

BAB II

TINJAUAN PUSTAKA

II.1 EPIDEMIOLOGI HIPOSPADIA

Hipospadia adalah malformasi yang umum terjadi di saluran genital laki-laki yang ditunjukkan dengan muara uretra yang abnormal dimana lokasi muara uretra/ostium uretra eksternum (OUE) dapat berada di bagian anterior (glandular, coronal, dan distal penile), bagian pertengahan, atau bagian posterior (penoscrotal, scrotal, perineal) dengan derajat kurvatura penis yang berbeda.²¹

Insiden malformasi ini bervariasi di seluruh dunia dan memiliki kecenderungan yang meningkat setiap tahun.^{1,2,21} Hipospadia mengenai sekitar 1:250 sampai 1:125 kelahiran bayi laki-laki di Amerika Serikat.^{3,22} Sumber lain menyebutkan bahwa kelainan ini mengenai 30-40 anak per 10.000 kelahiran bayi laki-laki. Kelainan ini cenderung terjadi pada ras Kaukasia dibanding non Kaukasia.¹ Sebuah studi di Asia menyebutkan bahwa 27 (0.41%) bayi baru lahir dari 6538 kelahiran bayi laki-laki memiliki hipospadia.²³ Insiden ini meningkat dari 2.85 per seribu di tahun 1999 sampai 6.89 per seribu di tahun 2005.²³ Sedangkan prevalensi malformasi ini di Cina sekitar 5,8 per 10.000 kelahiran bayi laki-laki dan cenderung meningkat.⁵

II.2 DIAGNOSIS DAN KLASIFIKASI HIPOSPADIA

Klasifikasi hipospadia berdasarkan pada lokasi muara uretra. Klasifikasi yang paling umum dipublikasikan adalah dari Duckett tahun 1996 sebagaimana diperlihatkan pada gambar II.1. Duckett membagi hipospadia kedalam: (1) Anterior sebanyak 50% dengan 3 subtipe, yaitu glandular, sub coronal, dan distal penile, (2) Pertengahan sebanyak 30% dengan 2 subtipe, yaitu mid shaft dan proximal penile, dan (3) Posterior sebanyak 20% dengan 3 subtipe, yaitu penoscrotal, scrotal, dan perineal.^{24,25}

Hipospadia dapat muncul dalam bentuk *isolated* dimana hipospadia adalah satu-satunya defek/kelainan tanpa disertai simptom lain. Bila hipospadia muncul bersamaan dengan malformasi lain baik di traktus reproduksi maupun jauh dari sistem reproduksi, maka ia disebut sebagai hipospadia sindromik, contohnya Reinfenstein, sindrom Wolf-Hirschhorn, de-lange, sindrom Fraser, dan sindrom Smith Lemli Opitz.²⁶

Smith 1938	Schaefer 1950	Avellan 1975		Browne 1938	Duckett 1996	Hadidi 2004	
1st degree	Glanular	Glanular		Glanular	Anterior	Glanular	
				Sub-coronal			Sub-coronal
				Distal penile	Distal penile		
2nd degree	Penile	Penile		Mid shaft	Mid shaft	Middle	
				Proximal penile	Proximal penile		
3rd degree	Perineal	Penoperineal		Penoscrotal	Penoscrotal	Posterior	Proximal
		Perineal		Midscrotal	Scrotal		
		Perineal w/o Bulb		Perineal	Perineal		

Gambar II.1. Beragam klasifikasi berdasarkan lokasi muara uretra.²⁴

II.3 FAKTOR RISIKO HIPOSPADIA

Sampai saat ini, etiologi dari hipospadia masih belum diketahui. Kelainan ini dianggap sebagai suatu penyakit multifaktorial dimana beberapa faktor risiko berperan dalam perkembangan penyakit ini. Faktor risiko-faktor risiko berikut ini dianggap mempengaruhi terjadinya hipospadia:

1. Faktor Genetik

Terdapat kecenderungan *familial clustering* pada hipospadia, dimana kerabat laki-laki dengan hipospadia memiliki kecenderungan terjadi kelainan yang sama. Penelitian oleh Sorensen (1953) menyatakan bahwa 28% dari 103 kasus dengan hipospadia non-sindromik memiliki paling tidak satu anggota keluarga dengan hipospadia. Semakin berat hipospadia, semakin tinggi insidennya pada kerabat derajat pertama "first-degree".¹ Risiko berulangnya kelainan ini pada saudara laki-laki adalah sebesar 12% sampai 14% atau 15% dan sekitar 7% sampai 9% risiko penurunan ke anak laki-laki.^{1,27} Banyak peneliti mencari tahu kandidat gen yang mungkin menjadi etiologi dari hipospadia. Terdapat beberapa gen yang dipercaya terlibat dalam terjadinya hipospadia antara lain gen *activating transcription factor 3 (ATF 3)*, *steroid 5-alpha reductase type 2 (SRD5A2)*, *17-β hydroxysteroid dehydrogenase (HSD17B3)*, gen *androgen receptor (AR-gene)*, dan gen-gen lain yang diusulkan seperti gen *homeobox (Hoxa-13)*, *fibroblast growth factor (Fgf-10)*, *sonic hedgehog (Shh)*.²⁸

2. Faktor Endokrin

Perkembangan genitalia eksterna laki-laki memerlukan proses yang kompleks. Defek pada sintesis hormon androgen karena defek pada gen hingga produksi yang inadekuat atau karena adanya *endocrine disruptor* dapat menyebabkan terjadinya hipospadia.^{29,30}

3. Faktor Lingkungan

Faktor lingkungan memiliki kemungkinan mengganggu sistem endokrin baik laki-laki maupun wanita. Banyak studi mengusulkan bahwa paparan *Endocrine Disrupting Chemicals* (EDC) menyebabkan hipospadia karena hormon sex berperan besar dalam perkembangan genital selama masa fetus. Bahan kimia EDC tersebut dapat berperan sebagai zat estrogenik maupun antiandrogenik.³¹ Salah satu contoh dari bahan kimia EDC adalah zat yang terkandung dalam herbisida, fungisida, insektisida, dan produk industri dan produk akhirnya (seperti plastik, kosmetik, cat, dan sebagainya).²⁷ Suatu studi kasus-kontrol di Inggris Tenggara menemukan bahwa penggunaan *insect repellent* / obat pembasmi serangga (termasuk didalamnya obat nyamuk) memperlihatkan hubungan yang signifikan secara statistik dengan risiko hipospadia (OR: 1.76, 95% CI 1.08-2.86).³² Zat polutan tersebut masuk ke dalam tubuh melalui makanan, inhalasi, absorpsi atau bahkan bisa melewati plasenta.²⁷ Satu studi menyatakan bahwa paparan pestisida pada ibu hamil meningkatkan 36% risiko terjadinya hipospadia, sedangkan paparan pestisida pada ayah terkait dengan 19% peningkatan risiko hipospadia.³³

4. Lain-lain

Faktor risiko dari ibu seperti usia ibu yang tua dikaitkan dengan peningkatan hipospadia hingga 20% serta peningkatan 50% hipospadia berat lahir dari ibu yang berusia >35 tahun.³⁴ Karakteristik kehamilan seperti BBLR (berat bayi lahir rendah), kehamilan kembar, persalinan prematur (<37 minggu usia kehamilan) serta primiparitas juga dikaitkan dengan hipospadia.^{3,35,36} BBLR sering dialami pada ibu dengan kehamilan kembar yang menandakan terdapatnya insufisiensi plasenta dalam menyediakan nutrisi dan gonadotropin bagi janin.^{3,35} Suatu studi menyatakan bahwa kehamilan kembar dan BBLR (<2500 g) terkait dengan hipospadia dengan masing-masing rasio odds (OR= 2.5; 95%CI:1.1-6.1) dan (OR= 2.3 ; 95% CI:1.2-4.2), berturut-turut.³ Selain itu penggunaan progestin dan derivatnya selama awal kehamilan maupun untuk mencegah komplikasi atau keguguran selama kehamilan meningkatkan risiko hipospadia derajat dua dan tiga dengan *crude* OR 3,7.³⁷ Faktor risiko lain seperti ayah merokok masih menjadi kontroversi. Ayah merokok sebelum kehamilan dikaitkan dengan hipospadia karena dianggap mengurangi produksi sperma, mengganggu motilitas sperma, dan morfologinya.³⁸

II.4 PERAN GENETIK DALAM HIPOSPADIA

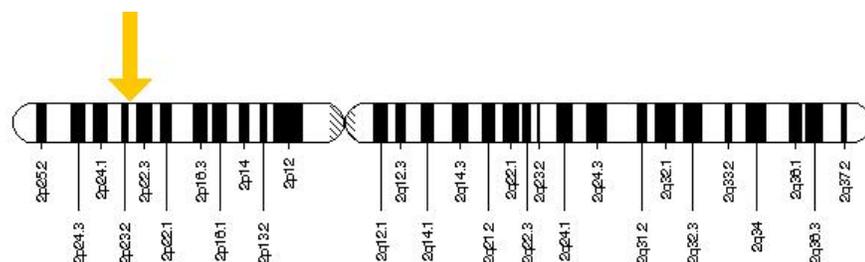
Perkembangan genitalia eksterna laki-laki terbagi dalam 2 fase, fase *early hormone-independent* dan fase diferensiasi seksual *late hormone-dependent*.⁶ Terdapat beberapa gen yang terlibat dalam proses ini. Pada sekitar 5-8 minggu umur

kehamilan merupakan fase *early hormone-independent*, genitalia eksterna laki-laki maupun perempuan masih belum dapat dibedakan. Tuberkel genital masih identik pada kedua jenis kelamin. Beragam gen seperti *Shh*, *FGFs*, *Bmps*, homeobox (*Hox*), dan *Wnt/b-catenin* terlibat dalam pertumbuhan dan diferensiasi tuberkulum genitalia. Pada fase diferensiasi seksual *late hormone-dependent* (8-20 minggu umur kehamilan), *human chorionic gonadotropin* (hCG) plasenta menstimulasi sel-sel Leydig pada testis fetus untuk memproduksi testosteron. Dalam sel-sel Leydig, *17 β -hydroxysteroid dehydrogenase* (HSD17B3) mengkatalisis perubahan androstenedione menjadi testosteron. Steroid 5- α reductase (SRD5A2) kemudian merubah testosteron (T) menjadi dihidrotestosteron (DHT) yang lebih poten. Kedua hormon tersebut (T dan DHT) berikatan dengan reseptor androgen (AR) pada jaringan genital target. Testosteron menginduksi diferensiasi duktus Wolffii untuk menjadi epididimis, vas deferens, vesikula seminalis, sedangkan DHT memodulasi diferensiasi menjadi prostat, penis, dan scrotum. Terdapat beberapa gen yang berperan penting dalam fase *late-hormone dependent* ini. Mereka adalah gen-gen terkait androgen (*AR*, *SRD5A2*, *HSD17B3*, *FKBP52*, *MAMLD1/XCorf6*) dan gen-gen terkait estrogen (*ESR*, *ATF3*). Terganggunya gen-gen tersebut dapat mempengaruhi terjadinya hipospadia.^{6,29}

II.5 GEN *SRD5A2* DAN HIPOSPADIA

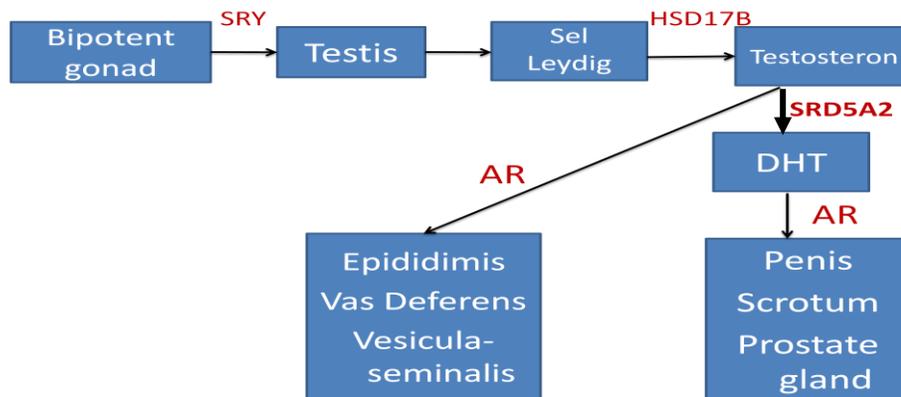
Gen *SRD5A2* berlokasi di lengan pendek kromosom 2 (2p23) dan memiliki panjang susunan basa lebih dari 40 kb (4278 pasangan basa). Gambar II.2

memperlihatkan peta lokasi gen *SRD5A2* pada kromosom 2. Gen ini tersusun dari 5 ekson dan 4 intron dan mengkode protein steroid 5-alpha reductase tipe II yang terdiri dari 254 asam amino yang banyak diekspresikan di jaringan yang sensitif androgen seperti jaringan prostat. Protein yang dikode memiliki suatu domain *testosterone binding* dan juga domain *NADPH cofactor-binding* di regio N-terminal. Mutasi yang mempengaruhi regio *testosterone-binding* terletak baik di ekson 1 maupun 5, sementara mutasi yang mempengaruhi *NADPH-binding* lebih beragam dan umumnya dipetakan antara ekson 3 dan 4.³⁹ Produk protein gen tersebut berfungsi sebagai salah satu isoenzim dari 5-alpha reductase yang mengubah testosterone menjadi dihidrotestosteron dalam metabolisme steroid.⁷ Polimorfisme pada gen ini dikaitkan dengan meningkatnya risiko hipospadia.¹⁰⁻¹²



Gambar II.2. Peta lokasi gen *SRD5A2* pada kromosom 2.

Mekanisme gen *SRD5A2* bisa berkontribusi terhadap terjadinya hipospadia terkait dengan gen-gen yang berperan dalam perkembangan genitalia laki-laki. Skema gambar II.3 memperlihatkan gen-gen yang berperan dalam perkembangan genitalia eksterna termasuk didalamnya gen *SRD5A2*.



Gambar II.3. Gambar skema gen-gen yang berperan dalam perkembangan genitalia laki-laki.²⁹

II.6 POLIMORFISME GEN *SRD5A2*

Diantara beberapa polimorfisme gen *SRD5A2*, polimorfisme pada nukleotida 265 atau codon 89 adalah polimorfisme yang memiliki hubungan signifikan dengan hipospadia di beberapa studi di Asia.^{7,12,29} Penelitian di India menyatakan bahwa polimorfisme 265 G>C atau V89L merupakan penentu kuat terjadinya hipospadia di suku asli India dengan OR 2,4, 95% CI 1,2-4,6, $p < 0,05$.¹²

Polimorfisme V89L terletak pada ekson 1 namun mekanisme polimorfisme tersebut dengan terjadinya hipospadia belum jelas diketahui. Polimorfisme V89L merupakan suatu mutasi *missense* dimana nukleotida G berubah menjadi C pada nukleotida 265 yang menyebabkan perubahan asam amino valin menjadi leusin.¹⁴ Dari penelitian sebelumnya mengenai polimorfisme V89L memperlihatkan bahwa polimorfisme ini berhubungan dengan perubahan aktivitas enzim 5α -reductase *in vivo*, dimana alel V89 secara substansial mengkode aktivitas enzim yang lebih tinggi dibanding L89 karena homozigot valin (VV) memiliki sekitar 30% level serum AAG

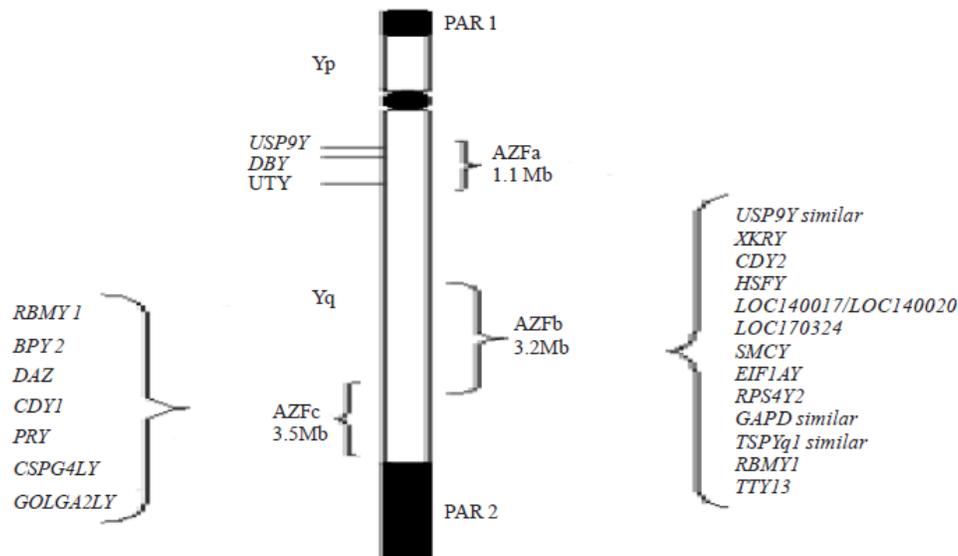
atau 5 α -androstane-3 α ,17 β -diol-17 β -glucoronide (suatu metabolit DHT yang digunakan untuk mengukur aktivitas 5 α - reductase) yang lebih tinggi dibanding homozigot LL.¹⁴

Pada populasi Jepang, MAF di kelompok kontrol SNP ini adalah 44%.¹³ Studi pada kelompok kontrol ras Kaukasia menunjukkan frekuensi alel valin (V) dan leusin (L) berturut turut adalah 0,71 dan 0,29.⁴⁰ Pada suatu studi meta-analisis, varian alel L lebih tinggi di orang-orang Asia (46,9%) dibanding orang kulit putih (37,5%) atau orang kulit hitam (33,5%) dan prevalensi alel homozigot LL juga lebih tinggi pada orang-orang Asia (22,6%) diikuti orang kulit putih (17,1%) dan orang kulit hitam (9,9%).¹⁵

II.7 GEN *AZF* DAN *SRY*

Gen *AZF* adalah gen yang terletak pada kromosom Y lengan panjang regio 1 band 1 (Yq11). Gen ini memiliki 3 subregio yang dipetakan yaitu *AZFa*, *AZFb*, *AZFc*.⁴¹ Ketiga regio ini berkaitan dengan infertilitas pada pria. Peta lokasi ketiga regio *AZF* dapat dilihat pada gambar II.3. *AZFa* terletak paling proksimal pada Yq11, diikuti *AZFb*, lalu *AZFc*.^{18,41,42}

Lokus *AZFa* berlokasi di porsi proksimal delesi interval 5 (subinterval 5C).⁴¹ Regio *AZFa* memiliki *span* sekitar 800 kb.⁴³ Delesi pada regio ini selalu dikaitkan dengan SCOS (*Sertoli cell-only syndrome*), suatu kondisi dimana sel sertoli dalam testis normal namun sedikit atau tidak adanya spermatozoa dalam ejakulat dan merupakan suatu kejadian yang langka, sekitar kurang dari 5% dari delesi *AZF* yang



Gambar II.4. Skema kromosom Y yang memperlihatkan ketiga regio AZF dan gen-gen yang berada di dalamnya.⁴¹

dilaporkan.^{44,45} Peran gen ini secara tepat dalam proses spermatogenesis belum sepenuhnya diketahui. Gen-gen yang terdapat dalam regio ini antara lain *USP9Y*, *DBY*, dan *UTY*. *DBY* adalah gen utama yang terletak di regio *AZFa* yang mungkin memiliki peran dalam infertilitas karena lokasinya dalam testis dan berperan dalam perkembangan premeiotik sel germinal.⁴⁶ *USP9Y* juga terlibat dalam spermatogenesis. Namun tampaknya *DBY* lebih memiliki peran penting dibanding *USP9Y* dalam spermatogenesis.¹⁸

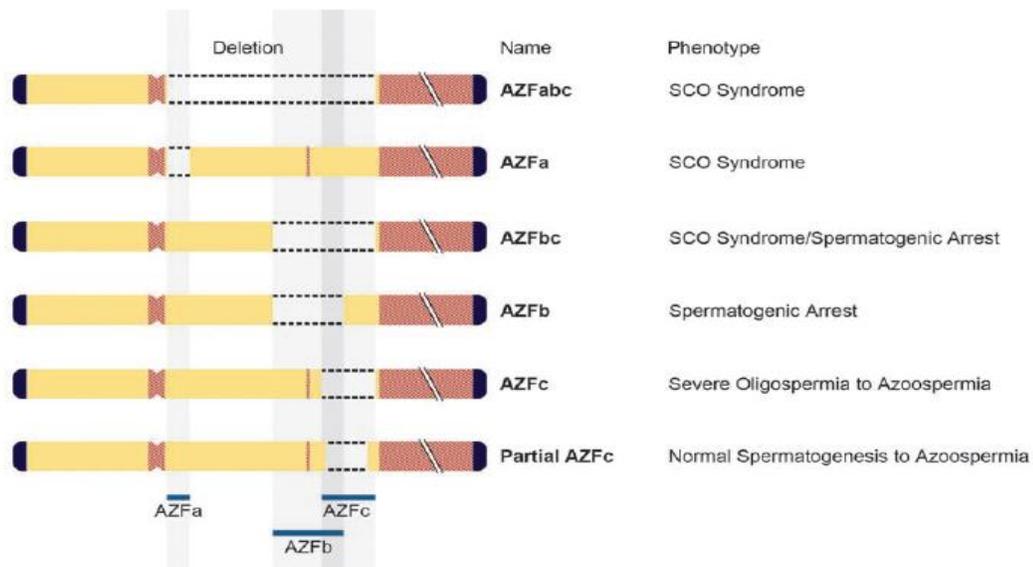
Regio *AZFb* berlokasi di antara subinterval 5M sampai 6B yang memiliki panjang basa sekitar 3,2 Mb dan tersusun atas beberapa gen yang berfungsi dalam spermatogenesis normal. Gen utama dalam regio *AZFb* adalah *RBMY*.⁴⁷ *RBMY1*

mengkode suatu protein *binding* RNA yang merupakan faktor *splicing* spesifik testis yang diekspresikan dalam nukleus spermatogonia, spermatosit, dan spermatid.⁴⁶ Pada suatu studi, ekspresi *RBMY1* berkurang pada laki-laki azoospermi. Selain *RBMY*, *PRY* adalah gen yang terlibat dalam regulasi apoptosis, suatu proses penting yang menyingkirkan sperma abnormal dari populasi spermatozoa.⁴⁶ *RBMY* dan *PRY* merupakan gen utama yang terlibat dalam fertilitas pada regio *AZFb*.²⁰ *HSFY* merupakan gen baru yang dipetakan berada di regio *AZFb* dilaporkan bahwa delesinya menyebabkan infertilitas berat pada pria.⁴⁸

Regio *AZFc* berada di distal kromosom Y dan memiliki panjang basa sekitar 3,5 Mb yang tersusun atas 7 keluarga gen yang kesemuanya dianggap penting dalam spermatogenesis normal. Gen *DAZ* pada regio *AZFc* yang merupakan keluarga gen kandidat terpenting dan dianggap memiliki peran yang beragam dalam proses spermatogenik karena dia diekspresikan pada semua stadium perkembangan sel germinal.⁴⁹ Gen ini mengatur translasi, mengkode protein *binding* RNA spesifik sel germinal dan terlibat dalam kontrol meiosis dan mempertahankan populasi sel germinal primordial.⁵⁰ Delesi pada gen *DAZ* memberikan spektrum fenotip yang berkisar dari oligozoospermia hingga azoospermia.⁵⁰

Mikrodelesi kromosom Y merupakan abnormalitas struktur yang paling sering ditemukan pada *male-specific region* kromosom Y. Mikrodelesi ini terjadi pada 5% sampai 10% laki-laki infertil. Secara khusus, 2% - 3% pada kandidat ICSI, 6% - 16% laki-laki azoospermia, 4% - 5,8% dengan oligospermia berat.⁵¹ Mikrodelesi yang paling banyak adalah regio *AZFc* (60%) diikuti *AZFb* 16% dan *AZFa* 5%. Juga

ditemukan delesi pada lebih dari satu regio yang kebanyakan melibatkan *AZFc*. Tipe mikrodelesi *AZF* dan dampak fenotipnya dapat dilihat pada gambar II.4.



Gambar II.5. Enam tipe mikrodelesi *AZF* dan dampak fenotipnya. Pola delesi yang paling umum *AZFc* dan sebagian *AZFc*. Delesi parsial *AZFc* memiliki beberapa bentuk dengan fenotip yang berbeda di tiap populasi. Parsial *AZFa* dan *AZFb* adalah kondisi lain yang jarang. SCO= Sertoli cell-only.⁵¹

Sedangkan gen *SRY* berlokasi di bagian distal kromosom Y lengan pendek (Yp11.31). Mekanisme diferensiasi organ kelamin laki-laki normal diawali stimulus gen ini. *SRY* menstimulus perkembangan sel-sel germinal primordial menjadi testis. Gen *SRY* memberikan instruksi untuk membuat faktor transkripsi yang disebut protein *SRY* yang berikatan dengan regio spesifik dari DNA dan membantu mengontrol aktivitas gen-gen tertentu. Adanya protein *SRY* menyebabkan fetus berkembang menjadi laki-laki. Sekitar 10-15% pasien dengan 46,XY gonadal

disgenesis (sindrom Swyer) memiliki mutasi pada satu ekson pada gen ini.^{52,53} Gen *SRY* juga dikaitkan dengan 46, XX Testicular DSD (*Disorder of Sex Development*) dimana *SRY* mengalami translokasi di kromosom X yang menyebabkan seorang 46,XX berfenotip laki-laki.⁵⁴

Skrining mutasi gen *AZF* dan *SRY* saat ini merupakan suatu prosedur skrining mikrolelesi pada kromosom Y yang sudah menggunakan standar internasional. Metode PCR multipleks direkomendasikan untuk diagnosis mikrolelesi kromosom Y dengan menyertakan gen *ZFY* dan *ZFX* sebagai kontrol internal. Sebagai kontrol negatif dalam setiap running digunakan DNA laki-laki normal dan DNA perempuan. Multiplek PCR merupakan variasi dari PCR dimana dua atau lebih target sekuens dapat diamplifikasi dengan memasukan lebih dari satu pasang set primer kedalam reaksi yang sama.⁵⁵ Sedangkan STS (*sequence tagged site*) adalah suatu regio pendek dalam genome (200-300 bp) dimana urutan sekuensnya tidak dapat ditemukan di tempat lain dalam genome. STS dapat mengandung sekuens elemen repetitif yang muncul di tempat lain dalam genome namun selama sekuens pada kedua ujung *site* adalah unik, kita dapat mensintesis primer DNA yang komplementer dengan ujung *site* tersebut.⁵⁶ Selain itu, gen *SRY* juga harus dimasukkan dalam analisis sebagai suatu kontrol *testis-determining factor* pada kromosom Y lengan pendek dan sebagai tanda adanya sekuens *Y-specific* bila gen *ZFY* tidak ada (yaitu pada *XX males*).⁵⁷

Skrining mikrolelesi ini merupakan alat diagnostik yang bermanfaat untuk mengidentifikasi pasien dan memberikan manajemen yang tepat bagi pasien laki-laki infertil. Prognosis fenotip berdasarkan pada pola mikrolelesi kromosom Y lebih

bersifat subjektif dan *inconclusive* walaupun terdapat hubungan sebab-akibat antara mikrodelesis kromosom Y dengan infertilitas laki-laki.⁵⁸

II.8 KONSELING GENETIK PADA PASIEN HIPOSPADIA

Diagnosis hipospadia pada bayi baru lahir tidak serta merta langsung dikenali, perlu pemeriksaan seksama dari dokter maupun bidan sebagai penolong persalinan. Hipospadia berat seringkali menyulitkan penolong persalinan dalam menentukan jenis kelamin si bayi. Dalam hal ini pemeriksaan kromosom untuk menentukan jenis kelamin perlu dilakukan. Selain itu dari pemeriksaan kromosom ini dapat terdeteksi kelainan lain yang mungkin terkait. Orang tua bayi perlu mendapatkan informasi yang jelas perihal kelainan yang dialami anaknya. Beberapa informasi yang perlu diperoleh orang tua bayi antara lain kepastian jenis kelamin anaknya (perlu dilakukan karyotiping), jenis kelainan yang dialami anaknya (dalam hal ini adalah kelainan muara kencing yang tidak normal), penyebab terjadinya kelainan tersebut dan faktor-faktor apa saja yang mempengaruhi. Angka insiden kelainan hipospadia di dunia pada umumnya maupun di Indonesia dapat diberikan dengan tujuan meningkatkan kesadaran orang tua akan kelainan ini dan menumbuhkan optimisme untuk mencari pertolongan. Walaupun kelainan hipospadia dapat diperbaiki dengan pembedahan namun orang tua perlu tahu bahwa tidak semua pembedahan berakhir sesuai harapan. Kesulitan-kesulitan pasien hipospadia post-operasi biasanya dialami setelah mereka dewasa seperti kesulitan pengosongan urin, fungsi seksual, kepercayaan diri dan masalah psikoseksual.⁵⁹

-
- ²¹ Wang Ming, Baskin LS. Endocrine Disruptors, Genital Development, and Hypospadias. *Journal of Andrology*. 2008; 29(5):499-504.
- ²² Baskin LS, Himes K, Colborn T. Hypospadias and Endocrine Disruption : Is there a Connection ? *Environmental Health Perspectives*[serial online]. 2001[cited 2010january 14] ; 109(11):1175-1183. Available from : <http://ehis.niehs.nih.gov/>
- ²³ Chong JH, Wee CK, Ho SK, Chan DK. Factors associated with hypospadias in Asian newborn babies. *J Perinatal Med*. 2006; 34(6):497-500.
- ²⁴ Hadidi AT. Hypospadias surgery. Paper presented at: The International Workshop on Hypospadias Surgery; Vienna, Austria. 2006.
- ²⁵ Troncoso B, Lopez PJ. Hypospadias. *Pediatric Urology Book* [Internet]. [Cited 2013 Dec 15]. Available from: <http://www.pediatricurologybook.com/hypospadias.html>
- ²⁶ Leung AKC, Robson WLM. Hypospadias:an update. *Asian Journal of Andrology*. 2007;9:16-22
- ²⁷ Kalfa N, Philibert P, Sultan C. Is hypospadias a genetic, endocrine or environmental disease, or still an unexplained malformation? *International Journal of Andrology*. 2008;32:187-197
- ²⁸ Willingham E, Baskin LS. Candidate genes and their response to environmental agent In the etiology of hypospadias. *Nature Clinical Practise Urology*. 2007 ; 4(5): 270-279
- ²⁹ Thai hanh TT. Hypospadias : Gene mapping and candidate Gene Studies. Department of Women's and Children's Health.[PhD dissertation]. Karolinska Institutet. 2009 [Cited 2013 Dec 20].
- ³⁰ Meireles AB, Kockum I, Lundberg F, Soderhall C, Nordenskjold A . Risk factors for hypospadias in the estrogen receptor 2 gene. *JCEM endojournals*. 2007; 92(9):3712-3718
- ³¹ Carbone P, Giordano F, Nori F, Mantovani A, Taruscio D, Laurias L, et al. The possible role of endocrine disrupting chemicals in the aetiology of cryptorchidism and hypospadias: a population-based case-control study in rural Sicily. *International Journal of Andrology*. 2007; (30):3-13
- ³² Dugas J, Nieuwenhuijsen MJ, Martinez D, Iszatt N, Elliott P. Use of biocides and insect repellent and risk of hypospadias. *Occup Environ Med* 2010;67:196-200
- ³³ Rocheleau CM, Romitti PA, Dennis LK . Pesticides and hypospadias: a meta-analysis. *Journal of Pediatric Urology*. 2009 ; 5 : 17-24
- ³⁴ Fisch H, Golden RJ, Libersen GL, Hyun GS, Madsen P, New MI, Hensle TW. Maternal Age as a Risk Factor For Hypospadias. *J Urol*. 2001. 165(3):934-936.
- ³⁵ Hussain N, Chaghtai A, Herndon A, Herson VC, Rosenkrantz TS, McKenna PH . Hypospadias and early gestation growth restriction in infants. *Official Journal of The American Academy of Pediatrics*. 2002; 109:473-478.
- ³⁶ Porter MP, Faizan MK, Grady RW, Mueller BA. Hypospadias in Washington State: Maternal Risk Factors and Prevalence Trends. *Pediatrics*. 2005. 115(4). 495-499.
- ³⁷ Charmichael SL, Shaw GM, Laurent C, Croughan MS, Olney RS, Lammer EJ: Maternal Progestin Intake and Risk of Hypospadias. *Arch Pediatr Adolesc Med*. 2005. 159(10):957-962.
- ³⁸ Pasqualotto FF, Lucon AM, Sobreiro BP, Pasqualotto EB, Arap S. Effects of medical therapy, alcohol, smoking, and endocrine disruptors on male infertility. *Rev.Hosp. Clín. Fac. Med. S. Paulo*. 2004;59(6):375-382.
- ³⁹ deCalais FL, Soardi FC, Petroli RJ, Gori Lusa AL, de Paiva e Silva RB, Maciel-Guerra AT, et al. Molecular Diagnosis of 5 α -Reductase type II deficiency in Brazilian sibling with 46,XY Disorder of Sex Development. *Int J.Mol.Sci*. 2011;12: 9471-9480
- ⁴⁰ Thai H, Kalbasi M, Lagerstedt K, Frisen L, Kockum I, Nordenskjold A. The Valine allele of the V89L polymorphism in the five-alpha reductase gene confers a reduced risk for hypospadias. *Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2005;90:6695-6698.
- ⁴¹ Vineeth VS, Mallini SS. A Journey of Y chromosomal genes and male infertility. *Int J Hum Genet*. 2011;11(4):203-215.
- ⁴² Layman LC. Human gene mutations causing infertility. *J Med Genet*. 2002;39:153-161.

-
- ⁴³ Foresta C, Moro E, Ferlin A. Prognostic value of Y deletion Analysis. *Hum Reprod.* 2001;16(8):1543-7.
- ⁴⁴ C. Kamp, K. Huellen, and K. Huellen. High deletion frequency of the complete AZFa sequence in men with Sertoli-cell-only syndrome. *Molecular Human Reproduction.* 2001; 7(10): 987–994.
- ⁴⁵ Costa PN, Plancha CE, Goncalves J. Genetic Dissection of the AZF region of the human Y chromosome: Thriller or filler for male (in)fertility?. *Journal of Biomedicine and Biotechnology.* 2010: 1-18. [Available from : <http://dx.doi.org/10.1155/2010/936569>]
- ⁴⁶ Vogt PH. Azoospermia factor (AZF) in Yq11: towards a molecular understanding of its function for human male fertility and spermatogenesis. *Reprod Biomed Online* 2005;10:81–93.
- ⁴⁷ 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.
- ⁴⁸ Tessari A, Salata E, Ferlin A, Bartolini L, Slongo ML, Foresta C. Characterization of HSFY, a novel AZFb gene on the Y chromosome with possible role in human spermatogenesis. *Mol Hum Reprod.* 2004;10(4):253-58.
- ⁴⁹ Reynolds N, Cooke HJ. Role of the DAZ genes in male fertility. *Reprod Biomed Online.* 2005;10: 72–80.
- ⁵⁰ Reijo R, Lee TY, Salo P, Alagappan R, Brown LG, Rosenberg M, et al. Diverse spermatogenic defects in humans caused by Y chromosome deletions encompassing a novel RNA-binding protein gene. *Nat Genet.* 1995;10:383–93.
- ⁵¹ 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.
- ⁵² Jager RJ, Anvret M, Hall K, Scherer G. A human XY female with a frame shift mutation in the candidate testis-determining gene SRY. *Nature.* 1990;348:452-4.
- ⁵³ Ostrer H. Sexual differentiation. *Sem Reprod Med.* 2000;18:41-9.
- ⁵⁴ SRY. [Internet] 2008 November [Updated 2014 June 23; cited 2014 Juni 27]. Available from: <http://ghr.nlm.nih.gov/gene/SRY>
- ⁵⁵ Markoulatos P, Siafakas N, Moncany M. Multiplex polymerase chain reaction: a practical approach. *Journal of Clinical Laboratory Analysis.* 2002;16:47-51.
- ⁵⁶ Dogget NA. The polymerase chain reaction and sequence-tagged sites. *Los Alamos Science.* 1992;20:128-134
- ⁵⁷ Simoni M, Bakker E, Krausz C. EAA/EMQN Best Practice Guidelines for Molecular Diagnosis of Y-chromosomal microdeletions. State of The Art. *International Journal of Andrology.* 2004;27:240-49.
- ⁵⁸ Liow SL, Yong EL, Ng SC. Prognostic value of Y deletion analysis. *Hum Reprod.* 2001;16(1):9-12
- ⁵⁹ Hoag CC, Gotto GT, Morrison KB, Coleman GU, MacNeily AE. Long-term functional outcome and satisfaction of patients with hypospadias repaired in childhood. *Canadian Urological Association.* 2008;2(1):23-31.