

**U. PORTO**



INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR  
UNIVERSIDADE DO PORTO



centro hospitalar  
do Porto

*Artigo tipo Case Report*

## **UTILIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRÉ- IMPLANTAÇÃO NUM CASAL COM HISTÓRIA DE ABORTAMENTOS DE REPETIÇÃO**

Nuno Reis Pereira Ferreira da Silva

Mestrado Integrado em Medicina  
Ano Lectivo 2009/2010

Orientador: Dr. Jorge Sousa Braga

# **Índice**

Resumo .....	2
Introdução .....	3
Case Report.....	3
Discussão .....	6
Conclusão .....	10
Referências bibliográficas .....	11

## **RESUMO**

Uma mulher de 37 anos e o marido de 34 anos com história de abortamentos de repetição recorreram a uma clínica de fertilidade especializada com o desejo de engravidar. A paciente foi sujeita a um ciclo de tratamentos de reprodução medicamente assistida associada a diagnóstico genético pré-implantação. Neste processo foram aspirados 7 folículos de onde resultaram 5 ovócitos que foram fertilizados por injeção intracitoplasmática de espermatozóides. Após o estudo de hibridação fluorescente *in situ* apenas 2 embriões eram viáveis e foram transferidos para o útero da paciente. Obteve-se um teste de gravidez, por quantificação da gonadotrofina coriônica humana, positivo, contudo a gravidez clínica não foi atingida.

**Palavras-chave:** abortamentos de repetição, reprodução medicamente assistida, diagnóstico genético pré-implantação, translocação Robertsoniana, falhas de implantação

## **ABSTRACT**

A 37-years-old woman and her 34-years-old husband with history of recurrent miscarriages have resorted to a specialized fertility clinic with the intent to conceive. The patient was subjected to a cycle of assisted reproduction treatments associated to pre-implantation diagnosis. Seven follicles were aspirated from which resulted five oocytes that were fertilized by intracytoplasmic sperm injection. After the study of fluorescent *in situ* hybridization only two embryos were viable and were transferred to the uterus of the patient. A pregnancy test, for quantification of human chorionic gonadotropin, was positive, yet the clinical pregnancy was not achieved.

**Key words:** recurrent pregnancy loss, assisted reproduction, preimplantation genetic diagnosis, Robertsonian translocation, implantation failure

## **INTRODUÇÃO**

O diagnóstico genético pré-implantação (DGPI) é o teste realizado a embriões para defeitos genéticos antes de serem implantados no útero. Desde 1990 que esta técnica tem sido usada em casais cuja descendência apresenta risco aumentado para doenças Mendelianas, alterações cromossômicas e doenças mitocondriais severas. Casais com translocações Robertsonianas e translocações recíprocas representam a grande maioria da população que beneficia do DGPI, visto que apresentam altas taxas de infertilidade, abortamentos e nascimento de bebês com alterações fenotípicas significativas, muitas vezes resultando em óbito pré-natal.

O DGPI utiliza técnicas standard da reprodução medicamente assistida, como são a estimulação ovárica, recolha de ovócitos, fertilização *in vitro*/injeção intracitoplasmática de espermatozóides e cultura de embriões. É necessária a biopsia de células do embrião e a técnica mais utilizada consiste na biópsia do blastómero ao 3º dia após a fecundação, altura em que é constituído por 5 a 10 células. A zona pelúcida pode ser quebrada usando laser ou uma solução ácida e são então retiradas 1 ou 2 células. Outra opção é a biópsia no

estadio de blastocisto o que permite uma maior quantidade de material genético disponível para testar. Contudo, este método apresenta algumas desvantagens, como o fato de nem todas as culturas possuírem condições que permitam ao embrião atingir o estadio de blastocisto *in vitro*; além disso, os embriões devem ser transferidos para o útero antes do 6º dia após a fecundação e com esta técnica é pouco o tempo disponível para fazer o diagnóstico. O material biopsado pode depois ser testado por polimerase chain reaction (PCR) ou hibridização *in situ* fluorescente (FISH) e os embriões não afetados são então transferidos para o útero (normalmente não são transferidos mais que dois).

## **CASE REPORT**

Um casal, constituído por uma mulher de 37 anos e um homem de 33 anos, recorreu a um centro de procriação medicamente assistida por história de dois abortamentos precoces. O casal foi sujeito a uma bateria de exames que incluiu histerossalpingografia, cariótipo do casal, estudo de hemofilias e doseamento hormonal. Todos estes exames foram normais excepto o

cariótipo do casal onde se encontrou uma translocação Robertsoniana na mulher:

45, XX, der (13;14) (q10;q10).

Para satisfazer o desejo do casal de ter um filho recorreu-se à reprodução medicamente assistida e ao DGPI.

A estimulação ovárica foi iniciada pela aplicação diária via subcutânea com doses fixas de FSH recombinante (FSH-r) (Gonal-F®), a partir do 2º dia do ciclo menstrual. No 5º dia do ciclo menstrual iniciou-se o controlo ecográfico endovaginal seriado com a adaptação das doses subsequentes de FSH-r em função da resposta ovárica. A monitorização ovárica ecográfica foi realizada até se atingir diâmetro folicular médio de 18 a 20 mm, altura em que foi administrada gonadotrofina coriônica humana (hCG). A espessura endometrial foi medida por ecografia pélvica endovaginal seriada. A aspiração folicular para a colheita de ovócitos realizou-se pela via transvaginal guiada ecograficamente, 35 horas após a administração de hCG. O procedimento foi executado sob sedação com propofol. Foram aspirados 7 folículos tendo-se obtido 5 ovócitos. Os ovócitos permaneceram incubados após a sua captura em meio de cultura HTF (human tubal fluid) a 37°C, 5,0% de CO<sub>2</sub>, por um período entre 4 e 6 horas.

Decorrido este período, o complexo cumulus-corona foi removido pela colocação em solução de hialuronidase tipo VIII permitindo a classificação definitiva quanto ao grau de maturação e o resultado foram 5 ovócitos em metáfase II.

Procedeu-se então à injeção intracitoplasmática dos espermatozoides. Utilizando uma micropipeta apreensora, o ovócito foi posicionado com o primeiro corpúsculo polar direcionado para 6:00 horas. Após sua imobilização em polivinilpirrolidona (PVP) e a desestabilização do seu flagelo, o espermatozoide foi aspirado pela micropipeta injetora. Em seguida, foi injetado no citoplasma do ovócito às 3:00 horas, isto é, no eixo equatorial do ovócito.

Os ovócitos micromanipulados foram mantidos em cultura e a fertilização foi confirmada cerca de 16 a 18 horas depois da ICSI (dia +1), pela presença ou ausência de pró-núcleos (PN). Foi observada fertilização normal pela presença de dois prónucleos (2PN) e a extrusão do segundo corpúsculo polar na fase de zigoto em 3 ovócitos. A ausência de PN's, classificada como falha de fertilização, foi observada em 1 ovócito.

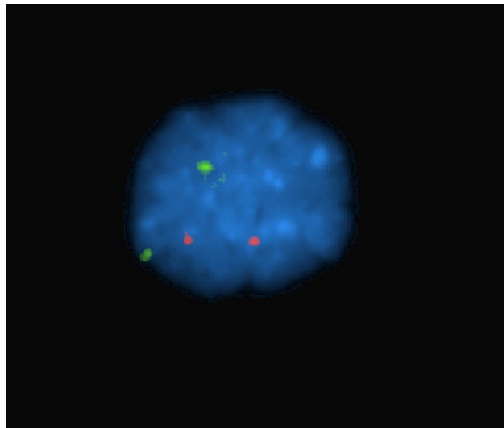
Para a biópsia, retirou-se o embrião do meio de cultura e colocou-se

num meio próprio para biopsias que tem a particularidade de não ter magnésio nem cálcio. Este meio especial ajuda a fluir as ligações da parede do embrião facilitando assim a biopsia. Ao embrião foi então adicionada uma gota de solução tampão (solução de Tyrode) para quebrar a zona pelúcida. Neste procedimento foram utilizadas 3 pipetas, cada uma com uma função específica: segurar o embrião na posição mais apropriada, injetar a solução de Tyrode e realizar a aspiração de blastómeros. Foi tido o cuidado de selecionar células com núcleo para permitir a realização posterior de estudo FISH. Os blastómeros aspirados foram colocados e fixados em lâmina. Foi adicionada à lâmina uma solução ácida, constituída por HCl, Tween 20 e água, que permite a dissolução do citoplasma das células deixando o núcleo intacto. A zona da lâmina que continha as células foi marcada na sua face inferior com caneta de diamante para permitir a localização da zona a ser observada com microscópio.

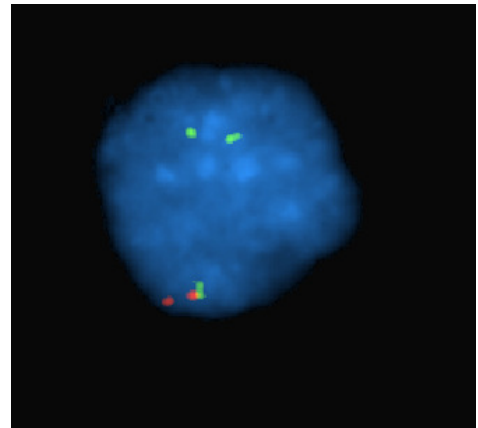
As lâminas foram depois levadas para um laboratório de genética médica. A lâmina passou por um processo de desidratação numa serie ascendente de álcoois (etanol a 80%, 90% e 100%). Seguiu-se digestão enzimática, para remoção de possíveis restos

citoplasmáticos com pepsina. Foi efetuada nova fixação com paraformaldeído e a lâmina foi desidratada e deixada a secar à temperatura ambiente. As sondas foram preparadas conforme as instruções do fabricante e adicionadas ao material genético em estudo. Realizou-se a co-desnaturação numa placa aquecida a 75 graus célsius durante 3 minutos. Deixou-se em repouso durante cerca de 16 horas para ocorrer a hibridação e posteriormente lavou-se para remover o excesso de sonda. Procedeu-se a nova desidratação como atrás descrito. Adicionou-se 4,6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) para contrastar o núcleo e permitir a sua visualização em microscópio de fluorescência, que está equipado com filtros para a visualização de diferentes cores. Procedeu-se, finalmente, à identificação do número de sinais por blastómero. O resultado foram 2 embriões normais/equilibrados e outro com trissomia 14. (fig.1)

Finalmente procedeu-se à transferência dos 2 embriões selecionados. Neste procedimento, similar a um exame ginecológico de rotina, colocou-se o espéculo na vagina e com um cateter adequado colocaram-se os embriões na cavidade uterina. A transferência é indolor, portanto não foi necessária anestesia ou analgesia.



Embrião normal/equilibrado



Embrião com trissomia 14

Figura 1  
LEGENDA FOTOS - sinais vermelhos: sonda específica, LSI13q; sinais verdes: sonda telomérica TEL14q

15 dias após a transferência foi quantificada a presença de beta-hCG no sangue da paciente. O resultado foi compatível com uma gravidez, contudo, 2 semanas depois, quando se realizou o estudo ecográfico concluiu-se que se tratava de uma gravidez bioquímica.

## **DISCUSSÃO**

Este é o caso de um casal com história de abortamentos de repetição devido a uma translocação Robertsoniana presente no cariótipo da mulher. Translocações Robertsonianas são alterações cromossômicas que resultam na fusão de cromossomas

acrocêntricos (13, 14, 15, 21 e 22). Este tipo de rearranjo envolve dois cromossomas acrocêntricos, homólogos ou não, que se fundem próximos da região do centrômero com perda de seus braços curtos. O cariótipo resultante em humanos possui somente 45 cromossomas já que dois cromossomas se uniram. As translocações Robertsonianas já foram observadas envolvendo todas combinações de cromossomas acrocêntricos. Assim como em outras translocações, os portadores de translocações Robertsonianas são fenotipicamente normais, mas existe um risco de formação de gametas não-equilibrados

que podem levar a abortamentos e uma descendência anormal.

A translocação mais comum em humanos envolve os cromossomas 13 e 14 e é observada em cerca de 0,97/1000 recém-nascidos e corresponde a 75% de todas as translocações Robertsonianas (Nussbaum e colegas, 2007). O risco de abortamento quando esta translocação está presente é aproximadamente 15% (Scriven e colegas, 2001).

Está provado que o DGPI diminui a frequência de abortamentos em portadores de alterações cromossómicas. Fisher e colegas descreve no seu estudo sobre a eficácia do DGPI em casais com história de abortamentos de repetição uma diminuição das taxas de abortamento de 88,5% sem DGPI para 13% quando estas técnicas são utilizadas. Estes valores estão próximos dos encontrados no estudo de Munné e colegas em que o uso do DGPI diminui a frequência de abortamentos de 95% para 12,5%. No estudo de Fisher e colegas foram atingidas taxas de gravidez que atingiram o 3º trimestre ou que culminaram em nascimento de 94%, 33% de gravidez com sucesso por ciclo de tratamento e 38% de gravidez com sucesso por ciclo de tratamento com transferência de embrião. Estes resultados são apoiados por outros

estudos sobre a eficácia do DGPI em casais com translocações Robertsonianas e recíprocas (Lim e colegas e Otani e colegas) com taxas de gravidez com sucesso que variam entre 70 e 95% e taxas de abortamento que variam entre 5 e 15%.

Após a gravidez ser atingida, a probabilidade de obter o desfecho desejado é semelhante entre translocações Robertsonianas e recíprocas, contudo o número de embriões viáveis para transferência é maior nas translocações Robertsonianas. Este facto confere um melhor prognóstico quanto à obtenção de uma gravidez com sucesso. Os embriões viáveis são normais/equilibrados e resultam de segregação alternada. O estudo de Alves e colegas, que analisou o padrão de segregação quando está presente uma translocação Robertsoniana, provou um predomínio da segregação alternada com valores de 63,9% (39/61); isto também se observa para as translocações entre os cromossomas 13 e 14 com taxas de segregação alternada de 65% (31/48). Esta conclusão está presente também em outros estudos (Conn e colegas, Iwarson e colegas e Escudero e colegas).

Além do aumento da percentagem de sucesso no que diz respeito ao

número de gravidezes o DGPI tem a vantagem de diminuir o tempo necessário para atingir a gravidez. Goddjin e colegas relatou que, em média, eram necessários 6 anos (com valores entre 2 e 9 anos) de tratamentos com vários ciclos de fertilização *in vitro* para obter uma gravidez com sucesso. Por outro lado, no trabalho de Fisher a gravidez, recorrendo a técnicas de DGPI, foi alcançada com sucesso, em média, apenas com 1,4 ciclos de fertilização *in vitro*, um valor muito perto do encontrado por Otani e colegas de 1,2 ciclos. Estes dois estudos demonstram que quando se recorre ao DGPI menos de 3 meses de tratamento são necessários para atingir uma gravidez com sucesso.

As taxas de gravidez usando injeção intracitoplasmática de espermatozoides com ou sem DGPI são semelhantes, podemos então concluir que a biopsia do embrião não diminui a probabilidade de gravidez (Anderson e colegas, 2008).

Quando o embrião falha a implantação com sucesso muitos pacientes frequentemente desistem. Não só pela desilusão e desgaste emocional mas também pelos elevados valores monetários que são necessários para novo ciclo de tratamento. Contudo quando não desistem Margalioth e colegas defende que, após 3 ciclos de

tratamento falhados em que foram transferidos para o útero embriões de boa qualidade, é necessário investigar a causa ou causas que originaram o insucesso das tentativas anteriores e, se possível, tratá-las. As causas que levam ao insucesso da implantação do embrião podem agrupar-se em 3 categorias: diminuição da receptividade endometrial, defeitos do embrião ou multifatorial (endometriose, hidrossalpinge).

A diminuição da receptividade endometrial pode ser causada por patologia não diagnosticada, as principais são: hiperplasia, pólipos e endometrite. No estudo de Demiroglu e Gurgan as pacientes em que foram observadas alterações na histeroscopia e essas alterações foram tratadas apresentaram taxas de gravidez mais elevadas (32,5%) que as pacientes do grupo controlo (21,6%), em que não foram realizadas histeroscopia. No grupo em que a histeroscopia não revelou qualquer patologia a taxa de gravidez foi de 30,4%. No estudo de de Geyter e colegas a presença de um endométrio pouco desenvolvido não influenciou a taxa de gravidez atingida. Apesar desta observação de de Geyter vários especialistas continuam a defender que uma espessura mínima de 4 a 8 mm é necessária para haver uma implantação com sucesso. Para atingir este objetivo

alguns autores defendem uma abordagem com a estimulação do endométrio que pode originar uma reação pseudo-decidual que aumenta a probabilidade da implantação. Friedler e colegas descreveu um protocolo para pacientes com história de insucesso na altura da implantação que inclui histeroscopia, curetagem, antibioterapia e tratamento com estrogénio. Com esta abordagem 43% das pacientes alcançaram a gravidez desejada. Barash e colegas efetuou biópsias repetidas em 45 pacientes. Os resultados de gravidezes e nascimentos após biopsia nos ciclos de tratamento aumentaram para o dobro, concluindo assim que a estimulação local do endométrio aumenta as taxas de implantação com sucesso.

Outro mecanismo sugerido por De Vos e Van Steirteghem para o insucesso na implantação é a incapacidade da zona pelúcida romper após o desenvolvimento do blastocisto. A zona pelúcida torna-se rígida naturalmente após a fertilização para evitar a entrada de mais do que um espermatozóide. Para contrariar este fenómeno foram desenvolvidas algumas técnicas de eclosão assistida que consistem na abertura da zona pelúcida de forma mecânica, física ou recorrendo a laser antes da transferência do embrião.

Estudos de Chao e colegas (1997), Magli e colegas (1998) e Nakayama e colegas (1999) mostraram um aumento significativo das taxas de implantação e gravidez com sucesso após eclosão assistida.

As taxas de implantação e gravidez estão diminuídas em mulheres com endometriose (Kuivasaari e colegas, 2005). Uma meta-análise (Sallam e colegas, 2006) de três estudos indica que o tratamento com agonistas da hormona libertadora de gonodotrofinas (GnRH) durante 3 a 6 meses antes da execução das técnicas de reprodução medicamente assistida aumenta a probabilidade de atingir uma gravidez para o quádruplo. A maioria dos investigadores concorda que a exérese dos endometriomas não apresenta vantagens antes do início das técnicas de reprodução medicamente assistida (Garcia-Velasco e colegas, 2004; Wong e colegas, 2004). Outra abordagem á endometriose consiste na utilização de danazol, um derivado da etisterona, um esteróide sintético que impede a libertação de gonadotrofinas. No estudo de Tei e colegas (2003), 81 pacientes com história de implantação mal sucedida o tratamento com danazol resultou num aumento das taxas de gravidez de 19,5% para 40%. Também a hidrossalpinge, presença de líquido na

trompa de Falópio, obstruída devido a infecção, endometriose ou cirurgia prévia, diminui a probabilidade de implantação de embriões com sucesso. A hidrossalpinge interfere com as taxas de implantação e gravidez por três motivos: o líquido presente na trompa em contacto com o útero desloca o embrião dificultando a sua implantação, o líquido possui várias substâncias tóxicas para o embrião e diminui a recetividade do endométrio. Numa meta-análise (Jonhson e colegas, 2004) com três estudos em que se efetuaram salpingectomias profiláticas em mulheres com hidrossalpinge o número de gravidezes e nascimentos foi o dobro do atingido no grupo controlo. Assim, a salpingectomia laparoscópica é recomendada em todas as mulheres com hidrossalpinge antes dos tratamentos de reprodução medicamente assistida.

Existem muitas causas, conhecidas e desconhecidas, para o insucesso na altura da implantação e nem sempre é possível identificá-las. Apesar de não haver um protocolo 100% eficaz todos os especialistas da área concordam que após uma técnica falhar mais que uma vez é aconselhável utilizar uma abordagem diferente (Makrigiannakis A, Minas V., 2007).

## **CONCLUSÃO**

Está provado que a reprodução medicamente assistida associada ao diagnóstico genético pré-implantação pode ajudar casais com história de abortamentos de repetição de causa cromossómica a engravidar. De toda a população que beneficia do DGPI, as translocações Robertsonianas são as situações que apresentam maiores taxas de sucesso pois existe maior número de embriões viáveis disponíveis. Quando comparamos a história natural dos casais com alterações cromossómicas com os resultados obtidos quando se recorre ao DGPI torna-se claro que esta opção deve estar presente em qualquer sistema nacional de saúde. Os portadores de alterações cromossómicas conhecidos e que já têm história de abortamentos de repetição devem ser informados que esta técnica pode ser muito útil para satisfazer o seu desejo de ter um filho visto que até 60% dos abortamentos precoces são devidos a aneuploidia. O objetivo do DGPI para aneuploidia é aumentar a probabilidade de um casal atingir a gravidez, reduzir o risco de abortamento, e melhorar a sua hipótese de levar para casa um bebé saudável após fertilização *in vitro*.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Alves C, Sousa M, Silva J and Barros A.. Preimplantation genetic diagnosis using FISH for carriers of Robertsonian translocations: the Portuguese experience. *Prenatal Diagnosis* 2002; 22: 1153–1162
2. Andersen AN, Goossens V, Ferraretti AP, Bhattacharya S, Felberbaum R, de Mouzon J, Nygren KG. European IVF-monitoring (EIM) Consortium, European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE). Assisted Reproductive Technology in Europe; 2004 results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod* 2008;23:756–771.
3. Conn CM, Harper JC, Winston RML, Delhanty JDA. 1995. Preimplantation diagnosis for trisomies 13, 14, 18 and 21 in translocation carriers using multicolour fluorescent in situ hybridisation. *Am J Hum Genet* 57(Suppl.): A1611.
4. Escudero T, Lee M, Carrel D, Blanco J, Munné S. 2000. Analysis of chromosome abnormalities in sperm and embryos from two 45,XY,t(13;14)(q10;q10) carriers. *Prenat Diagn* 20: 599–602.
5. ESHRE PGD Consortium Steering Committee. 2002. ESHRE preimplantation genetic diagnosis consortium: data collection III (May 2001). *Hum Reprod* 17: 233–246
6. Fischer J, M.S., Colls P, Ph.D., Escudero T, M.S., and Munne S, Ph.D. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) improves pregnancy outcome for translocation carriers with a history of recurrent losses. Reprogenetics, LLC, Livingston, New Jersey.
7. Goddijn M, Joosten JHK, Knegt AC, Van der Veen F, Franssen MTM, Bonsel GJ, et al. Clinical relevance of diagnosing structural chromosome abnormalities in couples with repeated miscarriage. *Hum Reprod* 2004;9:1013–17.
8. Iwarsson E, Malmgren H, Inzunza J, et al. 2000. Highly abnormal cleavage divisions in Preimplantation embryos from translocation carriers. *Prenat Diagn* 20: 1038–1047.

9. Lim CK, Jum JH, Min DM, Lee HS, Kim JY, Koong MK, et al. Efficacy and clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis using FISH for couples of reciprocal and Robertsonian translocations: the Korean experience. *Prenat Diagn* 2004;24:556–61.
10. Margalioth E.J., Ben-Chetrit A., Gal M. and Elden-Geva T., investigation and treatment of repeated implantation failure following IVF-ET, *Human Reproduction*, 2006, vol. 21, no.12 pp 3036-3043.
11. Makrigiannakis A., Minas V., Mechanisms of implantation, *Reproductive BioMedicine online*, vol. 14. Comp. No 1.75-82, 2007.
12. Munné S, Escudero T, Sandalinas M, Sable D, Cohen J. 2000. Gamete segregation in female carriers of Robertsonian translocations. *Cytogenet Cell Genet* 90: 303–308.
13. Munné S, Morrison L, Fung J, et al. 1998b. Spontaneous abortions are reduced after preconception diagnosis of translocations. *J Assist Reprod Genet* 15: 290–296.
14. Nussbaum R, McInnes R, Willard H. Principles of clinical Cytogenetics. In: Thompson, Thompson (eds). *Genetics in Medicine*. Philadelphia: WB Saunders, 2007, 75–76.
15. Otani T, Roche M, Mizuike M, Colls P, Escudero T, Munné S. Preimplantation genetic diagnosis significantly improves the pregnancy outcome of translocation carriers with a history of recurrent miscarriage and failing to produce a live birth. *Reprod Biomed Online* 2006;13: 879–94.
16. Scriven P, Flinter F, Braude P, Mackie Ogilvie C. Robertsonian translocations-reproductive risks and indications for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod* 2001;16:2267–2273.
17. Verlinsky Y, Cohen J, Munne S, Gianaroli L, Simpson JL, Ferraretti AP, Kuliev A. Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis: a multicenter report. *Fertil Steril* 2004;82:292–4.
18. Winter E., Wang J., Davis M. and Norman R., Early pregnancy loss following assisted reproductive technology treatment, *Human Reproduction* vol.17, no 12 pp. 3220-3223, 2002.