, DNA breakage can increase the susceptibility for the loss or gain of genetic material in a chromosomal region [11]. Patients with Robertsonian translocations can produce 3.4-40% abnormal spermatozoa [12-16], while patients with reciprocal translocations have 47.5 - 81% abnormal germ cells [17-20].

Distinct combinations of Robertsonian translocations have been described for the five acrocentric chromosomes, with the 13;14 and 14;21 translocations being the most frequent. Although the Robertsonian translocation carrier is phenotypically normal, the abnormality contributes to genetic imbalances in the sibship, causing fetal losses, mental retardation, multiple congenital anomalies, uniparental disomy and infertility [21].

The first studies of meiotic segregation used heterologous *in vitro* fecundation [22,23]; later studies used fluorescent *in situ* hybridisation (FISH) techniques. The studies on meiotic segregation of chromosomes in the sperm of Robertsonian translocation males find a majority of normal or balanced spermatozoa for the chromosomes related to the translocation (mean 85.42%; range 60-96.60%) [24].

The influence of translocated chromosomes on the synapses and disjunction of other chromosomes is called an interchromosomal effect (ICE) [25]. ICE has been described in several chromosomal rearrangements. Chromosomal analysis of sperm in infertile males have shown high variability in chromosomal segregation behaviours

during meiosis [26,27]. This variability could be associated with the multifactorial aetiology of male infertility, but in some cases, the combination of low sperm quality, chromosomal rearrangement and aneuploidies could affect meiotic synapses. It has been suggested that both the fluctuation in disomy and degree of semen parameter abnormalities are influenced by the chromosomes involved in the rearrangement. Different reports demonstrated an increased frequency of X and Y aneuploidies in patients with structural rearrangements involving autosomes [28,29,16,24]. Roux *et al.* (2005) [24] suggested that ICE could be detected in the sperm of Robertsonian translocation carriers, but this result could not be generalised.

This study analysed the meiotic segregation in a double Robertsonian translocation carrier with karyotype 45,XY,der(13;13)/45,XY,der(13;14) and the possible interchromosomal effects in the sperm.

Results

A total of 1831 patient spermatozoa were included in the meiotic segregation analysis of the chromosomes involved in the translocation. A FISH analysis using WCP probes for the chromosomes 13 (red) and 14 (green) was performed in 820 gametes (figure 1). The 13 LSI probe (green) and subtelomere 14 (red) analysis were performed in 1101 sperm (figure 2). The results are summarised in Tables 1 and 2. The hybridisation efficiency was 95% for LSI probes and 85% for WCP probes.

We also investigated the interchromosomal effects through a segregation analysis of chromosomes X, Y and 18. We detected 49.32% of sperm with one red signal, corresponding to the X chromosome, and 45.28% of sperm with one signal from the Y chromosome. Two signals (one red and one green) were observed in 0.78% of the gametes. We also observed two red signals (XX) in 0.28%, two green signals (YY) in 0.21% and disomy for chromosome 18 in 2.42% of the gametes.

The control analysis detected 49.1% of the gametes with one red signal (X), 49.3% with one green signal (Y), 0.25% with (XY), 0.16% with (XX) and 0.11% with (YY) disomic signals. The frequency of chromosome 18 disomy was 0.58% and diploidy was detected in 0.57% of cells.

Discussion

Meiotic segregation analysis can predict gamete behaviour in patients with chromosomal abnormalities and can be useful for genetic counselling purposes. This study provides accurate information for the understanding of meiotic segregation in male gametes in this particular Robertsonian translocation carrier.



Figure 1
A nucleus with the 13;14 translocation and normal sperm with one red signal (WCP 13) and one green signal (WCP 14).

In the literature, a rare type of mosaicism has been described. Jumping translocations are events in which the same chromosomal segment is translocated to different chromosome sites in different cell lines [30]. Jumping translocations have mainly been described in haematological malignancies, but there also have been rare observations of a constitutional condition. This could explain the origin of the patient mosaicism, considering that the parental karyotypes were normal. Iwarsson *et al.*, 2009 described a phenotypically normal male who presented a 45,XY,rob(13;13)(q10;q10)/45,XY,dic(13;15) (p11.2;p12) karyotype and oligoasthenoteratozoospermia,

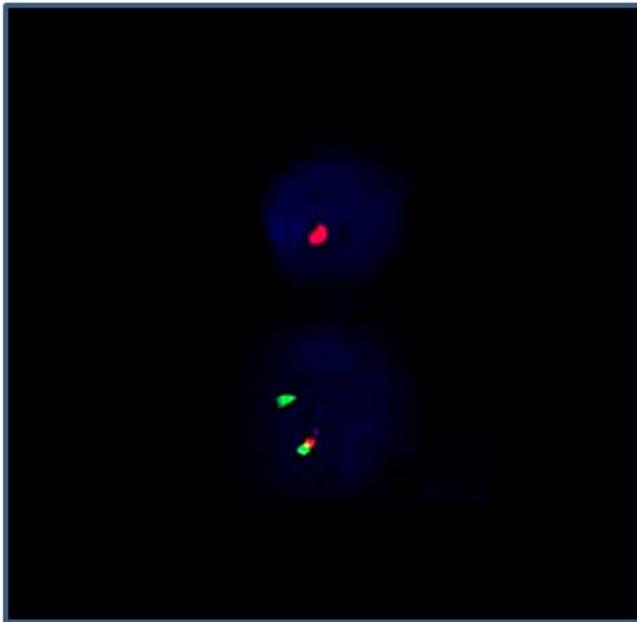


Figure 2
FISH in spermatozoa using LSI 13 (green) and subtelomere 14 (red) probes. One red signal and 13 nullisomic; one red signal and disomic 13 nucleus.

which is closely related to infertility. Another hypothesis for explaining this karyotype is chimerism, but further genetic informations would be necessary.

We compared the segregation modes of the patient sperm with the segregation described in non-mosaic Robertsonian translocations because there have been no reports in the literature concerning this particular type of meiotic segregation. Only one similar patient was published by Iwarsson *et al.* [31]. Most of the meiotic segregation studies in sperm with Robertsonian translocations have concluded that the alternate mode of segregation is more frequent [29,24,4], indicating similar meiotic behaviour in different patients [13]. In our study, the balanced and normal gamete rates of alternate segregation were higher, in agreement with the literature [29,24,4] for the t(13;14) cellular line. The chromosome complement t(13;13) (Figure 3) increased the rate of unbalanced gametes and increased the risk of trisomy 13 in the descendant because it does not produce balanced gametes. Meiotic interruption, which leads to 3:0 chromosomal segregation, could explain the observed rates in the sperm of the Robertsonian translocation carrier. Another explanation could be meiotic checkpoint intervention. Any factor able to modify anaphase (such as chromosomal rearrangement or the loss of microtubule tension) could interrupt the cell cycle [32].

In the meiotic segregation of the patient with 13;13 and 13;15 mosaicism, the rate of abnormal spermatozoa was 45.2%, which is lower than our study (72.22%). This could be explained by the genome of the involved chromosomes.

Comparing the meiotic segregation analysis in sperm and the frequency of abnormal embryos, Escudero *et al.* [13] concluded that meiotic segregation analysis are a good predictor for the rate of abnormal embryos. They concluded that there is a reasonable chance of conceiving when abnormal sperm rates are less than 65%. Our results

Table 1: The analysis of meiotic segregation of the patient using WCP probes.

Chromosome constitution	Signals	N	Rate
13/14 or der(13;13)	OG	307	37.43%
der(13;14)	OUG	248	30.21%
13/der(13;14) or der(13;13)	OOG	26	3.17%
14	G	181	22.1%
14/der(13;14)	OGG	36	4.4%
13	O	22	27%
		820	100%

O = orange; G = green; OUG = orange and green joined; OOG = two orange and one green; OGG = two green and one orange; OG = one orange and one green.

Table 2: The analysis of meiotic segregation of the patient using LSI probes.

Chromosome constitution	Signals	N	Rate
13/14 or der(13;14)	GO	291	28.78%
13/der(13;14) or der(13;13)/14	GGO	265	26.21%
14	O	321	31.75%
14/der(13;14)	GOO	48	4.75%
13	G	47	4.65%
Others	GG, OO, GGGO, GOOO	39	3.86%
		1011	100%

G = green; O = orange.

have identified 71.22% abnormal gametes, including the alternate and adjacent modes of segregation. Consequently, our findings suggest a poor prognosis of conception, with an increased risk for fetal loss or trisomies in successful conceptions.

ICE remains controversial in the literature, although some publications have indicated its relevance [16]. Anton *et al.* [29] observed high sex chromosome aneuploidy rates (0.68%) in the sperm of Robertsonian translocation carriers compared with controls (0.37%) and insignificant rates for other chromosomes. In our study, we observed high levels of disomy for the sex chromosomes, in agreement with the literature [33,28]. Our results showed even higher rates than previously reported [24,34]. The checkpoints involved in meiosis could have failed, producing aneuploid gametes. Luciani *et al.* [35] described a non-random association between the trivalent and the sex chromosomes in prophase I in male mice. A similar study in mice with Robertsonian translocations also described an association between the trivalent and the sex chromosomes. Other groups described the association between the trivalent and sex chromosomes as the affinity between the inactive XY body and the asynaptic regions of the multivalent. This region is covered by the variant histone γ -H2AX, which increased this association and led to transcriptional inactivation [36,37]. The interference of the heterosynapses, the mechanism that rescues the gamete when anaphase is interrupted, could explain the increase of XY disomy. The interference of the trivalent in meiosis might affect the segregation of chromosome 18; its disomy frequency was increased when compared with the control ($p < 0.01$). Another study also reported an increased frequency of chromosome 18 disomy [34]. Non-disjunction and the absence of recombination could also explain these rates [38].

When the meiotic segregation of a translocation is studied, the chromosomes involved in the translocation, as well as the genetic condition of each patient, must be considered. Meiosis is a very complex process; any change in the configuration and position of the chromosomes will increase the likelihood of meiotic arrest or errors.

Conclusion

We conclude that the study of meiotic segregation in the sperm of Robertsonian translocation carriers provides information about chromosomal imbalances and the increased risk of producing children with genetic syndromes. In our patient, we demonstrated accurate meiotic segregation, high rates of unbalanced gametes and disomic sexual germ cells in this rare translocation. Genetic counselling is required to explain the poor reproductive

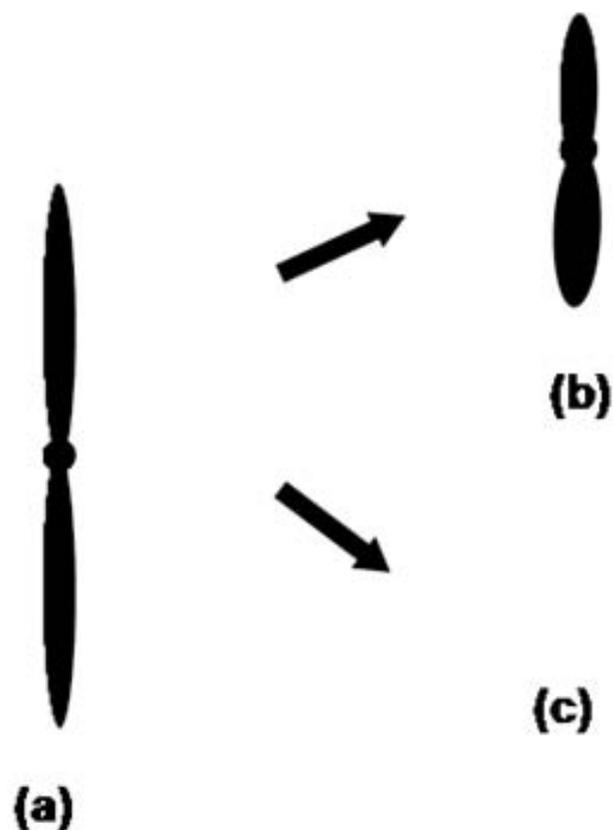


Figure 3
The meiotic segregation of translocation t(13;13). a) A derivative chromosome, b) a disomic gamete and c) a nullisomic gamete.

outcome to the patient. The analysis of the segregation of chromosomes involved in the translocation and ICE can generate a more personalised risk assessment for the reproductive outcome of patients with structural chromosome aberrations that can be useful in genetic counselling.

Methods

Two sperm samples from a patient with the 45,XY,der(13;13)(q10;q10) [56]/45,XY,der(13;14)(q10;q10) [44] karyotype were collected in sterile collectors. The phenotypically normal patient was 30 years old and presented oligozoospermia. At the same time, two sperm samples from a control (30 years old, fertile man without abnormalities, normal male karyotype and normal spermogram) were also collected. The affected patient and the control were informed about the study, and written informed consent, approved by the Ethical committee, was obtained.

The samples were washed in 0.01 M Tris/0.9% NaCl solution. Slides were made with 5 µl of the sample and stored at -20°C.

FISH technique

Two sets of probes, WCP (whole chromosome painting) for chromosome 13 (cat. N° LPP13R, Cytocell, UK) and for chromosome 14 (cat N° LPP14G, Cytocell, UK) and locus specific sequence (LSI) for chromosomes 13, LSI 13 (13q14) SpectrumGreen (cat N° 32-192018, VYSIS Inc., USA) and TelVysion 14q SpectrumOrange (cat. N° 33-260014, VYSIS Inc., USA) were used for the meiotic segregation studies. CEP X (DXZ1), Y (DYZ1) sat III (cat N° 30-161050, VYSIS Inc., USA) and CEP 18 (D18Z1) SpectrumOrange (cat N° 32-130018) and SpectrumGreen (cat N° 32-132018) probes (VYSIS Inc., USA) were used for the ICE analysis.

The samples were decondensed in 10 mM DTT(dithiothreitol)/0.01 M Tris solution and LIS (lithium 3,5-diiodosalicylate) solution at room temperature. They were dehydrated through an ethanol series and air-dried. Then they were immersed in 0.005% pepsin solution (Sigma, USA) for 10 minutes to eliminate the cytoplasm. The probes were prepared according to the manufacturer instructions. The slides were denatured in a water bath at 74°C. The probe mix was then applied to the slides, which were covered with a coverslip, sealed with rubber cement and hybridised overnight in a moist chamber at 37°C. The slides were washed in 50% formamide and 2× SSC solution, and DAPI (4',6-Diamino-2-phenylindole) was used for counterstaining. The results were analysed with an epifluorescence Zeiss microscope coupled with the Metasystem 2.1 software. Only morphologically intact sperm were assessed, according to standard assessment criteria.

Overlapping sperm nuclei, disrupted nuclei or large nuclei with diffuse signals were not considered [39]. In the painting assays, nuclei with two signals of different colours clearly coupled one with the other, were considered as displaying a balanced chromosomal pattern [40].

Data analysis

The statistical analysis was performed using the SAS system (2002-2003, SAS Institute Inc., Cary, NC) [41]. The data related to the analysis of the meiotic segregation of chromosomes X, Y and 18 were analysed by the Chi-Square test (χ^2).

Consent

The affected patient and the control were informed about the study, and written informed consent, approved by the Ethical committee, was obtained.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Authors' contributions

MSJV was responsible for the project, methodology, results and discussion. SAS and LAFL provided cytogenetic support. CSP and JFC provided FISH support and methodology. FJ provided the clinical information and LM was the advisor and coordinator. All of the authors read and approved the final manuscript.

Acknowledgements

We are grateful to the patient for his participation in this study. We would also like to acknowledge Luciana Veiga-Castelli for the text revision. This work was supported by CNPq, the National Research Council, DF, Brazil (scholarships to MSJV and CSP) and FAEPA HCRP-USP (grant funding to LM).

References

- de Kretser DM: **Male infertility.** *Lancet* 1997, **349**:787-790.
- Martin RH: **Cytogenetic analysis of sperm from a male heterozygous for a 13;14 Robertsonian translocation.** *Hum Genet* 1988, **80**:357-361.
- Shi Q, Martin RH: **Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities and in infertile men.** *Reproduction* 2001, **121**:655-66.
- Chen Y, Huang J, Liu P, Qiao J: **Analysis of meiotic segregation patterns and interchromosomal effects in sperm from six males with Robertsonian translocations.** *J Assist Reprod Genet* 2007, **24**(9):406-11.
- Morel F, Douet-Guilbert N, Le Bris MJE, Le Herry A, Amice V, Amice J, DeBraekeleer M: **Meiotic segregation of translocations during male gametogenesis. REVIEW.** *International journal of Andrology* 2004, **27**:200-212.
- Paoloni-Giacobino A, Kern I, Rumpler Y, Djelati R, Morris MA, Dahoun SP: **Familial t(6;21)(p21.1;p13) translocation associated with male-only sterility.** *Clin Genet* 2000, **58**:324-328.
- Hassold T, Hall H, Hunt P: **The origin of human aneuploidy: where we have been, where we are going. Review.** *Hum Mol Genet* 2007, **16**(Spec No. 2):R203-8.
- Hassold T, Hunt P: **To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. Review.** *Nat Rev Genet* 2001, **2**(4):280-91.
- Coco R: **Trastornos genéticos en infertilidad masculina.** *Bol Inf SAA* 2001, **10**(3):64-7.

10. Shi Q, Martin RH: **Aneuploidy in human spermatozoa: FISH analysis in men with constitutional chromosomal abnormalities, and in infertile men.** *Reproduction* 2001, **121**:655-666.
11. Baumgartner A, Van Hummelen P, Lowe XR, Adler ID, Wyrobek AJ: **Numerical and Structural Chromosomal Abnormalities Detected in Human Sperm With a Combination of Multicolor FISH Assays.** *Environmental and Molecular Mutagenesis* 1999, **33**:49-58.
12. Rousseaux S, Chevret E, Monteil M, Cozzi J, Pelletier R, Delafontaine D, Sele B: **Sperm nuclei analysis of a Robertsonian t(14q21q) carrier, by FISH, using three plasmids and two YAC probes.** *Hum Genet* 1995, **96**:655-660.
13. Escudero T, Lee M, Carrel D, Blanco J, Munne S: **Analysis of chromosome abnormalities in sperm and embryos from two 45,XY,t(13;14)(q10;q10) carriers.** *Prenat Diagn* 2000, **20(7)**:599-602.
14. Honda H, Miharu N, Samura O, He H, Ohama K: **Meiotic segregation analysis of a 14;21 Robertsonian translocation carrier by fluorescence in situ hybridization.** *Hum Genet* 2000, **106**:188-193.
15. Frydman N, Romana S, Le Lorc'h M, Vekemans M, Frydman R, Tachdjian G: **Assisting reproduction of infertile men carrying a Robertsonian translocation.** *Hum Reprod* 2001, **16**:2274-2277.
16. Morel F, Roux C, Bresson JL: **FISH analysis of the chromosomal status of spermatozoa from three men with 45,XY,der(13;14)(q10;q10) karyotype.** *Mol Hum Reprod* 2001, **7**:483-488.
17. VanHummelen P, Manchester D, Lowe X, Wyrobek AJ: **Meiotic segregation, recombination, and gamete aneuploidy assessed in a t(1;10)(p22.1;q22.3) reciprocal translocation carrier by three- and fourprobe multicolor FISH in sperm.** *Am J Hum Genet* 1997, **61**:651-659.
18. Blanco J, Egozcue J, Clusellas N, Vidal F: **FISH on sperm heads allows the analysis of chromosome segregation and interchromosomal effects in carriers of structural rearrangements: results in a translocation carrier, t(5;8)(q33;q13).** *Cytogenet Cell Genet* 1998, **83**:275-280.
19. Cifuentes P, Navarro J, Blanco J, Vidal F, Mýnguez L, Egozcue J, Benet J: **Cytogenetic analysis of sperm chromosomes and sperm nuclei in a male heterozygous for a reciprocal translocation t(5;7)(q21;q32) by in situ hybridisation.** *Eur J Hum Genet* 1999, **7**:231-238.
20. Estop AM, Cieply KM, Munne S, Feingold E: **Multicolor fluorescence in situ hybridization analysis of the spermatozoa of a male heterozygous for a reciprocal translocation t(11;22)(q23;q11).** *Human Genetics* 1999, **104**:412-417.
21. Prado-Manuel de Villena F, Sapienza C: **Transmission ratio distortion in offspring of heterozygous female carriers of Robertsonian translocations.** *Hum Genet* 2001, **108**:31-36.
22. Pellestor F, Sele B, Jalbert H: **Chromosome analysis of spermatozoa from a male heterozygous for a 13;14 Robertsonian translocation.** *Hum Genet* 1987, **76**:116-120.
23. Martin RH: **Cytogenetic analysis of sperm from a male heterozygous for a 13;14 Robertsonian translocation.** *Hum Genet* 1988, **80**:357-361.
24. Roux C, Tripogney F, Morel C, Joanne F, Fellmann MC, Bresson JL: **Segregation of chromosome in sperm of Robertsonian translocation carriers.** *Cytogenet Genome Res* 2005, **111**:291-296.
25. Lejeune J: **Autosomal disorders.** *Pediatrics* 1963, **32**:326-337.
26. Miharu N, Best RG, Young SR: **Numerical chromosome abnormalities in spermatozoa of fertile and infertile men detected by fluorescence in situ hybridation.** *Hum Genet* 1994, **93**:502-506.
27. Moosani N, Cox DM, Pattinson HA, Rademaker AW, Carter MD, Martin RH: **Chromosomal analysis of sperm from men with idiopathic infertility using sperm karyotyping and fluorescence in situ hybridization.** *Fertil Steril* 1995, **64**:811-817.
28. Pellestor F, Imbert I, Andréo B, Lefort G: **Study of the occurrence of interchromosomal effect in spermatozoa of chromosomal rearrangement carriers by fluorescence in-situ hybridization primed in-situ labelling techniques.** *Hum Reprod* 2001, **16**:1155-1164.
29. Anton E, Blanco J, Egozcue J, Vidal F: **Sperm FISH studies in seven male carriers of Robertsonian translocation t(13;14)(q10;q10).** *Hum Reprod* 2004, **19**:1345-1351.
30. Lejeune J, Maunoury C, Prieur M, Akker J Van den: **A jumping translocation (5p;15q), (8q;15q), and (12q;15q).** *Ann Genet* 1979, **22**:210-213.
31. Iwarsson E, Sahlén S, Nordgren: **Jumping translocation in a phenotypically normal male: A study of mosaicism in spermatozoa, lymphocytes, and fibroblasts.** *A Am J Med Genet A* 2009, **149A(8)**:1706-11.
32. Eaker S, Pyle A, Cobb J, Handel MA: **Evidence for meiotic spindle checkpoint from analysis of spermatocytes from Robertsonian-chromosome heterozygous mice.** *J Cell Sci* 2001, **114**:2953-2965.
33. Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi MM, Bonduelle M, Liebaers I, Van Steirteghem A: **Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in infertile men.** *Hum Reprod* 2000, **15(2)**:351-65.
34. Machev N, Gosset P, Warter S, Treger M, Schillinger M, Viville S: **Fluorescence in situ hybridization sperm analysis of six translocation carriers provides evidence of an interchromosomal effect.** *Fertil Steril* 2005, **84(2)**:365-73.
35. Luciani JM, Guichaoua MR, Mattei A, Morazzani MR: **Pachytene analysis of a man with a 13q;14q translocation and infertility. Behavior of the trivalent and nonrandom association with the sex vesicle.** *Cytogenet Cell Genet* 1984, **38**:14-22.
36. Grao P, Coll MD, Ponsa M, Egozcue J: **Trivalent behavior during prophase I in male mice heterozygous for three Robertsonian translocations: an electron-microscopic study.** *Cytogenet Cell Genet* 1989, **52**:105-110.
37. Sciarano R, Rahn M, Rey-Valzacchi G, Solari AJ: **The asynaptic chromatin in spermatocytes of translocation carriers contains the histone variant γ -H2AX and associates with the XY body.** *Human Reprod* 2007, **22**:142-150.
38. Martin RH: **Mechanisms of nondisjunction in human spermatogenesis.** *Cytogenet Genome Res* 2005, **111**:245-249.
39. Downie SE, Flaherty SP, Matthews CD: **Detection of chromosomes and estimation of aneuploidy in human spermatozoa using fluorescence in-situ hybridization.** *Mol Hum Reprod* 1997, **3**:585-598.
40. Anahory T, Hamamah S, Andréo B, Hédon B, Claustres M, Sarda P, Pellestor F: **Sperm segregation analysis of a (13;22) Robertsonian-chromosome carrier by FISH: a comparison of locus-specific probe and whole chromosome painting.** *Hum Reprod* 2005, **20(7)**:1850-4.
41. SAS Institute Inc: **SAS/STAM™. SAS user's guide for windows environment. 8.02 ed.** Cary, SAS Institute Inc; 2001.

Publish with **BioMed Central** and every scientist can read your work free of charge

"BioMed Central will be the most significant development for disseminating the results of biomedical research in our lifetime."

Sir Paul Nurse, Cancer Research UK

Your research papers will be:

- available free of charge to the entire biomedical community
- peer reviewed and published immediately upon acceptance
- cited in PubMed and archived on PubMed Central
- yours — you keep the copyright

Submit your manuscript here:
http://www.biomedcentral.com/info/publishing_adv.asp



Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)