

Incidência de microdeleções do cromossomo Y em filhos de pais que passaram por reversão de vasectomia ou fertilização *in vitro* com aspiração do epidídimo: um estudo caso-controle

Incidence of Y-chromosome microdeletions in children whose fathers underwent vasectomy reversal or *in vitro* fertilization with epididymal sperm aspiration: a case-control study

Milton Ghirelli-Filho¹, Patricia Leme de Marchi¹, Fernanda Abani Mafra¹, Viviane Cavalcanti¹, Denise Maria Christofolini¹, Caio Parente Barbosa¹, Bianca Bianco¹, Sidney Glina²

RESUMO

Objetivo: Avaliar a incidência de microdeleções do cromossomo Y em indivíduos nascidos de pais vasectomizados submetidos à reversão de vasectomia ou fertilização *in vitro* com recuperação de espermatozoides por aspiração do epidídimo (aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo). **Métodos:** Estudo caso-controle que compreende crianças do sexo masculino de casais em que o homem havia sido previamente vasectomizado e escolheu reversão da vasectomia (n=31) ou fertilização *in vitro* com recuperação espermática por aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo (n=30) para obtenção de novos filhos, e um Grupo Controle de crianças do sexo masculino de homens férteis com vasectomia programada (n=60). A pesquisa de microdeleções do cromossomo Y foi realizada por reação em cadeia da polimerase nos pais e filhos, avaliando 20 regiões do cromossomo. **Resultados:** O resultado não revelou microdeleções do cromossomo Y em qualquer indivíduo estudado. A incidência de microdeleções do cromossomo Y em indivíduos nascidos de pais vasectomizados que sofreram reversão de vasectomia ou fertilização *in vitro* com espermatozoides recuperados pela aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo não diferiu entre os grupos, e não houve nenhuma diferença entre indivíduos controle nascidos de gestações naturais ou incidência populacional em homens férteis. **Conclusão:** Não foi encontrada nenhuma associação considerando microdeleções da região do fator de azoospermia no cromossomo Y e reprodução assistida. Não houve correlação entre microdeleções do cromossomo Y e vasectomia, o

que sugere que as técnicas de reprodução assistida não aumentam a incidência de microdeleções do cromossomo Y.

Descritores: Cromossomos humanos Y; Vasectomia; Fertilização *in vitro*; Técnicas reprodutivas

ABSTRACT

Objective: To evaluate the incidence of Y-chromosome microdeletions in individuals born from vasectomized fathers who underwent vasectomy reversal or *in vitro* fertilization with sperm retrieval by epididymal aspiration (percutaneous epididymal sperm aspiration). **Methods:** A case-control study comprising male children of couples in which the man had been previously vasectomized and chose vasectomy reversal (n=31) or *in vitro* fertilization with sperm retrieval by percutaneous epididymal sperm aspiration (n=30) to conceive new children, and a Control Group of male children of fertile men who had programmed vasectomies (n=60). Y-chromosome microdeletions research was performed by polymerase chain reaction on fathers and children, evaluating 20 regions of the chromosome. **Results:** The results showed no Y-chromosome microdeletions in any of the studied subjects. The incidence of Y-chromosome microdeletions in individuals born from vasectomized fathers who underwent vasectomy reversal or *in vitro* fertilization with spermatozoa recovered by percutaneous epididymal sperm aspiration did not differ between the groups, and there was no difference between control

¹ Faculdade de Medicina do ABC, Santo André, SP, Brasil.

² Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil.

Autor correspondente: Bianca Bianco – Avenida Príncipe de Gales, 821 – Vila Príncipe de Gales – CEP: 09060-650 - Santo André, SP, Brasil – Tel.: (11) 4993-5464 – E-mail: bianca.bianco@fmabc.br

Data de submissão: 6/7/2016 – Data de aceite: 25/10/2016

Conflitos de interesse: não há.

DOI: 10.1590/S1679-45082016AO3805

subjects born from natural pregnancies or population incidence in fertile men. **Conclusion:** We found no association considering microdeletions in the azoospermia factor region of the Y chromosome and assisted reproduction. We also found no correlation between these Y-chromosome microdeletions and vasectomies, which suggests that the assisted reproduction techniques do not increase the incidence of Y-chromosome microdeletions.

Keywords: Chromosomes, human, Y; Vasectomy; Fertilization *in vitro*; Reproductive techniques

INTRODUÇÃO

Técnicas de reprodução assistida (TRA) estão atualmente disponíveis no mundo todo, e são praticadas em larga escala, com sucesso. Aproximadamente 1 a 4% de todos os partos na Europa são resultado de fertilização *in vitro* (FIV), pelos métodos tradicional e de injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI - *intracytoplasmic sperm injection*).⁽¹⁾

Entre os fatores que podem causar infertilidade masculina e levar à indicação de FIV, estão as anomalias genéticas, como as aberrações cromossômicas, encontradas em 5 a 15% de homens inférteis (5 a 7% em homens oligozoospermicos e 10 a 15% em pacientes com azoospermia), e microdeleções do cromossomo Y, uma das causas de testiculopatia grave, presente em 2% dos homens inférteis.⁽²⁾ Outro fator importante que leva à infertilidade masculina e à recomendação de FIV é a azoospermia obstrutiva secundária à vasectomia, que representa um problema específico com relação a defeitos associados à implementação da FIV, já que as consequências da obstrução da espermatogênese ainda não são totalmente conhecidas. A vasectomia é a causa mais comum de azoospermia obstrutiva, e sua prevalência varia entre 7 e 10% em casais, e aumenta com a idade: aproximadamente 18% dos homens recorrem à vasectomia aos 45 anos.⁽³⁾

Entre 2 e 10% dos homens buscam recuperação de fertilidade, e existem dois métodos usados para isso: reversão de vasectomia ou FIV com aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo (PESA - *percutaneous epididymal sperm aspiration*).^(3,4) A reversão da vasectomia está estabelecida como um método muito eficaz para obtenção de fertilidade após o procedimento, e era a única opção de tratamento para pacientes vasectomizados até o desenvolvimento de FIV por ICSI.⁽⁴⁾

Desde então, ambos os métodos estão disponíveis para qualquer indivíduo vasectomizado, o índices de sucesso para os dois métodos dependem de diversas variáveis. Fica a critério do casal e seu médico decidir qual o método mais adequado. Porém, a possibilidade de um

maior número de malformações na prole de pacientes submetidos à FIV ainda é tópico de debates, o que pode influenciar na decisão sobre o método escolhido para a recuperação de fertilidade após a vasectomia.^(3,4)

Embora TRAs tenham permitido que homens inférteis com azoospermia e oligozoospermia concebessem filhos, este grupo tem maiores chances de ter proles com malformações congênitas e/ou desordens genéticas.⁽⁵⁻⁸⁾ Alguns pesquisadores questionaram as implicações genéticas de TRA para a prole,⁽⁹⁻¹²⁾ e sugeriram maior incidência de aberrações sexuais e cromossômicas fetais, anomalias cromossômicas por mutação *de novo*, mutação genética e aneuploidia do espermatozoide.

Considerando-se os fatores genéticos, as microdeleções do cromossomo Y são uma causa identificável de falha na espermatogênese. A grande maioria dessas microdeleções aparecem na mutação *de novo*, indicando que esta região é especialmente instável.^(13,14)

A incidência de microdeleções do cromossomo Y na população infértil mostra-se bastante variável, em diferentes estudos, entre 2,1 e 14% em homens azoospermicos, e entre 1,8 e 8,5% naqueles oligozoospermicos.⁽²⁾ Com relação à população fértil, a incidência de microdeleções do cromossomo Y também é assunto para discussão, já que a classificação de 'fértil' não implica em normozoospermia, o que pode gerar vieses. Enquanto na maioria dos estudos, a incidência de microdeleções na população normal é de 0%, Kent-First et al.,⁽¹⁵⁾ detectaram uma incidência de oito indivíduos com microdeleções do cromossomo Y em uma amostra de 920 homens férteis, o que representa 0,87% dos casos que foram levados em consideração.

Em um estudo de Feng et al.,⁽¹²⁾ microdeleções do cromossomo Y foram observadas em 10,8% dos bebês concebidos por FIV. Nenhum deles nasceu de concepção natural. A diferença é estatisticamente significativa. A amostra do estudo foi composta por 37 casos no grupo com indivíduos nascidos de FIV, e 60 casos no Grupo Controle, no qual as crianças foram concebidas naturalmente.

Neste contexto, a presença de um número maior de microdeleções do cromossomo Y em crianças concebidas por pais vasectomizados, que passaram por FIV com recuperação de espermatozoide por PESA, aumentaria a incidência de infertilidade nesta população.

OBJETIVO

Avaliar a incidência de microdeleções do cromossomo Y em indivíduos concebidos por homens vasectomizados, que passaram por reversão de vasectomia ou fertilização *in vitro* por aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo.

MÉTODOS

Os indivíduos incluídos neste estudo foram divididos em três grupos: Grupo A – filhos de pais vasectomizados, que passaram por reversão de vasectomia, e cujas mães tiveram gravidez natural após o procedimento; Grupo B – filhos de pais vasectomizados, que passaram por FIV com recuperação de esperma por PESA; Grupo C (Grupo Controle) – filhos de homens férteis com vasectomia programada.

Em todos os grupos a pesquisa de microdeleções do cromossomo Y foi feita com pais e filhos. A variável avaliada foi a incidência de microdeleções do cromossomo Y. As variáveis demográficas analisadas foram a idade dos pais no início da gravidez, o período entre vasectomia e procedimento de recuperação de fertilidade, e idade do pai no momento na vasectomia.

Pacientes

Os pacientes incluídos nesta pesquisa foram obtidos do Centro de Estudos em Genética e Reprodução Humana da Faculdade de Medicina do ABC, Santo André.

Este estudo incluiu filhos homens concebidos por casais em que o homem havia sido previamente vasectomizado e optou por reversão de vasectomia, ou FIV com recuperação de esperma por PESA. Também foram selecionados filhos de homens férteis com vasectomia programada para a criação do Grupo Controle. Um espermograma dos homens férteis foi coletado antes da vasectomia.

Amostras de sangue periférico foram coletadas após explicação sobre os objetivos do estudo, informação sobre o termo de consentimento livre e esclarecido e/ou assinatura do termo de consentimento aprovado pelo comitê de ética local.

Foram encontrados 815 candidatos aptos a participarem do estudo para que tivéssemos potenciais participantes para cada um dos três grupos propostos.

Grupo A (reversão de vasectomia)

No Grupo A foram incluídos 278 pacientes que passaram por cirurgia de reversão de vasectomia. Entre os indivíduos que conseguimos contatar, 81 tinham pelo menos um filho biológico. Entre os filhos, 42 eram do sexo masculino. Trinta e um indivíduos compareceram para a coleta de dados.

A média de idade dos 31 homens no momento da reversão da vasectomia era de $40,5 \pm 5,7$ anos, e a média de idade das esposas no momento da reversão da vasectomia era de $29,0 \pm 4,2$ anos.

O tempo médio entre a vasectomia e sua reversão nos 31 indivíduos incluídos no estudo foi de $6,4 \pm 3,2$

anos. O tempo médio para início da gravidez foi de $6,0 \pm 2,6$ meses após reversão da vasectomia. A média de idade dos homens no momento da vasectomia era de $34,1 \pm 5,8$ anos.

Grupo B (FIV com PESA)

No Grupo B foram incluídos 294 pacientes que passaram por FIV com PESA. Entre os indivíduos que conseguimos contatar, 102 tinham pelo menos um filho biológico. Entre os filhos, 61 eram do sexo masculino. Trinta indivíduos compareceram para a coleta de dados.

A média de idade dos 30 homens no momento da FIV com PESA era de $45,3 \pm 5,9$ anos, e a média de idade de suas esposas no mesmo momento era de $32,9 \pm 3,5$ anos.

O período médio entre a vasectomia e a FIV com PESA dos 30 indivíduos foi de $15,3 \pm 5,1$ anos. A média de idade dos homens no momento da vasectomia era de $30,0 \pm 5,2$ anos.

Comparação entre Grupos A e B

Os dados de comparação entre os Grupos A e B estão resumidos na tabela 1.

Tabela 1. Comparação entre os Grupos A e B: média, desvio padrão e valor de p

	Grupo A	Grupo B	Valor de p*
Idade (homens)	40,5±5,72	45,3±5,87	0,002
Idade (mulheres)	29,0±4,17	32,9±3,51	<0,001
Tempo de vasectomia	6,42±3,21	15,3±5,07	<0,001
Idade à época da vasectomia	34,1±5,81	30,0±5,18	0,005

* Valores considerados estatisticamente significativos < 0,05, Teste "t" de Student.

Grupo C (Grupo Controle)

As amostras de sangue foram coletadas de 60 pacientes férteis com vasectomias programadas, que também autorizaram coletas de sangue de seus filhos homens.

A média de idade dos 60 homens era de $38,7 \pm 6,2$ anos. Além das amostras de sangue, foram coletados, antes do procedimento, espermogramas de todos os 60 participantes que tinham vasectomia programada. Os dados dos espermogramas estão resumidos na tabela 2. A morfologia do esperma não foi incluída entre os

Tabela 2. Média dos parâmetros do sêmen dos homens incluídos no estudo

Volume (ml)	Concentração (milhões por ml)	Motilidade		
		Progressivos n (%)	Não progressivos n (%)	Imóveis n (%)
2,83±1,31	72,1±44,5	65,6±15,6	7,94±3,30	27,8±10,03

parâmetros seminais devido à grande variedade de técnicas usadas para avaliação de espermogramas, o que interfere na comparabilidade dos dados.

Entre os 60 pacientes férteis, 5,0% tiveram alguns parâmetros fora da referência de normalidade estabelecida pela Organização Mundial de Saúde (OMS), o que significa concentração de espermatozoides e motilidade anormais. A média de idade no momento da vasectomia dos Grupos A e B foi comparada à média de idade dos homens no Grupo C. Observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre os Grupos, A e B, em comparação ao Grupo C ($p < 0,05$).

Pesquisa de microdeleção do cromossomo Y

As amostras de sangue dos indivíduos selecionados foram coletadas em um tubo com EDTA para extração do DNA e pesquisa de microdeleções do cromossomo Y. O DNA genômico foi extraído dos linfócitos do sangue periférico, de acordo com o protocolo de Lahiri et al.⁽¹⁶⁾

Os *loci* do cromossomo Y envolvidos na espermatogênese (AZFa: sY746, SY84, sY86, DFFRY; AZFb: XKRY, sY118, sY113, sY127, sY134, sY143, RBM1Y e AZFc: sY153, SY148, sY157, sY158, sY254, sY255, sY160 e o gene determinante sexual SRY) foram analisados por reação em cadeia da polimerase (PCR - *polymerase chain reaction*), de acordo com protocolos modificados por Umeno et al.⁽¹⁷⁾ e Mitra et al.⁽¹⁸⁾ O gene AMELX foi usado como controle interno de boa amplificação.

A PCR foi realizada com um volume final de 25 μ L contendo 100ng de DNA genômico, 10mM MgCl₂, 1,0mM dNTPs, 2,0U de Taq DNA polimerase (Invitrogen®), Tris-HCl (pH 8,4) 10mM, KCl mM, 2,0mM de cada primer. A reação foi processada por um termociclador (Corbett Research, QIAGEN, Valencia, Califórnia, EUA), da seguinte forma: desnaturação por 5 minutos, a 95°C, seguida de 32 ciclos de 50 segundos, a 95°C (desnaturação), 45 segundos a 55°C ou 59°C (recozimento de acordo com a padronização de cada primer) e 45 segundos, a 72°C (extensão), com extensão final de 5 minutos, a 72°C. Os produtos da PCR passaram por eletroforese em gel agarose 2,5%, e corados com GelRed (Uniscience) (intercalando DNA).

Diversas precauções foram tomadas para evitar falso-positivos, incluindo o processamento de todas as amostras por uma única operadora e o uso de controles internos para a reação (gene AMELX) como controle positivo. Estações pré e pós PCR foram rigorosamente separadas para evitar transferência de sequências de DNA amplificadas para novas PCRs.

Espermograma

Foram coletados espermogramas de todos os pacientes no Grupo Controle para avaliar a qualidade do espermatozoide, já que até mesmo considerando fertilidade evidenciada por filhos biológicos, não poderíamos descartar mudanças seminais que poderiam estar associadas a microdeleções do cromossomo Y, que acabaram sendo encontradas.

Amostras de sêmen foram coletadas por masturbação, de dois a cinco dias após a última ejaculação. A avaliação da concentração de espermatozoide, motilidade e volume do ejaculado foi feita de acordo com os critérios da OMS.⁽¹⁹⁾

Reversão da vasectomia

A reversão da vasectomia foi feita por vasovasostomia em todos os casos; porém, a técnica cirúrgica e tipo de anestesia variaram de acordo com a preferência do cirurgião.

Aspiração do epidídimo

A recuperação de espermatozoides epididimários para FIV foi feita por aspiração do epidídimo com agulha hipodérmica, com o paciente sob anestesia local de lidocaína. A área perfurada do epidídimo e a técnica utilizada também variaram de acordo com as preferências do cirurgião.

Protocolos de fertilização *in vitro*

A estimulação ovárica de folículos foi feita com gonadotropinas purificadas ou recombinantes, e agonistas ou antagonistas de GnRH foram usados para suprimir a secreção endógena das gonadotropinas. Doses individuais de cada medicamento variaram caso a caso, levando-se em consideração a idade da mulher e os exames clínicos. Pacientes que receberam injeção de hCG apresentaram, pelo menos, três folículos com aproximadamente 17mm de diâmetro na ultrassonografia, após estimulação ovárica. A aspiração do oócito guiada por ultrassonografia transvaginal foi feita 36 horas após a injeção de hCG.

A manipulação dos gametas foi feita de acordo com protocolos de rotina, seguindo a técnica de ICSI para FIV, com sêmen recuperado por PESA.⁽²⁰⁻²²⁾

Análise estatística

Os Grupos A e B foram estatisticamente comparados com relação às seguintes variáveis: idade, período entre a vasectomia e o procedimento de recuperação de

fertilidade, e idade no momento da vasectomia. Essas variáveis foram analisadas por meio do teste *t* de Student, bicaudal. O nível de significância foi estabelecido em 5% com poder estatístico de 80%.

A incidência de microdeleções do cromossomo Y observada em cada grupo foi comparada separadamente à população média estimada em diversos estudos prévios.^(14,23,24) Os dados do espermograma e o período entre a reversão da vasectomia e gravidez foram apresentados apenas como média e desvio padrão, já que apareceram apenas em um dos grupos.

O tamanho da amostra calculada para a variável incidência de microdeleções do cromossomo Y foi de 23 casos em cada grupo. Essa avaliação foi baseada em dados de estudos prévios.

RESULTADOS

As amostras dos três grupos foram analisadas, e não foram encontradas microdeleções de cromossomo Y em nenhum dos indivíduos. A incidência dessas microdeleções em indivíduos nascidos de pais que passaram por reversão de vasectomia, ou FIV com espermatozoide recuperado por PESA, não diferiu entre os grupos, nem dos indivíduos controle, nascidos de gravidez natural, ou da incidência na população de homens férteis. Os dados dos grupos estão resumidos na tabela 3.

Tabela 3. Número total de indivíduos e número de indivíduos com microdeleções do cromossomo Y em cada grupo

	Número de indivíduos	Indivíduos com microdeleções do cromossomo Y
Grupo A		
Pais	31	0
Filhos	31	0
Grupo B		
Pais	30	0
Filhos	30	0
Grupo C		
Pais	60	0
Filhos	60	0

DISCUSSÃO

Até onde sabemos, o presente estudo é o primeiro a comparar a incidência de microdeleções no cromossomo Y em filhos de pais vasectomizados, com base nas técnicas disponíveis para obter fertilidade após vasectomia.

Um estudo prévio de Lee et al.⁽²⁵⁾ buscou detectar transmissão vertical, expansão de microdeleções e deleção do cromossomo Y *de novo* em 33 fetos masculinos, concebidos por 32 pacientes tratados com ICSI. O cromossomo Y foi estudado de acordo com 10 de seus marcadores específicos. Os autores detectaram uma

frequência geral de microdeleções de 12,5% em pacientes tratados com ICSI (4 de 32 pacientes), em quem todas as microdeleções do cromossomo Y encontravam-se na região AZFc.

Com relação aos fetos, 11 de 33 (33,3%) apresentaram microdeleções do cromossomo Y. Dois deles apresentaram a mesma microdeleção que seus pais, dois tiveram microdeleções maiores do que seus pais, indicando uma expansão, e três apresentaram microdeleção do cromossomo Y *de novo*. Esses resultados corroboram a ideia de que microdeleções do cromossomo Y podem ser transmitidas e expandidas por ICSI, e podem aparecer como *de novo* em filhos do sexo masculino.

De modo similar, Feng et al.,⁽¹²⁾ investigaram os riscos de mutação cromossômica após TRA para casais com origens genéticas similares. Foram estudados 97 filhos homens, cujos pais apresentaram espermatogênese normal, incluindo 19 crianças concebidas por FIV, 18 por ICSI, e 60 concebidas naturalmente e também seus pais. As microdeleções do cromossomo Y foram estudadas de acordo com 13 marcadores específicos do cromossomo Y, e o cariótipo e o exame neonatal também foram considerados no estudo. Os resultados mostraram que todas as crianças tinham constituição cromossômica normal, mas microdeleções do cromossomo Y *de novo* em meninos concebidos por ICSI ou FIV mostrou-se estatisticamente muito mais prevalente do que naqueles concebidos de modo natural [10,8% versus 0, considerando-se 1 (5,3%) em cada 19 filhos por FIV, e 3 (16,7%) em cada 18 filhos por ICSI], sugerindo que os riscos de mutação do gene podem aumentar em filhos concebidos por TRA, embora seus pais tenham espermatogênese e origem genética normais.

Neste estudo, avaliamos a incidência de microdeleções no cromossomo Y em filhos homens, nascidos de pais que passaram por reversão de vasectomia (n=31), ou FIV por PESA (n=30), e de homens férteis com vasectomias programadas (n=60). O cromossomo Y foi avaliado de acordo com 20 de seus marcadores específicos. Os resultados não apresentaram microdeleção do cromossomo Y em nenhum dos indivíduos estudados. A incidência desta microdeleção em indivíduos nascidos de pais que passaram por reversão de vasectomia, ou FIV com espermatozoides recuperados por PESA, não variou entre os grupos. Indivíduos controle nascidos de gravidez natural ou da incidência populacional em homens férteis não tiveram resultados diferentes, sugerindo que o uso de espermatozoides por PESA ou a reversão de vasectomia não aumentam a incidência de microdeleções do cromossomo Y.

Ainda existem controvérsias quanto a uma crescente incidência de microdeleções do cromossomo Y *de novo* em filhos concebidos por TRA, especialmente por

ICSI. Contudo, a discrepância observada em diferentes estudos pode ser resultado de diferenças étnicas e geográficas, critérios inconsistentes na seleção de pacientes e diversos *loci* de marcadores do cromossomo Y selecionados.⁽¹²⁾ Além disso, existem quatro grandes exposições ambientais que podem afetar a taxa de microdeleções do cromossomo Y em filhos homens, como o uso de ICSI, uso de espermatozoides por PESA, vasectomia e sua duração e a idade dos pais. Os dados reportados neste estudo mostraram apenas duas das quatro exposições, ou seja, o uso de espermatozoides por PESA e a reversão de vasectomia. É importante que futuros estudos considerem as principais exposições ambientais em uma amostra maior.

Uma característica positiva do presente estudo é a avaliação minuciosa de deleções do cromossomo Y em 20 regiões do cromossomo, em vez das seis regiões usualmente consideradas na rotina clínica, e na maioria dos estudos sobre este assunto, proporcionando assim um aumento da sensibilidade para detecção dessa deleção (parcial ou total). Sachdeva et al.,⁽²⁶⁾ demonstraram que a incidência de microdeleções do cromossomo Y em pacientes inférteis aumenta de 3% na avaliação de 6 STS para 10,5% na avaliação de 20 STS. Além disso, na detecção de mais regiões do cromossomo Y, é possível observar deleções parciais AZF.

Outra vantagem desse estudo é a avaliação do esperma do Grupo de Controle de homens férteis, já que em muitas publicações que avaliaram a incidência de microdeleções do cromossomo Y na população fértil, o espermograma não foi levado em conta. Além disso, algumas das microdeleções encontradas na população fértil podem estar associadas a alterações na espermatogênese, que, apesar disso, não foram suficientes para causar infertilidade.

As alterações encontradas nos espermogramas dos homens férteis podem ser interpretadas de modos diferentes, e podem refletir uma falha da espermatogênese após a concepção, alterações transitórias dos espermatozoides causadas por doenças ou medicações, ou casos em que a fertilidade foi obtida mesmo com os parâmetros seminais abaixo dos padrões estabelecidos pela OMS.⁽¹⁹⁾ Portanto, a fertilidade comprovada apenas pela concepção de filhos não pode ser considerada evidência de espermatogênese normal, e deveria estar associada à contagem de espermatozoides com normozoospermia. Os estudos que encontraram altas incidências de microdeleções do cromossomo Y foram baseados em fertilidade comprovada pela concepção de filhos, e não pelo espermograma normal, o que pode resultar em falsa alta incidência.^(14,27)

O estudo da presença de microdeleções do cromossomo Y na população geral está crescendo em impor-

tância, pois além da comprovada associação com espermatogênese anormal, essas anormalidades genéticas podem estar relacionadas a outras consequências para a fertilidade do casal, como em situações de abortos repetidos. Homens cujas esposas tiveram abortos repetidos têm maior incidência de microdeleção do cromossomo Y, quantificada em 16%.⁽²⁸⁾

O Grupo Controle é um dos maiores na literatura até agora, e a incidência de microdeleção do cromossomo Y foi semelhante àquela encontrada em Grupos Controle utilizados em diversos estudos sobre essas deleções na população infértil, e variou entre 0 e 0,87%.^(14,23,24,29)

Esta pesquisa demonstrou que a idade dos homens na hora da vasectomia em grupos que passaram pela reversão do procedimento, ou FIV por PESA, era significativamente mais baixa do que a média do Grupo Controle. Este fato é corroborado pela literatura, que relatou pacientes que passaram por vasectomia quando mais jovens e tiveram probabilidade de recuperação de fertilidade.⁽³⁾

Uma limitação do estudo é o número relativamente baixo de casos apresentados nos grupos de pacientes submetidos à reversão de vasectomia e FIV por PESA. Apesar do alto número de pacientes submetidos a procedimentos de recuperação de fertilidade considerados inicialmente, a obtenção de pacientes para o estudo foi muito restrita. Além disso, a baixa incidência de microdeleções na população normal restringe as conclusões e a análise estatística baseadas em amostras pequenas ou médias.

Todavia o estudo não perde sua validade e, com base na incidência observada e no tamanho da amostra, fica claro que a incidência de microdeleções nos grupos apresentados é muito baixa, provavelmente dentro da média da população. Ademais, considerando-se as amostras obtidas, é pouco provável que as populações estudadas apresentem uma incidência de microdeleções de até 10%, de acordo com estudo anterior.⁽¹²⁾

Novos métodos para a detecção de microdeleções do cromossomo Y estão sendo propostos, em uma tentativa de aumentar a eficiência e sensibilidade do método. Sun et al. demonstraram a eficácia do método *suspension array* para detectar microdeleções do cromossomo Y, apresentando uma boa correlação com o método tradicional PCR, e obtendo os resultados mais rapidamente.^(23,24,30)

É possível que a investigação da presença de microdeleções do cromossomo Y em outras células aumente a sensibilidade do método. Alguns estudos descreveram que a incidência de microdeleções do cromossomo Y é maior quando medida no DNA espermático em comparação ao DNA sanguíneo. Esta incidência mais alta pode estar associada a casos de teratozoospermia. Já

no esperma de homens inférteis, a incidência observada foi 12,9%.^(29,31)

CONCLUSÃO

Em suma, a incidência de microdeleções do cromossomo Y em indivíduos nascidos de pais que passaram por reversão de vasectomia, ou fertilização *in vitro* com espermatozoides recuperados por aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo, não apresentou diferença entre os grupos. O mesmo aconteceu com os indivíduos do Grupo Controle, nascidos de gravidez natural, ou da incidência da população em homens férteis, sugerindo que técnicas de reprodução assistida não aumentam a incidência de microdeleções do cromossomo Y.

AGRADECIMENTO

Os autores gostariam de agradecer a todos os pacientes que cordialmente concordaram em participar deste estudo. Este trabalho foi financiado pela Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) #2011/17623-5.

REFERÊNCIAS

- Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med*. 2002;346(10):725-30.
- Mafra FA, Christofolini DM, Bianco B, Gava MM, Glina S, Belangero SI, et al. Chromosomal and molecular abnormalities in a group of Brazilian infertile men with severe oligozoospermia or non-obstructive azoospermia attending an infertility service. *Int Braz J Urol*. 2011;37(2):244-50; discussion 250-1.
- Bernie AM, Osterberg EC, Stahl PJ, Ramasamy R, Goldstein M. Vasectomy reversal in humans. *Spermatogenesis*. 2012;2(4):273-8.
- Pasqualotto FF, Lucon AM, Sobreiro BP, Pasqualotto EB, Arap S. The best infertility treatment for vasectomized men: assisted reproduction or vasectomy reversal? *Rev Hosp Clin Fac Med Sao Paulo*. 2004;59(5):312-5. Review.
- Zhu JL, Basso O, Obel C, Bille C, Olsen J. Infertility, infertility treatment, and congenital malformations: danish national birth cohort. *BMJ*. 2006;333(7570):679.
- Helmerhorst FM, Perquin DA, Donker D, Keirse MJ. Perinatal outcome of singletons and twins after assisted conception: a systematic review of controlled studies. *BMJ*. 2004;328(7434):261. Review.
- Strömberg B, Dahlquist G, Ericson A, Finnström O, Köster M, Stjernqvist K. Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilisation: a population-based study. *Lancet*. 2002;359(9305):461-5.
- Hansen M, Bower C, Milne E, de Klerk N, Kurinczuk JJ. Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects--a systematic review. *Hum Reprod*. 2005;20(2):328-38. Review.
- Bonduelle M, Camus M, De Vos A, Staessen C, Tournaye H, Van Assche E, et al. Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent children. *Hum Reprod*. 1999;(Suppl 1):243-64. Review.
- Bonduelle M, Liebaers I, Deketelaere V, Derde MP, Camus M, Devroey P, et al. Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999). *Hum Reprod*. 2002;17:671-94.
- Martin RH. The risk of chromosomal abnormalities following ICSI. *Hum Reprod*. 1996;11(5):924-5. Review.
- Feng C, Wang LQ, Dong MY, Huang HF. Assisted reproductive technology may increase clinical mutation detection in male offspring. *Fertil Steril*. 2008;90(1):92-6.
- McLachlan RI, O'Bryan MK. Clinical Review#: State of the art for genetic testing of infertile men. *J Clin Endocrinol Metab*. 2010;95(3):1013-24. Review.
- Moghbeli-Nejad S, Mozdarani H, Behmanesh M, Rezaiean Z, Fallahi P. Genome instability in AZFc region on Y chromosome in leukocytes of fertile and infertile individuals following exposure to gamma radiation. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(1):53-61.
- Kent-First M, Muallem A, Shultz J, Pryor J, Roberts K, Nolten W, et al. Defining regions of the Y-chromosome responsible for male infertility and identification of a fourth AZF region (AZFd) by Y-chromosome microdeletion detection. *Mol Reprod Dev*. 1999;53(1):27-41.
- Lahiri DK, Nurnberger Jr. A rapid non-enzymatic method for the preparation of HMW DNA from blood for RFLP studies. *Nucleic Acids Res*. 1991;19(19):5444.
- Umeno M, Shinka T, Sato Y, Yang XJ, Baba Y, Iwamoto T, et al. A rapid and simple system of detecting deletions on the Y chromosome related with male infertility using multiplex PCR. *J Med Invest*. 2006;53(1-2):147-52.
- Mitra A, Dada R, Kumar R, Gupta NP, Kucheria K, Gupta SK. Y chromosome microdeletions in azoospermic patients with Klinefelter's syndrome. *Asian J Androl*. 2006;8(1):81-8.
- World Health Organization (WHO). WHO laboratory manual for the examination and processing of human semen. 5th ed. Geneva: WHO; 2010.
- Gianaroli L, Plachot M, van Kooij R, Al-Hasani S, Dawson K, DeVos A, et al. ESHRE guidelines for good practice in IVF laboratories. Committee of the Special Interest Group on Embryology of the European Society of Human Reproduction and Embryology. *Hum Reprod*. 2000;15(10):2241-6.
- Latin American Network of Assisted Reproduction. Manual of Procedures - Assisted Reproduction Laboratory [Internet]. Redlara; 2006 [cited 2016 Oct 10]. Available from: http://redlara.com/images/arq/livreto_port_01_2007.pdf
- Barbosa CP, Cordts EB, Costa AC, de Oliveira R, de Mendonça MA, Christofolini DM, et al. Low dose of rFSH [100 IU] in controlled ovarian hyperstimulation response: a pilot study. *J Ovarian Res*. 2014;7:11.
- Zhu YJ, Liu SY, Wang H, Wei P, Ding XP. The prevalence of azoospermia factor microdeletion on the Y chromosome of Chinese infertile men detected by multi-analyte suspension array technology. *Asian J Androl*. 2008;10(6):873-81.
- Sun K, Chen XF, Zhu XB, Hu HL, Zhang W, Shao FM, et al. A new molecular diagnostic approach to assess Y chromosome microdeletions in infertile men. *J Int Med Res*. 2012;40(1):237-48.
- Lee SH, Ahn SY, Lee KW, Kwack K, Jun HS, Cha KY. Intracytoplasmic sperm injection may lead to vertical transmission, expansion, and de novo occurrence of Y-chromosome microdeletions in male fetuses. *Fertil Steril*. 2006;85(5):1512-5.
- Sachdeva K, Saxena R, Majumdar A, Chadda S, Verma IC. Use of ethnicity-specific sequence tag site markers for Y chromosome microdeletion studies. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2011;15(6):451-9.
- Pryor JL, Kent-First M, Muallem A, Van Bergen AH, Nolten WE, Meisner L, et al. Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med*. 1997;336(8):534-9.
- Karaer A, Karaer K, Ozaksit G, Ceylaner S, Percin EF. Y chromosome azoospermia factor region microdeletions and recurrent pregnancy loss. *Am J Obstet Gynecol*. 2008;199(6):662. e1-5.
- Sakthivel PJ, Swaminathan M. Y chromosome microdeletions in sperm DNA of infertile patients from Tamil Nadu, south India. *Indian J Urol*. 2008;24(4):480-5.
- Yeom HJ, Her YS, Oh MJ, Paul S, Park MS, Yeoun JP, et al. Application of multiplex bead array assay for Yq microdeletion analysis in infertile males. *Mol Cell Probes*. 2008;22(2):76-82.
- Dada R, Kumar R, Shamsi MB, Kumar R, Kucheria K, Sharma RK, et al. Higher frequency of Yq microdeletions in sperm DNA as compared to DNA isolated from blood. *Asian J Androl*. 2007;9(5):720-2.