

Aspectos gerais da reprodução assistida

Roger Abdelmassih

A esterilidade atinge aproximadamente 20% dos casais e nos últimos anos houve intenso desenvolvimento de tecnologias, drogas e condições laboratoriais que possibilitaram o oferecimento de maiores chances de sucesso no tratamento deste problema. No presente trabalho faremos um breve histórico da reprodução assistida e das tecnologias que atualmente podem ser oferecidas com o intuito de propiciar melhores condições de desenvolvimento embrionário e, desta maneira, maiores taxas de gravidez.



Roger Abdelmassih
Especialista em Reprodução Humana

Unitermos: Injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI), fertilização in vitro (FIV)

INTRODUÇÃO

Ao conjunto de técnicas que auxiliam o processo de reprodução humana foi dado o nome de técnicas de reprodução assistida (TRA), as quais podem ser divididas em métodos de baixa e métodos de alta complexidade. Entre as técnicas de baixa complexidade podemos incluir o coito programado e a inseminação intra-uterina (IIU), que apresentam a vantagem de menores custos, além de não precisarem ser realizadas em centros de reprodução assistida. Entre as técnicas de alta complexidade incluímos a fertilização *in vitro* (FIV) convencional e a injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI) (em inglês, *intracytoplasmatic sperm injection*).

Em 1870, John Hunter descreveu a inseminação artificial como método de tratamento em um casal cujo marido apresentava hipospádia.

No final da década de 1970, a técnica de FIV obteve seus primeiros resultados com o grupo de Bourn Hall,

na Inglaterra, chefiado pelos pesquisadores Patrick Steptoe e Robert Edwards (1). Em 1976, obteve-se uma gestação ectópica após a fertilização *in vitro* e transferência de um embrião (2). Em 1978, o mesmo grupo descreveu a primeira gestação que utilizando esta tecnologia obteve sucesso - cujo resultado foi o nascimento de uma criança do sexo feminino batizada com o nome de Louise Brown. A paciente apresentava obstrução tubária bilateral, e a coleta do óvulo foi feita em um ciclo natural, por meio de laparoscopia. Este embrião foi fecundado em laboratório e transferido ao útero 76 horas após sua coleta, com obtenção de gestação (1). A primeira gravidez obtida com essa técnica nos EUA ocorreu no ano de 1982 (4); no Brasil, em 1984 (5). Em 1989, os procedimentos passaram a ocorrer no nível totalmente ambulatorial, o que levou a uma diminuição no custo do processo, mantendo os mesmos resultados obtidos anteriormente (6).

No início da década de 90, o grupo de Van Steirteghem relatou os primeiros estudos pré-clínicos em humanos com a utilização da ICSI. Em 1992, Palermo e colaboradores relataram as primeiras gestações humanas e nascimentos com a transferência de embriões após a ICSI, técnica que atualmente resulta na produção de mais embriões com melhores taxas de implantação. A consequência desse fato é que a ICSI tem sido mundialmente usada com sucesso nos casos de tratamento da infertilidade masculina resultante de oligoastenozoospermia severa, teratozoospermia e, mesmo, azoospermia.

As TRA têm se desenvolvido de maneira extraordinária, até alcançarem o nível da tecnologia empregada nos dias de hoje, podendo oferecer taxas de gravidez de até 50%-55% em mulheres com até 35 anos de idade.

Discutiremos alguns aspectos dos procedimentos utilizados em reprodução assistida, com enfoque especial para a ICSI, técnica que trouxe nova revolução à reprodução assistida, permitindo a solução do fator masculino severo e trazendo, no geral, melhores taxas de fertilização com a consequente obtenção de melhor qualidade embrionária.

1. Fertilização *in vitro* (FIV)

A técnica da FIV pode ser dividida em cinco fases:

- Estimulação da ovulação
- Coleta dos óvulos
- Manipulação dos gametas
- Transferência dos embriões
- Suporte da fase lútea

Os procedimentos para a realização da FIV convencional e ICSI são os mesmos, exceto, obviamente, no momento da manipulação dos gametas para o processo de fertilização.

1.1 Estimulação da ovulação

Muitos protocolos de estimulação controlada da ovulação foram propostos, o mais utilizado é o do bloqueio hipofisário seguido de estimulação ovariana com doses decrescentes de

gonadotrofinas (*Down regulation*). Para o bloqueio do eixo, utilizam-se os agonistas do GnRH (GnRHa), o que provoca um bloqueio hormonal seletivo na secreção de FSH e LH pela hipófise. O protocolo mais utilizado é o protocolo longo com administração de GnRHa iniciada na fase lútea do ciclo prévio ao tratamento, durante um período de 14 dias. A presença do bloqueio é identificada pela ausência de cistos ovarianos e pela baixa dosagem de Estradiol (E_2) plasmático (< 30 pg/ml).

Uma vez instalado o bloqueio, mantém-se a administração do GnRHa para manutenção e inicia-se a estimulação direta dos ovários com o uso de gonadotrofinas. Podem ser usadas as gonadotrofinas associadas (hMG), as puras (FSHp, FSH-HP, FSHr), ou uma combinação das duas (hMG + FSH). A dose inicial depende da idade da paciente e dos seus níveis hormonais de FSH naturais. A dose pode variar de 75 a 600 U.I. por dia. O ajuste da dose pode ser feito de maneira progressiva ("Step-up"), ou regressiva ("Step-down"). Durante a estimulação, o ciclo é controlado diariamente utilizando dosagens séricas de E_2 e USTV. A avaliação do desenvolvimento folicular é feita pela medição do diâmetro médio do folículo. Quando pelo menos dois folículos atingem um diâmetro de $> 18-20$ mm administra-se o hCG (10.000 U.I. IM) e 34 horas após realiza-se a coleta dos óvulos (7).

1.2 Coleta dos óvulos

A coleta dos óvulos é realizada por via trans-

vaginal, sob orientação ecográfica. Após cuidadosa antissepsia vaginal, faz-se uma sedação leve usando um sedativo de ação ultracurta (Propofol) (8). Com a paciente anestesiada, dá-se início à punção.

Após a aspiração de todos os folículos retira-se o transdutor e a agulha, procedendo, a seguir, uma revisão cuidadosa do fundo de saco, evitando-se hemorragias.

1.3 Manipulação dos gametas

Os tubos com líquido folicular são recebidos no laboratório e seus conteúdos são colocados em uma pequena placa de Petri estéril plástica. Os óvulos são identificados e classificados quanto à maturidade. Posteriormente, são transferidos para uma placa de Petri contendo meio de cultura previamente preparado e estabilizado, onde permanecem até o momento da fertilização.

Fertilização in vitro convencional

O marido coleta a amostra seminal após a aspiração, a qual é preparada no laboratório através da técnica de gradiente de Percoll (10).

Faz-se uma avaliação da concentração desta amostra, verificando-se a concentração de espermatozóides móveis. Calcula-se o volume necessário para inseminar uma quantidade de aproximadamente 100.000 espermatozóides móveis por placa. Nos casos com baixa concentração de espermatozóides, pode ser inse-

minada uma quantidade maior de espermatozoides por placa (500.000 espermatozoides móveis por placa).

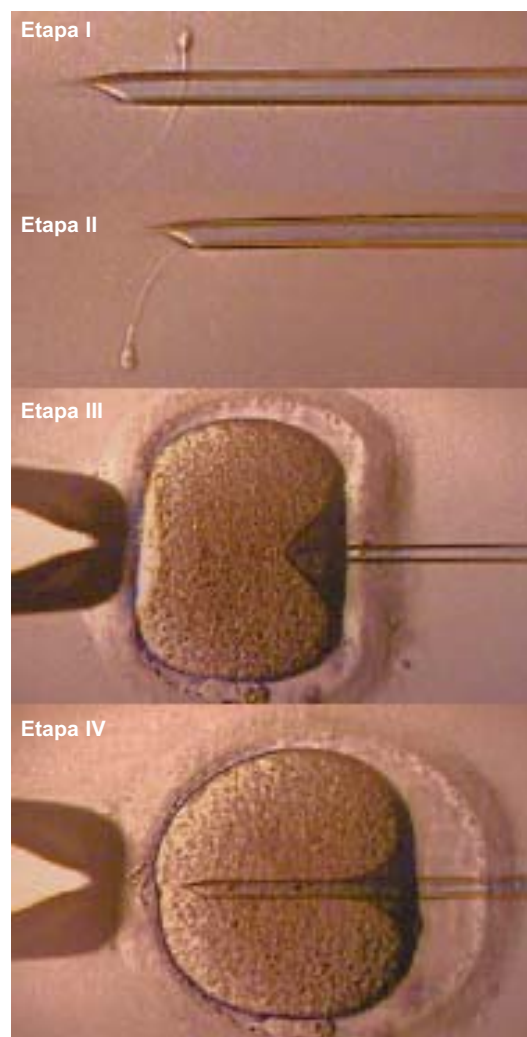
A amostra final é adicionada aos óvulos e estes permanecem em incubação pelo período de 16 a 18 horas. Aproximadamente 24 horas após a coleta dos óvulos, os mesmos são examinados para verificação da fecundação.

ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoide)

Os espermatozoides poderão ser obtidos diretamente do ejaculado, mesmo nos casos de fatores masculinos severos. Outras técnicas também foram desenvolvidas para a coleta de espermatozoides, uma vez que para o uso dessas técnicas de micromanipulação são necessários apenas alguns espermatozoides. Assim, foram desenvolvidas a técnica de microaspiração do epidídimo direta (MESA) (17) e através da pele (percutânea - PESA) (18); aspiração direta do testículo (TESA) (19) e extração direta dos espermatozoides do testículo (TESE) (19). Os oócitos são coletados em líquido folicular puro e enviados imediatamente ao laboratório de embriologia, onde são identificados e classificados quanto ao grau de maturidade. Os oócitos no estágio de metáfase II (MII) são injetados num período de 4 horas após a coleta. Os oócitos em metáfase I permanecem em incubação para verificação da extrusão do primeiro corpúsculo polar, num intervalo entre 4-8 horas após a aspiração - e a microinjeção é feita se isto ocorrer.

A microinjeção é realizada pela utilização das micropipetas de sucção e de injeção. O diâmetro externo da micropipeta de holding (para apreender o oócito) é de 60 a 80 μm , e interno de 7 a 8 μm ; e para a micropipeta de injeção, 10 μm na parte externa e 5 a 6 μm na parte interna. Ambas com um ângulo de 45°, para facilitar a injeção.

FIGURA 1



Um único espermatozóide é imobilizado mecanicamente, com uma batida na cauda usando a micropipeta de injeção (Etapa I). A cauda é aspirada primeiro para dentro da pipeta de injeção (Etapa II). O primeiro corpúsculo polar é colocado na posição de 6 ou 12 horas, dependendo da posição da abertura da agulha de injeção. O oócito é fixado com uma pequena pressão exercida pela micropipeta de sucção. O espermatozóide é injetado dentro do ooplasma com a micropipeta na posição de 3 horas (Etapas III e IV). Os oócitos são observados no dia seguinte, para verificação da presença ou ausência de pronúcleos e/ou corpúsculos polares.

Os embriões selecionados para a transferência (com a menor taxa de fragmentação) são transferidos para uma placa de cultura previamente aquecida, e se mantêm na incubadora até a hora da transferência.

Os embriões excedentes são preparados para serem congelados e armazenados em nitrogênio líquido.

Em novembro de 1992, o Conselho Federal de Medicina (CFM) publicou as normatizações referentes aos tratamentos com reprodução assistida. Uma das normas sugere que o número total de embriões formados seja informado ao casal, para que o mesmo possa optar por quantos embriões serão transferidos. O número máximo de embriões transferidos deve ser quatro, para evitar uma alta taxa de gestações múltiplas. Ainda segundo o CFM, os embriões excedentes não podem ser desprezados e deverão ser criopreservados (11).

1.3.1 Técnicas auxiliares

Assisted Hatching

O procedimento do *assisted hatching* (AH) foi introduzido no final de 1980. A observação de que os pré-embriões que se desenvolviam após a PZD (dissecção parcial da zona pelúcida) possuíam algo que aumentava as taxas de implantação trouxe a idéia de se criar um furo artificial na zona pelúcida antes da transferência intra-uterina. O AH pode ser realizado nos embriões em qualquer estágio de clivagem, de duas células até blastocisto. O melhor estágio celular de desenvolvimento ainda não foi determinado. A maioria dos grupos realiza o procedimento no dia da transferência intra-uterina, entre 65-72 horas após a inseminação. A técnica pode ser realizada utilizando-se o ácido de Tyrode's, ou com laser.

As principais indicações do *assisted hatching* são:

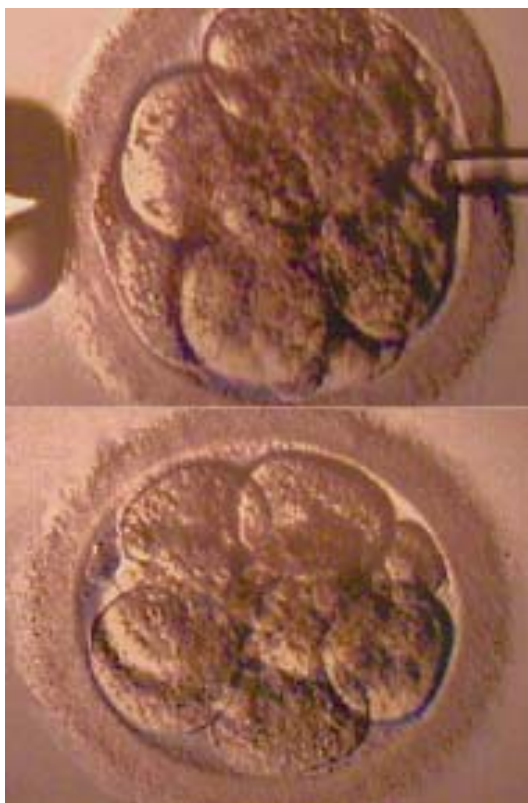
- Pacientes com idade avançada
- Pacientes com diminuição da reserva ovariana
- Espessamento da zona pelúcida
- Coloração anormal da zona pelúcida
- Fragmentação citoplasmática excessiva
- Embriões com morfologia pobre e baixas taxas de crescimento

Remoção de fragmentos dos embriões

Os fragmentos citoplasmáticos são componentes da membrana do citoplasma que foram expelidos das superfícies dos oócitos fertiliza-

dos e blastômeros dos pré-embriões. Os pré-embriões com excessiva fragmentação (>20%) têm uma taxa de implantação mais baixa do que aqueles sem fragmentação. Vários fatores podem ser responsáveis pela formação de fragmentos: condições de cultivo, competência citoplasmática, integridade genética, cromossomos não-balanceados e alterações da cariocinese e citocinese.

FIGURA 2



Fragmentos de citoplasma podem ser removidos, através de sucção delicada, após a abertura de um furo na zona pelúcida. Não há evidências de que a remoção de fragmentos

interfere com o subsequente desenvolvimento dos pré-embriões, desde que realizada de modo adequado; pelo contrário, esse procedimento beneficia os pré-embriões com fragmentação.

A fragmentação dos pré-embriões representa um dos principais fatores de falha da FIV, pois reduz a quantidade de citoplasma disponível para as sucessivas divisões dos blastômeros e faz com que os fragmentos sem núcleo possam sofrer um processo apoptótico, potencialmente prejudicial para os blastômeros viáveis. Por essas razões, as tentativas de remoção precoce dos fragmentos ajudam alguns embriões a manifestar todo o seu potencial de crescimento. A remoção de fragmentos tenta imitar o processo natural de eliminação de células apoptóticas pelas células do sistema imune (remoção assistida de células apoptóticas), já que os pré-embriões e os fragmentos expressam precocemente os marcadores apoptóticos na membrana celular. Esses marcadores sinalizam, fisiologicamente, sua iminente remoção. Na realidade, o papel dos processos apoptóticos durante o desenvolvimento dos pré-embriões humanos precisa ser mais bem estudado.

2. Diagnóstico genético pré-implantacional

Consiste na realização de uma biópsia embrionária, ou seja, a retirada de um ou mais blastômeros que serão posteriormente analisados para a detecção de alterações genéticas. Para o sucesso dessa técnica é preciso obedecer alguns pontos, tais como:

- O blastômero removido deve estar intacto e apropriado para o procedimento de diagnóstico;
- O embrião biopsiado deve manter o potencial para desenvolver-se e implantar-se dentro do endométrio.

Os embriões mais indicados para o diagnóstico de pré-implantação são os embriões em divisão celular com 8 células. Inúmeros estudos demonstram que um embrião com 8 células, biopsiado, tem o mesmo potencial de um embrião não-biopsiado de chegar ao estágio de blastocisto, após dois ou três dias em cultura *in vitro*.

Três diferentes procedimentos de biópsia têm sido mostrados para a remoção de um ou dois blastômeros de um embrião com 8 células:

- Afinamento químico da zona pelúcida (zona *drilling*) e aspiração dos blastômeros;
- Dissecção parcial da zona pelúcida, retirada do blastômero por pressão no embrião e aspiração do blastômero exposto; e
- Introdução da agulha diretamente no embrião e aspiração do blastômero. Ressalte-se que estes três tipos de procedimentos só poderão ser realizados com as técnicas de micromanipulação.

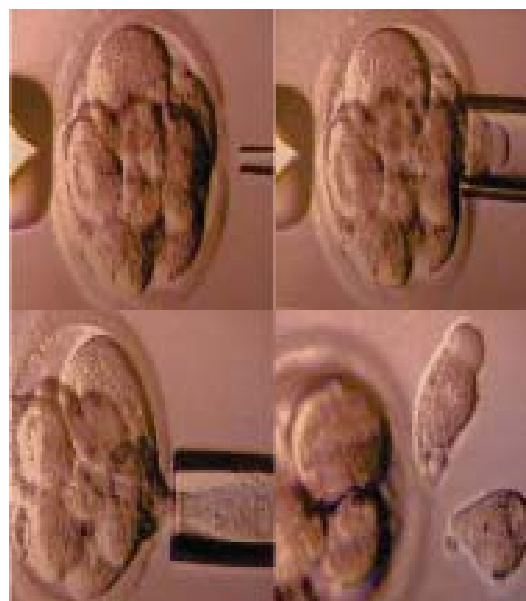
Até agora, as três maiores aplicações do PGD (Pre-implantacional Genetic Diagnostic) são:

- O sexo de um pré-embrião pode ser confiavelmente determinado através da FISH (fluorescent “in situ” hibridization) usando “probes” específicos para os cromossomos X ou Y. Dessa forma, doenças ligadas ao sexo podem ser determinadas e evitadas;
- A enumeração da composição cromossômica pode ser conseguida através da FISH, permitindo, assim, a determinação da ploidia

exata do pré-embrião concomitante com o diagnóstico de certas aneuploidias mais comuns. A FISH pode ser também usada para detectar anomalias cromossômicas estruturais em casos de translocações balanceadas;

- Defeitos genéticos envolvendo um único gene (tais como fibrose cística, anemia falciforme, doença de Tay-Sachs) e outras doenças comuns com alterações genéticas podem ser detectadas pela PCR (Polymerase Chain Reaction).

FIGURA 3



2.1 Transferência de embriões

A transferência dos embriões é feita 48 horas, 72 horas ou 5 dias (transferência de blastocisto) após a coleta dos óvulos, e segue o mesmo procedimento independente da técnica de manipulação utilizada nos gametas.

Uma vez preparada a paciente, solicita-se o cateter de transferência, contendo os embriões, ao laboratório de gametas. O cateter deve ser posicionado no interior da cavidade uterina, técnica que parece obter maior sucesso quando acompanhada por ultra-sonografia pélvica. Uma vez posicionado o cateter, injetam-se os embriões, delicadamente, mantendo-se o êmbolo pressionado durante 40 segundos, até a retirada do cateter – a manutenção do êmbolo pressionado evita o retorno dos embriões ao cateter.

No 12º dia após a transferência é realizada a dosagem da subunidade Beta do hCG (B-hCG) para diagnóstico da presença de gravidez. Confirmando-se a gravidez, solicita-se que a paciente retorne por volta do trigésimo dia pós-transferência para avaliação das presenças de sacos gestacionais, pólo embrionário e batimentos cardíacos fetais. Outros exames ultra-sonográficos são agendados para avaliação da evolução da gravidez.

2.2 Suporte da fase lútea

Em ciclos que utilizam os agonistas do GnRHa pode ocorrer durante a fase lútea uma falha na produção hormonal de Progesterona (P4) e Estradiol

(E₂) (21). Nestas falhas hormonais a dose de progesterona plasmática pode cair a níveis mínimos, provocando descamação e sangramento endometrial.

Devido a esses fatos, recomenda-se a utilização de suporte hormonal na fase lútea, visando a manutenção dos níveis hormonais e a manutenção da estimulação ovariana para produção hormonal (Progesterona e Estradiol).

CONCLUSÕES

Desde o desenvolvimento das técnicas de reprodução assistida, obtivemos importantes vitórias no sentido da resolução do problema do casal infértil. No final da década de 70 e início da década de 80, obtinha-se 5% de taxa de gravidez por ciclo (nesta época o ócito era obtido em ciclos naturais). Com o advento das gonadotrofinas na primeira metade da década de 80, estas taxas de gravidez elevaram-se para aproximadamente 12% por ciclo. No início dos anos 90, a melhoria das condições laboratoriais elevou estas taxas para 30% por ciclo. Atualmente, o método de ICSI associado a todas estas novas tecnologias pode oferecer 45%-50% de taxa de gravidez por ciclo de tratamento.

RESUMEN

Aspectos generales de la Reproducción Asistida

La esterilidad alcanza aproximadamente al 20% de las parejas y en los últimos años hubo un intenso desarrollo de tecnologías, drogas y condiciones laboratoriales que posibilitaron el ofrecimiento de mayores oportunidades de éxito en el tratamiento de este problema. En el presente trabajo haremos un breve histórico de la reproducción asistida y de las tecnologías que actualmente pueden ser ofrecidas con la intención de propiciar mejores condiciones de desarrollo embrionario y, de esta manera, mayores tasas de embarazo.

ABSTRACT

General aspects of Assisted Reproduction

Sterility affects around 20% of couples, and in the last years an intense development of technologies, drugs and laboratory conditions have enabled better chances of success in the treatment of this problem. In this paper, we will show a brief history of assisted reproduction and the technologies that can be offered to allow better conditions of embryonic development and consequently better pregnancy rates.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Steptoe PC, Edwards R. Reimplantation of a human embryo with a subsequent tubal pregnancy. *Lancet* 1976;1:880-2.
2. Steptoe PC, Edwards R. Birth after the implantation of a human embryo. *Lancet* 1978;2:366.
3. Feichtinger W, Kemeter P. Transvaginal sector scan sonography for needle guided transvaginal follicle aspiration and other applications in gynecologic routine and research. *Fertil Steril* 1986;45:722-5.
4. Jones Jr HW, Jones GS, Andrews MC, Acosta AA, Bundren C, Garcia JE, et alii. The program of in vitro fertilization at Norfolk. *Fertil Steril* 1982;38:14-21.
5. Nakamura M. Personal communication 1984.
6. Abdelmassih R, Salgueiro LL, Sayto MY, Passos JP, Dottaviano EJ, Mariano RM et. al. Resultados laboratoriais da FIVETE: análise em 382 ciclos. *Reprodução* 1992;7(11):13-8.
7. Abdelmassih R, Salgueiro LL, Sayto MY, Passos JP, Dottaviano EJ, Mariano RM, et. al. Resultados do programa de fertilização in vitro ambulatorial. *Anais do 4º Congresso Latino Americano de Esterilidade e Fertilidade* 1993 Jun; São Paulo. São Paulo
8. Abdelmassih R, Salgueiro LL, Sayto MY, Passos JP, Dottaviano EJ, Meirelles RM, et. al. Avaliação do uso de anestésico de ação curta (Propofol) na fertilização in vitro ambulatorial. *Anais do 4º Congresso Latino Americano de Esterilidade e Fertilidade* 1993 Jun; São Paulo. São Paulo.
9. Veeck L. *Atlas of the human oocyte and early conceptus*. Lippincott: Williams and Wilkins, 1986.
10. Ord T, Patrizio P, Marelllo E, Balmaceda J, Asch RH. Mini-percoll: a new method of semen preparation for IVF in severe male factor infertility. *Hum Reprod* 1990;5:987-9.
11. Conselho Federal de Medicina (Brasil). Resolução CFM nº 1.358, de 11 de novembro de 1992. Adota as normas éticas para utilização da técnicas de reprodução assistida. *Diário Oficial da União, Brasília*, no 22, p. 16053, 19 Nov 1992. Seção 1.

12. Gordon JW, Grunfeld J, Garrisi GJ, Talansky BE, Richards C, Laufer N. Fertilization of human oocytes by sperm from infertile males after zona pellucida drilling. *Fertil Steril* 1988;50:68-73.
13. Cohen J, Malter M, Fehilly C, Wright G, Elsner C, Kort H, et alii. Implantation of embryos after partial opening of oocyte zona pellucida to facilitate sperm penetration. *Lancet* 1988;2:162.
14. Laws-King A, Trounson A, Sathananthan H, Kola I. Fertilization of human oocytes by microinjection of a single spermatozoon under the zona pellucida. *Fert Steril* 1987;48:637-42.
15. Palermo G, Van Steirteghem A. Pregnancies after intracytoplasmic sperm injection of a single spermatozoa into an oocyte. *Lancet* 1992;340:17-8.
16. Van Steirteghem A, Nagy P, Liu J. Higher success rate by intracytoplasmic sperm injection than by subzonal insemination. *Human Reprod* 1993;8:1055-60.
17. Silber S, Nagy P, Liu J, Godoy H, Devroey P, Van Steirteghem A. Conventional in vitro fertilization versus intracytoplasmic sperm injection for patients requiring microsurgical sperm aspiration. *Human Reprod* 1994;9:1705-9.
18. Craft I, Tsirigotis M, Bennet V, Taranissi M, Khalifa Y, Hogewind G, et. al. Percutaneous epididymal sperm aspiration and intracytoplasmic sperm injection in the management of infertility due to obstructive azoospermia. *Fertil Steril* 1995;63:1038-42.
19. Devroey P, Liu J, Nagy P, Tournaye H, Silber S, Van Steirteghem A. Normal fertilization of human oocytes after testicular sperm extraction and intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1994;62:639-41.
20. Abdelmassih R, Solliia S, Moretto M, Acosta AA. Female age is important parameter to predict outcome in intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril* 1996;65:573-7.
21. Jones GS, Aksel S, Wentz AC. Serum progesterone values in the luteal phase defects: effect of chorionic gonadotrophin. *Obstet Gynecol* 1974;43:26.
22. Cohen J, Malter H, Elsner C, Kort H, Massey J, Mayer MP. Immunosuppression supports implantation of zona pellucida dissected human embryos. *Fertil Steril* 1990;53:662-5.

ENDEREÇO PARA CORRESPONDÊNCIA

Clínica e Centro de Pesquisa em Reprodução Humana Roger Abdelmassih
Rua Maestro Elias Lobo, 805
CEP: 01433-000
São Paulo - SP - Brasil