

Diagnóstico Genético Pré-implantacional – Uma breve revisão e a experiência inicial do Centro de Fertilidade da Rede D’Or

Maria Cecília A. Cardoso¹, Maria Cecília Erthal² – **1.** Chefe do laboratório de Reprodução Assistida do Centro de Fertilidade; **2.** Diretora Clínica do Centro de Fertilidade

INTRODUÇÃO

Um entre cada seis casais apresenta problemas de fertilidade e para 20% deles, o único modo de obter gestação é através da utilização de técnicas de Reprodução Assistida. Entende-se por Reprodução Assistida (RA) o conjunto de técnicas laboratoriais que visa obter uma gestação substituindo ou facilitando uma etapa deficiente no processo reprodutivo.

As inovações das técnicas de reprodução assistidas avançaram do estabelecimento inicial da fertilização *in vitro* como método de “tratar” a infertilidade de origem tubária, caminhando na direção do desenvolvimento de técnicas microcirúrgicas de manipulação de células reprodutivas e de gametas.

Desde o nascimento de Louise Brown, o primeiro “bebê-de-proveta”, em 1978, a técnica teve vários desdobramentos e hoje em muitos países é utilizado doação de material genético, criopreservação de embriões, diagnóstico genético pré-implantacional, doação temporária de útero, sem contar a pesquisa em embriões, que é praticada em pequena escala, e a clonagem reprodutiva.

Fertilização *in vitro* (FIV), como o próprio nome já diz, é a técnica de reprodução assistida em que a fertilização e o desenvolvimento inicial dos embriões ocorrem fora do corpo e os embriões resultantes são transferidos habitualmente para o útero. Esta técnica surgiu para resolver o problema das mulheres com dano tubário irreversível. Porém, a indicação foi ampliada e hoje é utilizada em casos de fator masculino severo, endometriose, fator imunológico e na infertilidade sem causa detectada. O índice médio de gravidez, por cada tentativa e em laboratórios qualificados gira em torno de 20-60%, de acordo com a idade feminina. O Centro de Fertilidade Rede Labs D’Or fechou o ano de 2007 com uma taxa geral de 36,5% de gravidez por tentativa, chegando a percentuais de 54,1% em mulheres entre 30 e 34 anos de idade.

A razão dos baixos percentuais por tentativa, fato sempre questionado levando-se em conta o alto custo do tratamento, é o alto índice de aneuploidias existentes em embriões humanos¹, o que faz com que mais da metade dos embriões formados não tenham condições de se implantar no útero materno. Este fato ocorre independente da formação do embrião ter ocorrido *in vivo* ou *in vitro*, mas certamente é um dos grandes obstáculos a ser vencido na busca de melhores resultados de gravidez no tratamento da infertilidade conjugal.

Uma seleção de embriões eficaz é a melhor ferramenta para atingir altos índices de implantação. Isto pode ser obtido em três formas não-exclusivas diferentes: **a)** a primeira é a seleção morfológica e evolutiva (um embrião ideal, desenvolvido a partir de um zigoto com 2 pró-núcleos, não deve apresentar mais de um núcleo em cada um de seus blastômeros e deve ter 4 células no dia 2 e 8 células no dia 3 e também não deve conter mais que 15% de fragmentos) - Figura 1. No entanto, mesmo com este tipo de seleção, 30 a 50% dos embriões terão anormalidades cromossômicas^{2; 3}. **b)** o cultivo até o estágio de blastocisto

(dia 5 ou 6 – Figura 2) também pode ser uma forma interessante de seleção, pois nesse estágio existe uma chance maior de implantação que nos estágios de clivagem e também porque algumas monossomias e o mosaicismo caótico raramente evoluem à blastocisto⁴. No entanto, as trissomias, a monossomia do cromossomo 21 e do cromossomo X e muitos mosaicos conseguem atingir ao estágio de blastocisto e a seleção dessas anormalidades só pode ser feita através da análise cromossômica dos embriões. **c)** Portanto, a seleção genética dos embriões é atualmente a maneira mais eficaz de identificação do embrião com maior potencial de implantação. Isso ocorre não somente por conta do resultado da análise cromossômica em si, mas também porque para chegar ao momento da transferência, o embrião diagnosticado como geneticamente normal foi proveniente de um zigoto com 2 pró-núcleos, tinha entre 6 e 8 células com menos de 25% de fragmentação no terceiro dia de desenvolvimento e teve que se desenvolver até o estágio de blastocisto para esperar o resultado do laboratório de genética.



Figura 1. Estágios evolutivos do embrião até o terceiro dia de cultivo.



Figura 2. Blastocisto cultivado até o dia 6 no *Centro de Fertilidade Rede Labs D'Or*.

Por todos esses motivos, a análise cromossômica dos embriões que foram gerados e cultivados *in vitro*, antes de serem transferidos ao útero materno, aumenta consideravelmente as chances de implantação e conseqüentemente os índices de gravidez por transferência nos tratamentos de RA, além de diminuir os índices de abortamento espontâneo, principalmente nos casos de falhas repetidas de sucesso no tratamento, mulheres com idade avançada^{5; 6; 7; 8} e naquelas com história de abortamento recorrente⁹. Já foi bem documentado, que em mulheres acima de 37 anos, apenas 35% dos embriões com mais de 8 células (terceiro dia de evolução) e 65% dos blastocistos são normais¹⁰, mostrando dessa forma a importância do PGD nesse grupo de mulheres.

TÉCNICA DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO DO EMBRIÃO

O diagnóstico genético pré-implantacional - PGD (da sigla em inglês *preimplantation genetic diagnosis*) consiste no exame genético por FISH ou PCR feito em 1 ou 2 blastômeros do embrião no terceiro dia de desenvolvimento *in vitro*. Essas células retiradas do embrião não causam prejuízo ao mesmo, que deverá seguir com seu desenvolvimento até o estágio de blastocisto (dia 5 ou 6 de desenvolvimento *in vitro*). A técnica consiste em fazer uma

abertura na zona pelúcida, que, no caso do *Centro de Fertilidade Rede Labs D'Or*, utiliza um equipamento a laser acoplado ao microscópio invertido (Figura 3a). Uma ou duas células são succionadas por uma micro-pipeta especial (Figuras 3b e 3c) e por fim a célula retirada (Figura 3d) é fixada e identificada para ser enviada para o laboratório de genética.



Figura 3. Etapas da biópsia embrionária.

De forma didática, o PGD pode ser dividido em duas categorias: **a)** o PGD propriamente dito que tem a finalidade de selecionar os embriões de casais com alto risco de transmitir anormalidades genéticas ou cromossômicas para seus filhos como no caso de doenças recessivas autossômicas, doenças autossômicas dominantes e desordens ligadas ao X. O PGD também pode ser indicado para tipagem de HLA com o propósito de se conceber uma criança compatível com um irmão mais velho que necessita de terapia com células tronco¹¹. Na grande maioria das vezes, a FIV nestes casos é realizada em casais sem infertilidade com a finalidade específica de se realizar o teste. **b)** o PGS (da sigla em inglês *preimplantation genetic screening*) para casais com infertilidade que têm que se submeter à FIV com objetivo de aumentar os índices de gravidez do tratamento: falhas repetidas de implantação, história de abortamento de repetição, mulheres com idade avançada.

No PGD utiliza-se uma sonda específica para a doença a ser diagnosticada, como por exemplo, para o gene da Coréia de Huntington ou para o cromossoma X, no caso das doenças ligadas ao sexo.

No caso do PGS aplica-se um lote de sondas para os cromossomos que mais estão envolvidos em aneuploidias, no intuito de afastar as doenças que mais frequentemente estão envolvidas em falha de implantação e abortamento. Estudos usando a hibridização genômica comparativa¹² indicam que a utilização das sondas para os cromossomos 13, 15, 16, 18, 21, 22, X e Y detectam 85% das anormalidades cromossômicas tanto porque estes 8 oito cromossomos são os mais envolvidos nas aneuploidias, quanto porque outras aneuploidias tendem a ocorrer simultaneamente com aquelas envolvendo um deles.

A NOSSA EXPERIÊNCIA

Em novembro de 2006, o *Centro de Fertilidade Rede Labs D'Or*, realizou seu primeiro caso de FIV com diagnóstico genético dos embriões e fechou o ano de 2007 com a casuística de 13 procedimentos realizados.

Dos 13 ciclos de tratamento, três foram de PGD (em 2 pacientes – uma delas fez duas tentativas) e dez foram de PGS (em 8 pacientes – duas delas fizeram 2 tentativas). Os dados dos tratamentos estão resumidos na tabela I.

Tabela I. Dados dos procedimentos de biópsia de embriões.

	Procedimento	
	PGD	PGS
No. de ciclos	3	10
No. de pacientes	2	8
Idades (média)	35-40 (38anos)	40-44 (42,1 anos)
No. de óvulos maduros	18	56
Taxa de fertilização	72,2% (13/18)	51,8% (29/56)
No. de embriões biopsiados	15	25
No. de embriões degenerados pela biópsia	0	1
No. de embriões transferidos	1	2

Apenas uma paciente de PGD teve um embrião normal para transferência, mas não resultou em gravidez. Este casal não possuía infertilidade conjugal, mas tiveram um filho com atrofia espinhal progressiva que foi a óbito com 6 anos de idade. O aconselhamento genético indicava um risco de 25% de ocorrer novo caso. A sonda para a alteração gênica da doença (deleção do exon 7 do gene SMN – sobrevivida do neurônio motor) foi confeccionada a partir do DNA deste filho e utilizou-se a técnica do PCR para o diagnóstico dos oito embriões biopsiados. Desses oito embriões, apenas dois tiveram amplificação suficiente para o diagnóstico por PCR e desses um era afetado e o outro normal.

O outro caso de PGD era de translocações associadas do cromossomo 17 e 7 carregado pelo esposo da paciente. As sondas foram adquiridas com exclusividade para o caso e o casal realizou dois ciclos de tratamento, com um total de cinco embriões biopsiados. Nenhum deles era normal e a paciente não teve transferência em nenhuma das duas vezes.

Já nos casos de PGS, os dois únicos embriões diagnosticados como normais e transferidos resultaram em gravidez. Uma das pacientes tem 41 anos e fez dois ciclos de tratamento para vir a engravidar na segunda tentativa (na primeira não houve transferência). A outra paciente tem 44 anos e engravidou da primeira tentativa, o que nos dá uma taxa de 100% de implantação embrionária para PGS. As gestações ainda estão em curso, mas evoluem sem alterações.

CONCLUSÃO

O diagnóstico genético do embrião antes da transferência (pré-implantacional) é um procedimento já bem estabelecido, permitindo aos casais de risco (falhas de implantação, mulheres com idade acima de 37 anos e abortamento de repetição) ter uma criança normal sem enfrentar o diagnóstico pré-natal com a difícil decisão de terminar uma gestação devido a uma alteração genética. A detecção e exclusão dos embriões com anormalidades gênicas é também uma alternativa à tradicional seleção dos embriões de FIV baseada nos critérios puramente morfológicos. De acordo com estudos controlados, a realização de PGS nos casos de idade materna avançada, leva a um aumento nas taxas de implantação e reduz as taxas de abortamentos¹⁰.

A Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM) considera que o diagnóstico pré-implantacional com o intuito de evitar doenças transmissíveis é eticamente aceitável, pois

não se trata de discriminação e sim de uma forma de garantir a saúde humana. Recomenda ainda que não seja feito tal procedimento unicamente com intenção de escolha de sexo, pois poderia representar um perigo social e desvio da utilização de recursos médicos das necessidades científicas genuínas.

REFERÊNCIAS

1. Pellestor F. The cytogenetic analysis of human zygotes and preimplantation embryos. *Human Reproduction Update* 1995; 1:581-585.
2. Munné S, Alikani M, Tomkin G, et al. Embryo morphology, developmental rates and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertility and Sterility* 1995; 64:382-391.
3. Márquez C, Sandalinas M, Bahçe M, et al. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reproductive BioMedicine Online* 2000; 1:17-27.
4. Munné S. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reproductive BioMedicine Online* 2005b; 12:234-253.
5. Gianaroli L, Magli C, Ferraretti AP, Munné S. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertility and Sterility* 1999; 72:837-844.
6. Gianaroli L, Magli C, Ferraretti AP, et al. The beneficial effects of PGD for aneuploidy support extensive clinical application. *Reproductive BioMedicine Online* 2005; 10:633-640.
7. Munné S, Magli C, Cohen, et al. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Human Reproduction* 1999; 14:2191-2199.
8. Munné S, Sandalinas M, Escudero T, et al. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reproductive BioMedicine Online* 2003; 7:91-97.
9. Munné S, Chen S, Fischer J, et al. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women 35 and older with history of recurrent miscarriages. *Fertility and Sterility* 2005a, 84:331-335.
10. Staessen C, Platteau P, Van Assche E, et al. Comparison of blastocysts transfer with or without preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. *Human Reproduction* 2004; 19:2849-2858.
11. Verlinsky Y, Kuliev A. *Practical Preimplantation Genetic Diagnosis*. Springer, Berlin, N.Y. 2006; 204pp.
12. Voullaire L, Wilton L, McBain J, et al. Chromosome abnormalities identified by comparative genomic hybridization in embryos from women with repeated implantation failure. *Molecular Human Reproduction* 2002; 8:1035-1041.