

ORIGINAL

Prevalencia de microdeleciones del cromosoma Y en hombres chilenos infértiles



Catherine Sánchez^a, José Ignacio Vinay^b, Raúl Valdevenito^{a,c} y Cristián Palma^{a,c,*}

^a Departamento de Urología, Clínica Las Condes, Santiago, Chile

^b Servicio de Andrología, Fundación Puigvert, Barcelona, España

^c Servicio de Urología, Hospital Clínico, Facultad de Medicina, Universidad de Chile, Santiago, Chile

Recibido el 6 de julio de 2015; aceptado el 6 de noviembre de 2015

Disponible en Internet el 5 de febrero de 2016

PALABRAS CLAVE

Infertilidad masculina;
Azoospermia;
Microdelección cromosoma Y

Resumen

Objetivo: El objetivo de este estudio es determinar la prevalencia de microdeleciones del cromosoma Y en hombres chilenos infértiles.

Material y métodos: Se incluyeron 102 hombres con diagnóstico de azoospermia u oligozoospermia severa que consultaron en la Unidad de Andrología por infertilidad. Se llevó a cabo análisis de microdeleciones de la región del factor de azoospermia (AZF) del cromosoma Y a través de reacción en cadena de la polimerasa, utilizando ADN genómico extraído de leucocitos de sangre periférica. Cada paciente fue analizado utilizando *sequence tagged sites* para las regiones AZFa, AZFb y AZFc.

Resultados: Sesenta y siete pacientes presentaron azoospermia y 35 oligozoospermia severa. Se encontraron microdeleciones del cromosoma Y en el 9,8% de los pacientes. La mutación más prevalente fue AZFc, afectando al 3,9% de la muestra, seguida por AZFbc (2,9%), AZFa (2,0%) y AZFb (1,0%). Solo los hombres azoospermicos presentaron las mutaciones.

Conclusiones: La prevalencia de microdeleciones del cromosoma Y en hombres chilenos infértiles es similar a la presentada en estudios internacionales. Estas mutaciones deben ser buscadas cuando se enfrenta a un paciente infértil con alteraciones cuantitativas severas del seminograma, ya que AZFa y AZFb están asociados con ausencia completa de gametos viables, y la portación de AZFc tiene importantes consecuencias en el potencial de fertilidad de la descendencia masculina.

© 2015 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

* Autor para correspondencia.

Correo electrónico: cpalma@clc.cl (C. Palma).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.androl.2015.11.002>

1698-031X/© 2015 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Publicado por Elsevier España, S.L.U. Todos los derechos reservados.

KEYWORDS

Male infertility;
Azoospermia;
Y chromosome
microdeletion

Y chromosome microdeletion prevalence in infertile Chilean men**Abstract**

Objective: The aim of this study is to determine the prevalence of Y chromosome microdeletions in infertile Chilean men.

Material and methods: A group of 102 infertile men with azoospermia or severe oligozoospermia were screened while attending a fertility clinic for microdeletions in the azoospermia factor (AZF) region of Y chromosome by multiplex polymerase chain reaction. Genomic DNA was extracted from peripheral blood samples. Each patient was analysed for the presence of sequence tagged sites in the AZFa, AZFb, and AZFc regions.

Results: Azoospermia and severe oligozoospermia was found in 67 and 35 patients, respectively. Microdeletions were found in 9.8% of patients. The most prevalent mutation was AZFc, affecting 3.9% of the sample. This was followed by AZFbc with 2.9%, AZFa with 2.0%, and AZFb with 1.0%. Only azoospermic men were found to have these genetic alterations.

Conclusions: Prevalence of Y chromosome microdeletions in infertile Chilean men is similar to the prevalence presented in international studies. As AZFa and AZFb mutations are associated with complete absence of viable gametes, and AZFc has important consequences in the fertility potential of the offspring, these mutations have to be searched when presented with an infertile patient with severe sperm alterations.

© 2015 Asociación Española de Andrología, Medicina Sexual y Reproductiva. Published by Elsevier España, S.L.U. All rights reserved.

Introducción

Infertilidad se define como la incapacidad de obtener un embarazo, en una pareja sexualmente activa que no utiliza métodos anticonceptivos, a lo largo de un año. Aproximadamente el 15% de las parejas se encuentra en este grupo¹. Diferentes estudios han sugerido una contribución masculina a la infertilidad de pareja entre un 45-50% de los casos. La infertilidad masculina afecta aproximadamente al 7% de los hombres, presentándose hasta el 15% de ellos con azoospermia, es decir, ausencia de espermatozoides en el semen².

El cromosoma Y tiene un rol fundamental en el desarrollo y maduración de los gametos masculinos. Diferentes genes localizados en este cromosoma están involucrados en diversos procesos de la espermatogénesis humana. Múltiples grupos alrededor del mundo han descrito deleciones de genes o secuencias génicas en el cromosoma Y de pacientes con infertilidad idiopática, asociadas a alteraciones severas en diferentes parámetros seminales²⁻⁴.

Las técnicas de reproducción asistida (TRA), tanto de baja como de alta complejidad, han permitido subsanar parcialmente alteraciones anatómicas, hormonales y genéticas de las parejas infértiles. Sin embargo, existe un grupo específico de parejas con un factor masculino severo que no podrán obtener un embarazo exitoso sin importar la técnica utilizada.

El desarrollo vertiginoso de diferentes TRA no solo ha permitido que millones de parejas logren alcanzar embarazos exitosos, sino que además ha develado conflictos bioéticos concernientes a la transmisión vertical de defectos genéticos, tales como deleciones génicas en el cromosoma Y, asociadas a alteraciones de fertilidad en la descendencia masculina⁵.

Entre las diversas alteraciones genéticas observadas en hombres infértiles destacan las microdeleciones del cromosoma Y por su frecuencia, y sobre todo, por los efectos que tienen en el potencial de fertilidad de los pacientes y de su descendencia. Las microdeleciones del cromosoma Y corresponden a la ausencia de secuencias génicas o genes de la región funcionalmente activa del cromosoma Y²⁻⁶. Estas mutaciones representan la anomalía cromosómica estructural más frecuente en hombres con infertilidad idiopática, observándose en el 15-20% de hombres con azoospermia idiopática, en el 7-10% de los hombres con oligozoospermia idiopática y en el 2-3% de los pacientes candidatos para inyección intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, por sus siglas en inglés)⁷.

La región ubicada en la zona distal del brazo largo del cromosoma Y (Yq11) contiene los genes involucrados en el control de la espermatogénesis⁸⁻¹⁰. Esta zona del cromosoma Y se ha denominado *factor de azoospermia* (AZF). Análisis moleculares han dividido esta región en 3 subregiones: AZFa, AZFb y AZFc^{11,12}.

La delección parcial o completa de las regiones AZF altera la espermatogénesis. Existen por lo menos 14 proteínas codificadas en el locus de AZF. Las deleciones descritas actualmente ocurren en alguno de los 6 siguientes patrones: AZFa, AZFb, AZFc, AZFbc, AZFabc y la delección parcial de AZFc¹³. Estas mutaciones son en su mayoría *de novo*, afectando a 1/1.000 a 1/5.000 recién nacidos^{14,15}. Existen importantes diferencias en la frecuencia de estas mutaciones en diferentes estudios. Una de las causas de ello es la variación étnica descrita para estas anomalías cromosómicas²⁻¹⁵.

El objetivo principal de este artículo es presentar por primera vez la prevalencia de esta alteración genética en hombres chilenos infértiles, con alteraciones severas del seminograma, sometidos a TRA de alta complejidad.

Material y métodos

Selección de pacientes

Estudio descriptivo transversal con aprobación de comité de ética institucional. Del universo de pacientes que consultaron por infertilidad masculina a la unidad de reproducción de un hospital universitario y una clínica privada entre noviembre de 2012 y diciembre de 2013 se seleccionaron los que presentaban alteraciones cuantitativas severas en el seminograma durante la evaluación andrológica inicial (mínimo 2 muestras separadas). Dichas alteraciones fueron definidas como azoospermia (ausencia de espermatozoides en muestra seminal) u oligozoospermia severa (menos de 5×10^6 /ml espermatozoides en muestra seminal). Todos los pacientes firmaron, antes de ser incluidos en el estudio, un consentimiento informado *ad hoc*.

Análisis de semen

El análisis de semen se realizó siguiendo las recomendaciones de la Organización Mundial de la Salud (OMS). Los parámetros de normalidad utilizados son los publicados por la OMS el año 2010. El diagnóstico de azoospermia se basó en la ausencia de espermatozoides en al menos 2 muestras diferentes, después de la centrifugación a 1.000g durante 5 min¹⁶.

Estudio andrológico

Todos los pacientes seleccionados fueron sometidos a una evaluación andrológica completa que incluyó anamnesis médica y sexual, examen físico, medición de hormona foliculoestimulante (FSH), ecografía testicular, cariotipo y análisis de microdeleciones del cromosoma Y. Las concentraciones séricas de FSH fueron determinadas por ensayo inmunoradiométrico (Siemens Medical Solutions Diagnostics, LA, CA, EE. UU.); los resultados se expresan en mIU/ml, con valores normales en los rangos de 1-15 mIU/ml.

Detección de microdeleciones del cromosoma Y

Las microdeleciones de AZF fueron detectadas utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) asociada a *sequence tagged sites* (STS) específicos para el cromosoma Y.

De los pacientes se extrajo ADN genómico de leucocitos de sangre periférica con el kit Wizard (Promega, EE. UU.) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Posteriormente se realizó la amplificación a través de PCR *multiplex* de 8 STSs de la región AZF de acuerdo a protocolos de la EAA descritos en la literatura¹⁷. Se amplificaron 2 STS de cada una de las regiones de interés: AZFa, AZFb y AZFc. Los genes ZFY/ZFX y SRY (Yp) se utilizaron como controles internos. Se amplificaron STS complementarios para confirmar las microdeleciones de regiones específicas. Las mutaciones fueron expresadas como positivas para alguno de los 6 patrones de deleciones descritos.

Tabla 1 Características de los pacientes estudiados

	Valor ^a
Hombres	102
Edad	36 ± 6 años
Antecedentes	
Cariotipo 46 XY	101 (99%)
Cariotipo 47 XXY	1 (1%)
Criptorquidia	17 (16,7%)
Agnesia de conductos deferentes	3 (2,9%)
Varicocele	2 (2%)
Prostatitis	1 (1%)
Trauma genital de alta energía	1 (1%)
Presencia de hijos con pareja anterior	1 (1%)
Hidrocele	1 (1%)
Otros antecedentes	24 (23,5%)
Sin antecedentes mórbidos	50 (49%)
FSH	11,2 ± 8 mIU/ml
Azoospermia	67 (65,7%)
Oligozoospermia severa	35 (34,3%)

DE: desviación estándar; FSH: hormona foliculoestimulante.

^a Media (DE) para variables continuas; n (%) para variables categóricas.

Resultados

Las características de los pacientes se muestran en la [tabla 1](#). Ciento dos pacientes cumplieron los criterios de inclusión durante el periodo señalado, con una edad promedio de 35 años. Todos los pacientes fueron sometidos a una evaluación andrológica completa. Al analizar los parámetros seminales de los sujetos, 67 y 35 pacientes presentaban azoospermia y oligozoospermia, respectivamente.

Al realizar la búsqueda de microdeleciones del cromosoma Y se determinó que el 9,8% de estos pacientes con infertilidad idiopática asociada a alteraciones severas del seminograma presentaban una mutación AZF. Del total de pacientes con azoospermia, el 15% poseían estudio positivo para microdeleciones del cromosoma Y.

La mutación más prevalente fue AZFc, afectando al 3,9% de los pacientes, seguida por AZFbc, con el 2,9%; AZFa, con el 2,0%, y AZFb, con el 1,0%. Todas las mutaciones se presentaron en pacientes con azoospermia. Es decir, en este estudio los pacientes oligozoospermicos fueron negativos para microdeleciones del cromosoma Y. La distribución de los diferentes patrones de microdeleciones se presenta en la [tabla 2](#).

El 53% de los pacientes no presentaban antecedentes relevantes en la anamnesis. Cabe destacar que un paciente con mutación AZFbc tenía el antecedente de criptorquidia en la infancia (33,3% del total de pacientes con mutación AZFbc). Solo un paciente presentó un cariotipo alterado (47XXY), realizándose el diagnóstico de síndrome de Klinefelter. Los pacientes que presentaron microdeleciones no eran portadores de aneuploidías.

Tabla 2 Prevalencia de microdeleciones del cromosoma Y en grupos de pacientes según alteración seminal

	Azoospermia	Oligozoospermia severa	Total pacientes
Microdelección (+)	10 (15,0%)	0	10 (9,8%)
AZFa	2 (3,0%)	0	2 (2,0%)
AZFb	1 (1,5%)	0	1 (1,0%)
AZFc	4 (6,9%)	0	4 (3,9%)
AZFbc	3 (4,5%)	0	3 (2,9%)

Resultados presentados en número de pacientes afectados (%).

Discusión

La prevalencia de microdeleciones encontrada es similar a la presentada en estudios internacionales^{1,2}. Un estudio de prevalencia de un haplotipo amerindio en población chilena, publicado en 2013 por Lardone et al.¹⁸, describe una prevalencia discretamente mayor (11,1%) de microdeleciones del cromosoma Y en sujetos con azoospermia y oligozoospermia severa. La distribución del tipo de mutación también se asemeja a la que se encuentra en la literatura internacional, siendo AZFc la delección más frecuente en pacientes con infertilidad idiopática².

Esta prevalencia es semejante a la publicada en otros grupos¹⁹⁻²¹. Por ejemplo, en un grupo de pacientes candidatos a ICSI, Oliva et al.¹⁹ describieron una prevalencia del 16% de microdeleciones del cromosoma Y en pacientes azoospermicos y del 1,5% en oligozoospermicos. En el estudio de Martínez et al.²⁰ la proporción de pacientes azoospermicos con mutaciones fue del 14%. En un estudio de 94 pacientes infértiles originarios de Brasil no se observaron microdeleciones Yq en los pacientes con oligozoospermia severa²².

Parece que la frecuencia de mutaciones puede depender del pool génico y del linaje de una población determinada¹⁸. Diversos trabajos que estudian haplotipos específicos de distintas poblaciones han tratado de determinar esta relación. Lo Giacco et al.²¹ compararon la frecuencia de mutaciones de AZF en población infértil española y no española. En pacientes con infertilidad idiopática portadores del haplotipo hgr (específico para población originaria de España) se observó una frecuencia de deleciones significativamente menor, comparado con hombres infértiles de origen no español (2,7% vs 7,9%; $p < 0,05$). Así mismo, Lardone et al.¹⁸ compararon la prevalencia de mutaciones en AZF y la frecuencia del haplotipo amerindio Q1a3a en pacientes chilenos fértiles e infértiles. Se observó una proporción significativamente mayor del haplogrupo amerindio Q1a3a en pacientes infértiles con microdeleciones comparado con pacientes con falla en la espermatogénesis sin microdeleciones y pacientes control ($p < 0,01$ y $p < 0,05$, respectivamente).

Estos resultados apoyan las recomendaciones de diferentes sociedades científicas en relación a solicitar el estudio con cariotipo y microdelección del cromosoma Y a todo paciente que consulta por infertilidad idiopática con alteraciones cuantitativas severas en los parámetros seminales^{1,23}. Conocer el *status* genético del paciente tendrá consecuencias importantes en la selección del tipo de terapia posterior y la necesidad de consejo genético a la pareja.

El locus AZF del brazo largo del cromosoma Y contiene, según los estudios disponibles hasta la fecha, 14 genes

codificadores para proteínas y 2 pseudogenes. Los patrones de delección existentes —AZFa, P5-proximal P1 (AZFb), P5-distal P1 (AZFbc), P4-distal P1 (AZFbc), b2/b4 (AZFc) y AZFc parcial— son producto de la recombinación intra-cromosomal entre secuencias homólogas^{2,24}.

El locus AZFa se ubica la región proximal de Yq11. Contiene 2 genes funcionales: *USP9Y* y *DBY*. El primero tiene un rol fundamental en la eficiencia de la espermatogénesis, el segundo está involucrado en las fases premeióticas de las espermatogonias²⁵. Las mutaciones de AZFa son de baja frecuencia. La delección completa remueve aproximadamente 792 kilobases (kb), que incluyen los 2 genes candidatos antes mencionados^{2,26}. La delección de este segmento genético bloquea la producción y la maduración de las células germinales en los túbulos seminíferos. El fenotipo que se evidencia en la biopsia testicular es el síndrome de Sertoli solo (ausencia de células germinales). Es imposible rescatar gametos viables para su utilización en fertilización *in vitro* (FIV) e ICSI²⁷.

AZFb se localiza en la región media de Yq11. Se superpone con la región AZFc en 1,5 megabases²⁸. Se han identificado diversos genes candidatos en esta región, tanto de copia única (*EIF1AY*, *RPS4Y2*, *CYORF15A*, *CYORF15B* y *SMCY*) como de copias múltiples (*XKRY*, *HSFY*, *RBMY1A1*, *PRY*, *CDY*, *BPY2* y *DAZ*). Todas estas familias génicas poseen un patrón de expresión específico para el tejido testicular^{29,30}. La detección de esta mutación tiene un valor diagnóstico y pronóstico. El fenotipo observado en las biopsias testiculares de estos pacientes es la detención de la maduración en fases premeióticas. Los pacientes se presentan con azoospermia no obstructiva y, al igual que con AZFa, es imposible rescatar gametos viables con las técnicas de extracción de espermatozoides desde testículo (TESE)^{2,31}.

El locus AZFc se ha mapeado en la zona distal del brazo largo del cromosoma Y. Su secuencia comprende aproximadamente 4,5 mb. Contiene 21 genes candidatos³². Los genes más importantes en esta secuencia son: 4 copias de *DAZ*, 3 copias de *BPY2* y 2 copias de *CDY1*. Todos los miembros de la familia de genes *DAZ* codifican para proteínas involucradas en la translocación de ARN mensajero, siendo vitales para la espermatogénesis³²⁻³⁴. Se han descrito, además, deleciones parciales de AZFc producto de la recombinación de los sub-amplicones dentro de la región. Dentro de ellas tienen relevancia clínica para infertilidad: gr/gr, b1/b3 y b2/b3; la correlación genotipo-fenotipo de estas alteraciones no es muy clara hasta la fecha^{2,35}.

La correlación entre genotipo gr/gr y fenotipo pudiera depender en parte del pool génico de una población determinada. Los efectos en la espermatogénesis parecen ser diferentes según los antecedentes genéticos de la población³⁶. En un estudio español se comparó la frecuencia

de la delección parcial de AZFc gr/gr entre pacientes infértiles candidatos a ICSI y pacientes control. Las delecciones gr/gr fueron observadas en 11 (5,07%) de 217 pacientes oligozoospermicos y en 1 (1,52%) de 66 pacientes azoospermicos; no se observó la mutación en ninguno de los 232 controles ($p = 0,02$)³⁶. Sin embargo, en un estudio que comparó 218 hombres con falla en la espermatogénesis con 182 controles, todos pacientes de origen chileno (confirmados por la presencia del haplotipo amerindio Q1a3a), se observó la presencia de la delección en 6 y 4 pacientes, respectivamente. Estas diferencias no fueron significativas¹⁸.

Las mutaciones en esta región representan el tipo más frecuente de delección observado en pacientes azoospermicos y oligozoospermicos severos. El fenotipo resultante es diverso, desde azoospermia hasta oligozoospermia moderada a severa^{2,37,38}.

Las variaciones dependen de 4 elementos:

1. Pool genético del paciente.
2. Exposición a factores ambientales.
3. Tamaño de la delección.
4. Progresión del daño de la espermatogénesis en el tiempo.

En estos pacientes es posible rescatar gametos viables a través de TESE, teniendo en cuenta que la mutación será transmitida y la descendencia masculina poseerá la anomalía genética con la alteración de la fertilidad asociada a esta^{2,38}.

Por último, las delecciones que ocurren en la zona de traslape entre AZFb y AZFc se denominan delecciones AZFbc. Se consideran una clase significativa de delecciones recurrentes del cromosoma Y, representando la delección más larga del genoma humano^{2,28}. El fenotipo resultante provoca falla en la espermatogénesis e imposibilidad de extraer espermatozoides viables para su utilización en FIV/ICSI²⁷. En este estudio se observa que un tercio de los pacientes con esta mutación eran portadores de criptorquidia, pudiéndose inferir que tanto las alteraciones del desarrollo y migración testicular, como la falla en la espermatogénesis, pueden tener un origen común y encontrarse dentro del espectro de fenotipos secundarios a la delección de la región AZFbc.

En el presente trabajo, ningún paciente con oligozoospermia severa era portador de microdelecciones Yq. Esto se explica porque la mutación es poco frecuente en pacientes no azoospermicos, sobre todo en aquellos con una concentración > 2 millones/ml, y porque nuestra muestra tiene un número limitado de participantes²¹. Al aumentar el número de pacientes es probable que la prevalencia de esta mutación se acerque al 1-2% publicado en otras series¹⁹.

En este estudio se confirma que la frecuencia de microdelecciones del cromosoma Y en población chilena es semejante a la descrita en población caucásica europea y norteamericana presentada por diferentes grupos. Esta alta prevalencia en individuos con alteraciones severas de los parámetros seminales hace necesario incluir este examen dentro de la evaluación estándar de pacientes con azoospermia y oligozoospermia severa. Solo de esta forma se podrá eximir a los pacientes de eventuales procedimientos largos y costosos que no lograrán obtener un embarazo exitoso, en el caso de AZFa y AZFb, y se podrá realizar consejería genética antes de continuar con TRA de alta complejidad que transmitirán

las alteraciones de la fertilidad a la descendencia, en el caso de AZFc.

Responsabilidades éticas

Protección de personas y animales. Los autores declaran que los procedimientos seguidos se conformaron a las normas éticas del comité de experimentación humana responsable y de acuerdo con la Asociación Médica Mundial y la Declaración de Helsinki.

Confidencialidad de los datos. Los autores declaran que han seguido los protocolos de su centro de trabajo sobre la publicación de datos de pacientes.

Derecho a la privacidad y consentimiento informado. Los autores han obtenido el consentimiento informado de los pacientes y/o sujetos referidos en el artículo. Este documento obra en poder del autor de correspondencia.

Conflicto de intereses

Los autores declaran no tener ningún conflicto de intereses.

Bibliografía

1. Jungwirth A, Giwercman A, Tournaye H, Diemer T, Kopa Z, Dohle G, et al. European Association of Urology guidelines on male infertility: The 2012 update. *Eur Urol*. 2012;62:324–32.
2. Suganthi R, Vijesh VV, Vandana N, Fathima Ali Benazir J. Y chromosomal microdeletion screening in the workup of male infertility and its current status in India. *Int J Fertil Steril*. 2014;7:253–66.
3. Sadeghi-Nejad H, Farrokhi F. Genetics of azoospermia: Current knowledge, clinical implications, and future directions. Part II: Y chromosome microdeletions. *Urol J*. 2007;4:192–206.
4. Kamali M, Baghestani AR, Kashfi F, Kashani H, Tavajohi S, Amirchaghmaghi E. A survey on infertility in Royan Institute. *Int J Fertil Steril*. 2007;1:23–6.
5. Zhu XB, Liu YL, Zhang W, Ping P, Cao XR, Liu Y, et al. Vertical transmission of the Yq AZFc microdeletion from father to son over two or three generations in infertile Han Chinese families. *Asian J Androl*. 2010;12:240–6.
6. Tiepolo L, Zuffardi O. Localization of factors controlling spermatogenesis in the nonfluorescent position of the human Y chromosome long arm. *Hum Genet*. 1976;34:119–24.
7. Krauz, Quintana-Murci L, McElreavey K. Prognostic value of Y deletion analysis. What is the clinical prognostic value of Y chromosome microdeletion analysis? *Hum Reprod*. 2000;15:1431–4.
8. Foote S, Vollrath D, Hilton A, Page DC. The human Y chromosome: Overlapping DNA clones spanning the euchromatic region. *Science*. 1992;258:60–6.
9. Vollrath D, Foote S, Hilton A, Brown LG, Beer-Romero P, Bogan JS, et al. The human Y chromosome: A 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science*. 1992;258:52–9.
10. Tilford C, Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Rozen S, Brown LG, Rosenberg M, et al. A physical map of the human Y chromosome. *Nature*. 2001;409:943–5.
11. 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;53:27–41.

12. Vogt PH, Edelmann A, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiewewetter F, et al. Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet.* 1996;5:933–43.
13. Vogt PH. Azoospermia factor (AZF) in Yq11: Towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis. *Reprod Biomed.* 2005;10:81–93.
14. Krausz C, Giachini C, Xue Y, O'Bryan MK, Gromoll J, Rajpert-de Meyts E. Phenotypic variation within European carriers of the Y-chromosomal gr/gr deletion is independent of Y-chromosomal background. *J Med Genet.* 2009;46:21–31.
15. Li LL, Zhu YZ, Yu XW, Wang RX, Hu ZM, Liu RZ. Pedigrees of infertile Chinese men with Y chromosome microdeletions derived from natural transmission and de novo mutation. *Genet Mol Res.* 2015;14:1932–41.
16. WHO Laboratory Manual for the Examination and Processing of Human Semen. 5th ed. Geneva, Switzerland: WHO Press; 2010.
17. 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.* 2004;27:240–9.
18. Lardone MC, Marengo A, Parada-Bustamante A, Cifuentes L, Piottante A, Ebensperger M, et al. Greater prevalence of Y chromosome Q1a3a haplogroup in Y-microdeleted Chilean men: A case-control study. *J Assist Reprod Genet.* 2013;30:531–8.
19. Oliva R, Margarit E, Ballescà JL, Carrió A, Sánchez A, Milà M, et al. Prevalence of Y chromosome microdeletions in oligospermic and azospermic candidates for intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 1998;70:506–10.
20. Martínez MC, Bernabé MJ, Gómez E, Ballesteros A, Landeiras J, Glover G, et al. Screening for AZF deletion in a large series of severely impaired spermatogenesis patients. *J Androl.* 2000;21:651–5.
21. Lo Giacco D, Chianese C, Sánchez-Curbelo J, Bassas L, Ruiz P, Rajmil O, et al. Clinical relevance of Y-linked CNV screening in male infertility: New insights based on the 8-year experience of a diagnostic genetic laboratory. *Eur J Hum Genet.* 2014;22:754–61.
22. Dos Santos Godoy GC, Galera BB, Araujo C, Barbosa JS, de Pinho MF, Galera MF, et al. The low prevalence of Y chromosomal microdeletions is observed in the oligozoospermic men in the area of Mato Grosso State and Amazonian Region of Brazilian patients. *Clin Med Insights Reprod Health.* 2014;8:51–7.
23. Jarow J, Sigman M, Kolettis P. The Optimal Evaluation of the Infertile Male: AUA Best Practice Statement. American Urological Association Education and Research. 2010.
24. Skaletsky H, Kuroda-Kawaguchi T, Minx PJ, Cordum HS, Hillier L, Brown LG, et al. The male-specific region of the human Y chromosome is a mosaic of discrete sequence classes. *Nature.* 2003;423:825–37.
25. Sun C, Skaletsky H, Birren B, Devon K, Tang Z, Silber S, et al. An azospermic man with a de novo point mutation in the Y chromosomal gene USP9Y. *Nat Genet.* 1999;23:429–32.
26. Kamp C, Hirschmann P, Voss H, Huellen K, Vogt PH. Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. *Hum Mol Genet.* 2000;9:2563–72.
27. Hopps CV, Mielnik A, Goldstein M, Palermo GD, Rosenwaks Z, Schlegel PN. Detection of sperm in men with Y chromosome microdeletions of the AZFa, AZFb and AZFc regions. *Hum Reprod.* 2003;18:1660–5.
28. Repping S, Skaletsky H, Lange J, Silber S, van der Veen F, Oates RD, et al. Recombination between palindromes P5 and P1 on the human Y chromosome causes massive deletions and spermatogenic failure. *Am J Hum Genet.* 2002;71:906–22.
29. Navarro-Costa P, Plancha CE, Gonçalves J. Genetic dissection of the AZF regions of the human Y chromosome: Thriller or filler for male (in)fertility. *J Biomed Biotechnol.* 2010;2010:936569.
30. Ferlin A, Moro E, Rossi A, Dallapiccola B, Foresta C. The human Y chromosomes azoospermia factor b (AZFb) region: Sequence, structure, and deletion analysis in infertile men. *J Med Genet.* 2003;40:18–24.
31. Simoni M, Tüttelmann F, Gromoll J, Nieschlag E. Clinical consequences of microdeletions of the Y chromosome: The extended Munster experience. *Reprod Biomed Online.* 2008;16:289–303.
32. Kuroda-Kawaguchi T, Skaletsky H, Brown LG, Minx PJ, Cordum HS, Waterson RH, et al. The AZFc region of the Y chromosome features massive palindromes and uniform recurrent deletions in infertile men. *Nat Genet.* 2001;29:279–86.
33. Ravel C, Chantot-Bastaraud S, el Houate B, Rouba H, Legendre M, Lorencxo D, et al. Y chromosome AZFc structural architecture and relationship to male fertility. *Fertil Steril.* 2009;92:1924–33.
34. Saxena R, de Vries JW, Repping S, Alagappan RK, Skaletsky H, Brown LG, et al. Four DAZ genes in two clusters found in the AZFc region of the human Y chromosome. *Genomics.* 2000;67:256–67.
35. Lin YW, Hsu CL, Yen PH. A two-step protocol for the detection of rearrangements at the AZFc region on the human Y chromosome. *Mol Hum Reprod.* 2006;12:347–51.
36. De Llanos M, Ballescà JL, Gázquez C, Margarit E, Oliva R. High frequency of gr/gr chromosome Y deletions in consecutive oligospermic ICSI candidates. *Hum Reprod.* 2005;20:216–20.
37. Foresta C, Moro E, Ferlin A. Y chromosome microdeletions and alterations of spermatogenesis. *Endocr Rev.* 2001;22:226–39.
38. Oates RD, Silber S, Brown LG, Page DC. 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. *Hum Reprod.* 2002;17:2813–24.