
Frecuencia de microdeleciones del cromosoma Y en hombres venezolanos con infertilidad idiopática.

Erika Fernández-Salgado¹, Francisco Álvarez-Nava², Lisbeth Borjas-Fajardo², Jesús Osuna³, Roald Gómez³, William Zabala², Mariana Zambrano⁴ y María Gabriela Portillo-M².

¹Instituto de Investigaciones Clínicas “Dr. Américo Negrette”, ²Unidad de Genética Médica, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela,

³Unidad de Endocrinología, Hospital Universitario de Mérida, Venezuela y

⁴Cátedra de Bioquímica Clínica, Escuela de Bioanálisis, Facultad de Medicina, Universidad del Zulia. Maracaibo, Venezuela.

Correo electrónico: erfernandez@luz.edu.ve

Palabras clave: AZF, infertilidad idiopática, azoospermia, STSs.

Resumen. La infertilidad hoy día es un problema de salud importante que afecta cerca de 10-20% de las parejas. El factor masculino es el responsable del 50% de las parejas infértiles. Se desconoce el origen de la reducción espermática en cerca del 60-70% de casos. Existen varias causas de la infertilidad masculina tales como varicocele, obstrucción espermática del conducto y desórdenes endocrinos. Tres regiones diferentes no solapantes conocidas como AZFa, AZFb, y AZFc localizadas en el intervalo 5-6 del brazo largo del cromosoma Y (Yq), han sido asociadas a falla espermatogénica en humanos. El objetivo de este trabajo fue determinar la frecuencia de las microdeleciones del cromosoma Y en hombres venezolanos con infertilidad idiopática. Se realizó análisis cromosómico, seminal, histológico y molecular en 29 hombres venezolanos con azoospermia u oligozoospermia idiopática. El análisis molecular se efectuó a través de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) múltiple de 22 STS. Se detectaron microdeleciones en la región AZFc del cromosoma Y en 1 de 29 pacientes (3,4%). Estos resultados sugieren que la frecuencia de las microdeleciones del cromosoma Y en pacientes venezolanos, es similar a la de otras poblaciones con diferente origen geográfico y étnico.

Molecular analysis of microdeletions of the Y chromosome in venezuelan males with idiopathic infertility

Invest Clín 2006; 47(4): 395 - 403

Key words: AZF, idiopathic infertility, azoospermia, STSs.

Abstract. Today infertility is a major health problem affecting about 10-20% of couples. A male factor is assumed to be responsible in about 50% of the infertile couples. The origin of reduced testicular sperm function is unknown in about 60-70% of cases. There are several causes of male infertility such as varicocele, spermatic duct obstruction, and endocrine disorders. Micro-deletions in the Yq are known to represent the pathogenic mechanisms for infertile males. Three different non-overlapping regions designated as AZFa, AZFb, and AZFc are located in interval 5-6 of Yq, and are associated with impaired spermatogenesis in humans. To determine the prevalence of Y chromosomal microdeletions in Venezuelan males with idiopathic infertility, chromosomal, seminal, histological and molecular analyses were carried out in 29 Venezuelan males with idiopathic azoospermia or oligospermia. Y-microdeletions analyses were performed using a multiplex polymerase chain reaction (PCR)-based technique with 22 sequences-tagged-sites (STSs). One of 29 patients (3.4%) had Yq microdeletions on AZFc. The frequency of AZF microdeletions in Venezuelan patients was similar to other populations with different ethnical or geographical origin.

Recibido: 15-03-2006. Aceptado: 27-04-2006.

INTRODUCCIÓN

La infertilidad se define como la incapacidad de tener hijos después de 12 meses de relaciones sexuales sin ningún tipo de protección (1). Este trastorno representa un problema de salud que afecta a cerca de 10-20% de las parejas, y el factor masculino constituye entre 45-50% de las causas. Se desconoce el origen de la reducción espermática en cerca del 60-70% de casos (2). Esta alteración espermática muestra una gran heterogeneidad en su etiología (3). La infertilidad masculina se puede clasificar en causas pre-testiculares, testiculares y post-testiculares. Dentro de las causas testiculares se encuentran ciertos factores de tipo genético, entre los cuales cabe mencionar las microdeleciones del cromosoma Y

(4). Esto se debe al hecho que este cromosoma alberga en su brazo largo (Yq) un gran número de genes involucrados en la espermatogénesis.

La primera asociación de insuficiencia espermatogénica y alteraciones estructurales de genes ubicados en el cromosoma Y fue identificada por Tiepolo y Zuffardi en 1976, quienes demostraron la existencia de tres regiones conocidas como factores de azoospermia (AZFa, AZFb y AZFc). Este factor se ubicó dentro del intervalo de deleción 6 en la región Yq11.23 (5). Estos genes están involucrados en la patogénesis de la infertilidad masculina asociada con azoospermia o oligozoospermia severa.

Se han identificado genes candidatos involucrados en la espermatogénesis en las regiones AZF del cromosoma Y, donde se

destacan, en la región AZFa: el gen *USP9Y* (*ubiquitin-specific proteasa 9 Y chromosome*) (6,7) y el gen *DBY* (*DEAD/H box polipeptide Y chromosome*), éste último parece representar el principal gen responsable de daño testicular (8). En la región AZFb se encuentra el gen perteneciente a la familia de genes *RBM1Y* (*RNA-binding motif*), (9-11) y en AZFc el grupo génico *DAZ* (*deleted in azoospermia*) (12-16).

Los hombres infértiles con microdeleciones en las regiones AZFa y AZFb muestran defectos severos en la espermatogénesis, con alta prevalencia de Síndrome de Solo Células de Sertoli tipo I (SCOS), el cual se define como la ausencia de células germinales en la biopsia testicular (8), mientras que microdeleciones en la región AZFb y AZFc pueden ser compatibles con espermatogénesis residual. El porcentaje de microdeleciones de las regiones AZF varía de acuerdo a ciertos autores, sin embargo, en términos generales las microdeleciones en la región AZFc son las causas más frecuentes de estos trastornos, variando considerablemente entre el 1% y el 59,6% (2, 7, 11, 17). Para las regiones AZFa y AZFb se describe una frecuencia de 4,9% y 15,8 %, respectivamente (7).

Numerosos estudios han demostrado que la frecuencia de microdeleciones del cromosoma Y entre hombres con azoospermia idiopática no obstructiva u oligozoospermia severa es muy variable, sus rangos varían desde 3% hasta 55,5% (16, 18-20), con mayor frecuencia en los casos de falla espermatogénica severa. Varios factores han sido implicados en esta amplia variación de frecuencias de microdeleciones del cromosoma Y, tales como: diseño del estudio (criterios de inclusión, definición clínica de los pacientes); errores técnicos y diferencias étnicas (2, 21).

El objetivo de este estudio fue determinar la frecuencia de las microdeleciones del cromosoma Y en pacientes venezolanos con infertilidad masculina idiopática.

PACIENTES Y MÉTODOS

Se estudiaron 29 pacientes, que habían sido previamente diagnosticados como infertilidad masculina idiopática, provenientes de la consulta de asesoramiento genético de la Unidad de Genética Médica de la Universidad del Zulia, Maracaibo (UGM-LUZ) y de la consulta de Andrología de la Unidad de Endocrinología del Hospital Universitario de los Andes, Mérida (HULA). Para la realización de este trabajo, se contó con el consentimiento informado de los pacientes estudiados y la aprobación del comité de Bioética de la Unidad de Genética Médica de LUZ. Además, se les realizó historia clínica, donde se recolectaron los datos necesarios para participar en el estudio.

Se seleccionaron solo aquellos pacientes que cumplieron con los siguientes criterios de inclusión:

presencia de azoospermia, oligozoospermia severa, (menos de 5 millones de espermatozoides por mL eyaculado) y oligozoospermia moderada (5-20 millones de espermatozoides por mL eyaculado); ausencia de antecedentes médicos causativos de infertilidad masculina tales como problemas infecciosos seminales, varicocele, hipogonadismo hipogonadotrópico debido a lesiones en hipotálamo y/o hipófisis, radiaciones, factores ambientales, lesiones testiculares; ausencia de trastornos hormonales, específicamente disminución de niveles séricos de testosterona y aumento en los niveles de prolactina, deficiencia de las hormonas gonadotrópicas (FSH y LH) tales como síndrome de Kallmann, panhipopituitarismo; presencia de cariotipo normal 46,XY por técnica de alta resolución, con la finalidad de descartar alteraciones cromosómicas asociadas a infertilidad masculina; ausencia de varicocele sub-clínico y lesiones parenquimatosas detectadas por ecograma y biopsia testicular.

La azoospermia y oligozoospermia fueron definidas a través del análisis de semen. Éste análisis se realizó en dos ocasiones diferentes, con un intervalo de por lo menos tres semanas, seguidos de un periodo de tres días de abstinencia sexual. El análisis del semen incluyó: volumen, pH, concentración de espermatozoides, motilidad y morfología, siguiendo los lineamientos de la Organización Mundial de la Salud (22).

El ADN genómico fue obtenido a partir de leucocitos de sangre periférica usando métodos convencionales, como sigue: 4 mL de sangre periférica fueron colectados en un tubo con EDTA (500mM). Se realizaron 3 lavados con 8 mL de buffer de lisis (NH_4Cl 155mM, NaHCO_3 10mM, EDTA 0,1mM, pH 7,4), seguidamente se adicionó 20% de sarcosil y proteinasa K y se incubaron los glóbulos blancos a 50°C por toda la noche. Las proteínas fueron precipitadas con 5M de NaCl. Finalmente el ADN fue recolectado en 2 volúmenes de etanol al 99,5%, lavado con etanol al 70%, disuelto en Tris-EDTA 1x y guardado a 4°C hasta su uso. El ADN extraído de cada paciente fue preparado a una concentración de 100 ng/ μL .

La detección de las microdeleciones del cromosoma Y se basó en el uso de la Reacción en Cadena de la Polimerasa (RCP) múltiple, usando STSs (*Sequence target sites*) específicos del cromosoma Y.

El estuche que se utilizó (Promega Corporation Madison, WI, USA) estuvo constituido por 22 marcadores STSs, usados en el mapa de deleción (23). De este modo, fue posible determinar en cada paciente la presencia o ausencia de 22 regiones de ADN distribuidas a lo largo de Yq, luego de una RCP (Fig 1).

La RCP se realizó de la siguiente manera: A 20 μL de cada juego de iniciadores A, B, C, D y E fueron adicionados 2,5 μL del ADN genómico (100 ng/ μL). Estos iniciadores tenían integrado buffer (100 mmol/L: Tris-HCl pH 8,3, 500 mM KCl, 10 mmol/L

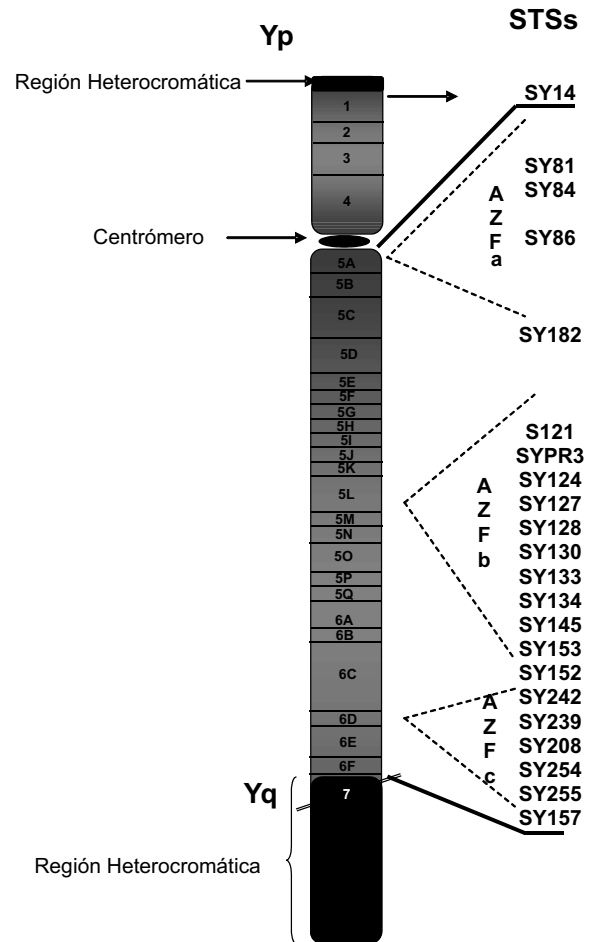


Fig. 1. Distribución de los STSs en el cromosoma Y.

de cada desoxi-NT y agua). La mezcla de reacción requirió de 5 UI de la enzima ADN Taq Polimerasa y fue ajustada a un volumen final de 25 μL . Esta técnica fue realizada en un termociclador Perkin Elmer Thermal Cycler 480 de acuerdo al siguiente programa:

Desnaturalización corta de 94°C por 1 minuto, alineamiento de los iniciadores a 58°C por 30 segundos, extensión de 72°C por 1 minuto en un total de 35 ciclos. El programa fue precedido por una desnaturalización prolongada a 94°C por 2 minutos y una extensión final de 72°C por 5 minutos.

Para cada RCP se incluyó una muestra de un hombre con fertilidad comprobada,

como testigo negativo para las microdeleciones, que también fue utilizada como testigo positivo para los STSs; adicionalmente se utilizó un testigo negativo de la RCP y un testigo interno que está incluido en el estuche de “Promega” denominado *SMCX* que representó un locus no específico del cromosoma X.

Los productos amplificados se separaron por electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2,5% en buffer Tris-EDTA-Borato 1 x.

Se utilizó como marcador de peso molecular el 174 digerido con Hae III. El gel se coloreó con una solución de 5 mg/mL de Bromuro de Etidio, se visualizó en un transiluminador de luz ultravioleta (Hoefler Mod. UVTM-25) y se tomó fotografía con película Polaroid instantánea 667. La muestra de un paciente fue considerada positiva para los marcadores STS, cuando el producto amplificado del tamaño esperado estuvo presente, y fue considerada negativa cuando el producto amplificado del tamaño esperado estuvo ausente después de tres RCP consecutivas.

RESULTADOS

A un total de 29 pacientes se les analizaron 22 loci AZF ubicados a lo largo de los intervalos de delección 5 y 6. Este análisis

reveló la presencia de microdeleciones en 1 de los 29 pacientes infértiles (3,4%). Los STSs ausentes en este paciente fueron los siguientes: sY242, sY239, sY208, sY254, sY255 y sY157 los cuales representan un fragmento de 984Pb correspondiente a la región completa de AZFc. Las deleciones observadas en este paciente son mostradas esquemáticamente en la Fig. 2. Se observó ausencia de todos los STSs ubicados en la región AZFc, con pérdida completa de esta región. Adicionalmente se observó la presencia del STS sY14 correspondiente al gen *SRY* y el testigo interno *SMCX* certificando la reproducibilidad de los resultados de la PCR. Estos hallazgos sugieren que las regiones AZFa y b estaban intactas en este paciente. La Fig. 3 muestra una corrida electroforética donde se observó microdelección del locus sY255, uno del total de STSs ausentes pertenecientes a la región AZFc en el paciente con microdeleciones.

El diagnóstico de biopsia testicular del paciente con microdeleciones del cromosoma Y reveló SCOS tipo I, lo que corrobora su azoospermia. No se encontraron microdeleciones en las 10 muestras testigo positivo para los STS, ni en las muestras de los pacientes con oligozoospermia severa y moderada.

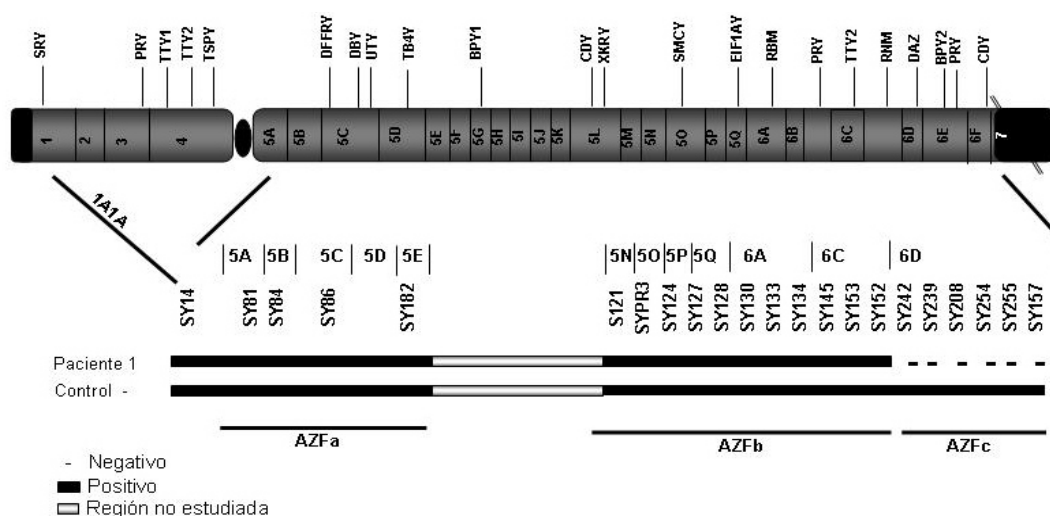


Fig. 2. Microdeleciones del cromosoma Y presentes en el paciente.

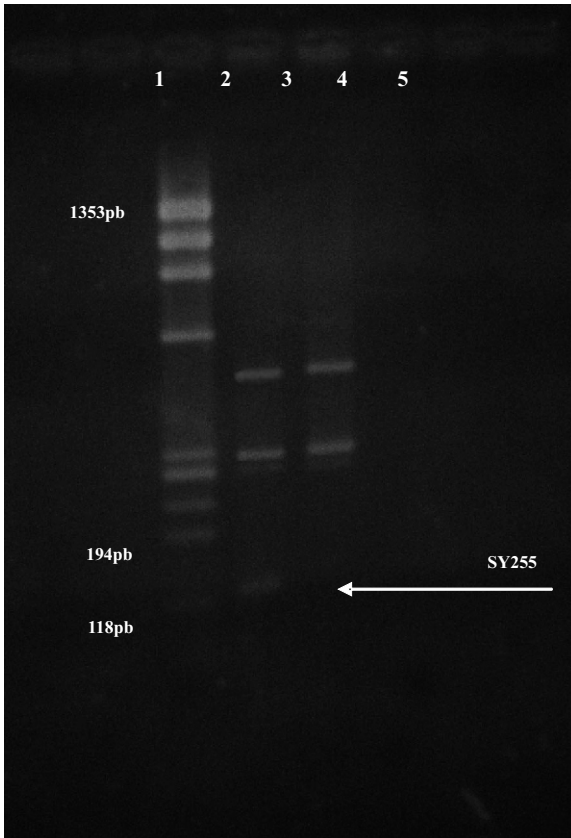


Fig. 3. Diagnóstico Molecular de las Microdeleciones del cromosoma Y. 1: MPM: Marcador de peso molecular 174 con Hae III. 2: Testigo positivo, 3: paciente N° 1, 4: Testigo negativo para los STS 5: Testigo negativo de la PCR.

DISCUSIÓN

La frecuencia de microdeleciones del cromosoma Y en nuestro estudio fue 3,4%, de acuerdo a la literatura los rangos de la prevalencia a nivel mundial de las microdeleciones del cromosoma Y en hombres con infertilidad varía entre el 1% (24) y el 55% (25). La frecuencia encontrada en este estudio se ubica dentro de este rango y es similar o mayor a la reportada por Alemania 3,2% (12/370) (26), 1,3% (19/1470) (27), Suecia 2% (4/192) (28), Países bajos y Bélgica 2,3% (37/1627) (29), Irlanda 3,6%

(2/56) (30) y Eslovenia 4,4% (9/226) entre otros (31). La variabilidad observada en la tasa de microdeleciones de Yq entre poblaciones étnicamente diferentes puede deberse a varios factores: diseño del estudio (criterios de inclusión, definición clínica de los pacientes), inconsistencia en el uso de los marcadores STSs entre los diferentes estudios y el grado por la cual otras mutaciones genéticas o fenómenos epigenéticos pueden conducir a azoospermia u oligozoospermia severa (32).

Es posible que las diferencias en la frecuencia de deleción y/o localización, entre los diversos estudios se deban al grado de susceptibilidad genética por otras mutaciones, que permitan reflejar diferencias geográficas o étnicas (33). En este último aspecto, en un mismo estudio se analizaron tres poblaciones de origen europeo y una de origen no europeo (Italia, Francia, Dinamarca e Irán), con un número similar de STSs, usando un criterio homogéneo para la definición de infertilidad idiopática y no idiopática (21). En ese trabajo, la frecuencia de deleción calculada para el total de la población comprendió un rango entre 1,5% y 10,8%. La mayor frecuencia fue encontrada en la población iraní 10,8% (5/46), seguida de la población francesa 10,6% (14/131), Dinamarca 6,5% (9/138), y por último la población italiana 1,5% (2/134). Sin embargo, se pudo notar que en ese estudio, las frecuencias más elevadas se observaron en las poblaciones que incluyeron mayor número de hombres azoospermicos (Irán y Francia). Por tal motivo, las diferencias y semejanzas observadas entre poblaciones tan distantes como éstas, pueden deberse principalmente a variaciones metodológicas y no a variaciones étnicas.

En el presente trabajo se realizó una selección estricta del grupo a estudiar, descartándose otras causas de infertilidad masculina. Probablemente la estricta selección y la distribución relativa entre pacientes

azoospermicos y oligozoospermicos sean factores que determinaron que la frecuencia observada en este estudio fuera similar a la del promedio mundial, a pesar que otros grupos de investigadores incluyeron como grupo de estudio pacientes étnicamente muy diferentes a nuestro grupo de estudio.

La pérdida de la región AZFc, hallada en un paciente de este estudio es consistente con lo reportado en la literatura, que indica la alta frecuencia de pérdida de AZFc comparada con las otras regiones AZF (34). La alta incidencia de microdeleciones en AZFc puede atribuirse a la presencia de múltiples secuencias repetitivas que hace de este intervalo un sitio propenso a microdeleciones (7).

Por otra parte, la biopsia testicular del paciente con microdeleciones en AZFc reveló la presencia SCOS. Aunque este trastorno se ha asociado más con microdeleciones en la región AZFa, el cuadro histológico asociado a microdeleciones AZFc es muy variado y puede incluir pacientes con este cuadro histológico testicular. Esto también se puede relacionar con el análisis seminal ya que aunque las microdeleciones de las regiones AZFa y AZFb se asocian más frecuentemente con azoospermia, la variabilidad observada por diferentes autores en el espermatograma indica que los pacientes con microdeleciones de la región AZFc pueden presentar azoospermia (1, 7, 8, 32) como se observó en nuestro paciente.

La herencia del cromosoma Y es de origen paterno y los hombres con microdeleciones parciales del cromosoma Y pueden tener hijos con similar defecto genético después de tratamientos con reproducción asistida (35). Por lo tanto, el análisis de las microdeleciones del cromosoma Y, debe implementarse especialmente en hombres con azoospermia no obstructiva y oligozoospermia severa, que serán sometidos a programas de reproducción asistida como una eta-

pa preliminar obligatoria, que defina de forma exacta, la etiología de la falla espermatogénica, la frecuencia y el sitio del o los genes delecionados.

AGRADECIMIENTO

Al Dr. Miguel Marrero representante de la empresa BIOCHROM por donarnos un estuche Promega Corporation Madison, WI, USA indispensable para el desarrollo de esta investigación.

REFERENCIAS

1. **World Health Organization**, WHO manual for the standardized investigation, diagnosis and management of the infertile male WHO. Cambridge: University Press; 2000.
2. **Krausz C, Rajpert E, Frydelund L, Quintana L, McElreavey K, Skakkeback N**. Double-blind Y chromosome microdeletions analysis in men with known sperm parameters and reproductive hormone profiles: microdeletions are specific for spermatogenic failure. *J Clin Endocrinol Metab* 2001; 86: 2638-2642.
3. **Nap A, Van G, Tuerlings J, Sutter D, Pieters M, Giltay J, Kastrop P, Braat D, Kremer J**. Reproductive decisions of men with microdeletions of the Y chromosome: The role of genetic counseling. *Hum Reprod* 1999; 14:2166-2169.
4. **De Kretser D, Baker H**. Infertility in men: recent advances and continuing controversies *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84: 3443-3450.
5. **Chandley A, Cooke H**. Human male fertility-Y linked genes and spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 1994; 3:1449-1452.
6. **Briton C, Haines C**. Microdeletions on the long arm of the Y chromosome and their association with male-factor infertility. *HKMJ* 2000; 6:185-189.
7. **Foresta C, Moro E, Ferlin A**. Y chromosome Microdeletions and alterations of Spermatogenesis. *Endocr Rev* 2001; 22:226-239.
8. **Foresta C, Moro E, Garolla A, Onisto M, Ferlin A**. Y chromosome Microdeletions in

- Cryptorchidism and idiopathic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 10:3660-3669.
9. **Chai N, Salido E, Yen P.** Multiple functional copies of the *RBM* gene family, a spermatogenesis candidate on the human Y chromosome. *Genomics* 1997; 45:355-361.
 10. **Ferlin A, Moro E, Rossi A, Dallapiccola B, Foresta C.** The human Y chromosome's azoospermia factor b (AZFb) region: sequence, structure, and deletion analysis in infertile men. *J Med Genet* 2003; 40:18-24.
 11. **Pryor J, Kent-First M, Muallen A, Andrew H, Bergen V, Wolfram E, Nolten M, Lorraine M, Kenneth P.** Microdeletions in the Y chromosome of Infertility Men. *N Engl J Med* 1997; 336:534-539.
 12. **Jaruzelska J, Korez A, Wojda A, Jedrzejczak P, Bierla J, Surmaes T, Paweslozyle L, Page D, Kotecki M.** Mosaicism for 45,X cell line may accentuate the severity of spermatogenic defects in men with AZFb deletion. *J Med Genet* 2001; 38:798-802.
 13. **Kamp C, Hirschmann P, Voss H, Huellen K, Vogt P.** Two long homologous retroviral sequence blocks in proximal Yq11 cause AZFa microdeletions as a result of intrachromosomal recombination events. *Hum Mol Genet* 2000; 9:2563-2572.
 14. **Kato H, Komori S, Nakata Y, Sakata K, Kanazawa R, Handa M, Kobayashi S, Koyama K, Isojima S.** Screening for deletions in interval D16-22 of the Y chromosome in azoospermic and oligozoospermic Japanese men. *J Hum Genet* 2001; 1:110-114.
 15. **Kayser M, Caglia A, Corach D, Fretwell N, Gehrig C, Graziosi G, Heidorn F, Herrmann S, Herzog B, Hidding M, Honda K, Jobling M, Krawczak M, Leim K, Meuser S, Meyer E, Oesterreich W, Parson W, Penacino G, Pérez A, Piccinina I, Prinz M, Schmitt C, Schneider P, Szibor R, Teifel J, Weichhold G, de Knijff P, Roewer L.** Evaluation Y-chromosomal STRs: a multicenter study. *Int J Legal Med* 1997; 110:125-133.
 16. **Raiecu F, Popa L, Pompilia A, Cimponeriu D, Letitia D, Ilinca E, Dracea L, Marincescu B, Gavrilă L.** Screening for microdeletions in human Y chromosome-AZF candidate genes and male infertility. *J Cell Mol Med* 2003; 1:43-48.
 17. **Krausz C, Quintana S, Barbaux S, Siffroi J, Rouba H, Delafontaine D, Souleyreau N, Arvis G, Antoine J, Erdei J, Taar P, Tar A, Jeandidier E, Plessis G, Bourgeron T, Dadoune P, Felous M, Mc Elreavey K.** A high frequency of Y chromosome deletion in male with non- idiopathic infertility. *J Clin Endocrinol Metab* 1999; 84:3606-3612.
 18. **Callejas M, Martinez G, Gallegos R, Ortiz L, Gomez G, Barrera H, Gutierrez A.** Y chromosome micro-deletion identification in infertile male. *Ginecol Obstr Mex* 2003; 71:25-31.
 19. **Chandley A, Cooke H.** Human male fertility-Y linked genes and spermatogenesis. *Hum Mol Genet* 1994; 3:1449-1452.
 20. **Chai N, Salido E, Yen P.** Multiple functional copies of the *RBM* gene family, a spermatogenesis candidate on the human Y chromosome. *Genomics* 1997; 45:355-361.
 21. **Krausz C, Forti G, McElreavey K.** The Y chromosome and male fertility and infertility. *Int J Androl* 2003; 26:70-75.
 22. **World Health Organization, WHO.** WHO laboratory manual for the examination of human semen and sperm-cervical mucus interaction. Cambridge: University Press; 1999
 23. **Vollrath D, Foote S, Hilton A Brown LG, Beer-Romero P, Bogan JS, Page DC.** The human Y chromosome: a 43-interval map based on naturally occurring deletions. *Science* 1992; 258:52-59.
 24. **Van der Ven K, Montang M, Leygraaf J, Schwanitz G, Haidi G, Krebs D, Van der Ven H.** Combined cytogenetic and Y chromosome microdeletion screening in males undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Mol Hum Reprod* 1997; 3:699-704.
 25. **Foresta C, Ferlin A, Garolla A, Moro E, Pistorello M, Barbaux S, Rossato M.** High frequency of well-defined Y-chromosome deletions in idiopathic Sertoli cell-only syndrome. *Hum Reprod* 1998; 13:302-307.

26. **Vogt PH, Edelman a, Kirsch S, Henegariu O, Hirschmann P, Kiesewetter F, Kohn F, Schill W, Farah S, Ramos C, Hartmann M Hartschuh W, Meschede D, Behre M, Castel A, Nieschlag E, Weidner W, Grone H, Jung A, Engel W, Haidl G.** Human Y chromosome azoospermia factors (AZF) mapped to different subregions in Yq11. *Hum Mol Genet* 1996; 5:933-943.
27. **Maurer B, Gromoll J, Simoni M, Nieschlag E.** Prevalence of Y chromosome microdeletions in infertility men who consulted a tertiary care medical center: Munster experience. *Andrology* 2001; 33:27-33.
28. **Osterlund C, Segerteen E, Arver S, Pousette A.** Low number of Y-chromosome deletions in infertile azoospermic men at a Swedish andrology centre. *Int J Androl* 2000; 23:225-229.
29. **Nap A, Van G, Tuerlings J, Sutter D, Pieters M, Giltay J, Kastrop P, Braat D, Kremer J.** Reproductive decisions of men with microdeletions of the Y chromosome: The role of genetic counseling. *Hum Reprod* 1999; 14:2166-2169.
30. **Friel A, Houghton JA, Maher M, Smith T, Noel S, Nolan A, Egan D, Glennon M.** Molecular detection of Y chromosome microdeletions: an Irish study. *Int J Androl*. 2001; 24:31-36.
31. **Peterlin B, Kunej T, Sinkovec J, Gligorievska N, Zorn B.** Screening for Y chromosome microdeletions in 226 Slovenian subfertile men. *Hum Reprod* 2002; 17:17-24.
32. **Madgar I, Green L, Ken-First M, Weissenberg R, Gershoni R, Goldman B, Friedman E.** Genotyping of Israeli infertile men with idiopathic oligozoospermia. *Clin Genet* 2002; 62: 203-207.
33. **McElreavey K, Krausz C.** Male Infertile and the Y chromosome *Am J Genet* 1999; 64:928-923.
34. **Fernandez S, Paracchini S, Meyer H, Florida G Tyler C, Vogt P.** A large AZFc deletion removes *DAZ3/DAZ4* and nearby genes from men in haplogroup N. *Am J Hum Genet* 2004; 74:180-187.
35. **Mittal R, Singh G, Srivastava A, Pradhan M, Kesari A, Makker A, Mittal B.** Y chromosome micro-deletions in idiopathic infertility from Northern India. *Annales de Genetique* 2004; 47:331-337.