

# Biotecnologia em reprodução humana assistida

VASCO M. ALMEIDA\*

## RESUMO

*O conhecimento na área da reprodução humana tem revelado um grande desenvolvimento nas últimas três décadas, tendo como consequência a introdução de novas tecnologias à disposição da medicina da reprodução e da investigação em biologia reprodutiva.*

*Pretende-se com este trabalho abordar, de uma forma sistematizada e sintética, a tecnologia que hoje em dia pode ser utilizada em reprodução humana assistida.*

**Palavras-Chave:** Reprodução Assistida; Infertilidade; Esterilidade.

## INTRODUÇÃO

O desenvolvimento da biotecnologia em reprodução humana assistida tem permitido delinear novas estratégias no sentido de incrementar o conhecimento na área, bem como disponibilizar novas possibilidades de diagnóstico e tratamento da infertilidade.

Pretende-se, assim, neste trabalho, fornecer, de uma forma necessariamente sintética, uma panorâmica da tecnologia mais comum que hoje em dia se pode utilizar nesta área.

## INSEMINAÇÃO ARTIFICIAL INTRA-UTERINA

A inseminação artificial intra-uterina é um método relativamente simples utilizado no tratamento de alguns casais sub-férteis. Tem como principais indicações a anovulação, ovulações pouco frequentes, infertilidade idiopática, hostilidade do muco cervical, bem como a existência de um factor masculino moderado.

A estimulação ovárica é monitoriza-

da de modo a proporcionar o desenvolvimento de um folículo. No dia programado para a realização da inseminação, o membro masculino do casal procede à colheita do esperma que será processada no laboratório.

A técnica de preparação ideal é aquela que conduz à obtenção do maior número de espermatozoides morfológica e de boa motilidade num reduzido volume de meio de cultura<sup>1</sup>; preferencialmente a concentração de espermatozoides após tratamento deverá ser superior a  $1 \times 10^6$ /ml. A preparação de espermatozoides utilizando gradientes de concentração é a mais divulgada actualmente dado que, para além de permitir a obtenção de um elevado número de espermatozoides com boa motilidade e morfologia, reduz significativamente a contaminação bacteriana e a presença de leucócitos<sup>2,3</sup>.

A inseminação deverá ser realizada sem traumatizar o endométrio e em condições assépticas.

## FERTILIZAÇÃO IN VITRO (FIV)

Desde 1978 (nascimento do primeiro ser humano através da técnica de fertilização *in vitro*), temos assistido a avanços notórios em cada uma das etapas que envolvem este tipo de tratamento, que têm como reflexo o aumento das taxas de gravidez FIV a nível mundial.

No sentido de aumentar o sucesso de um ciclo de FIV procede-se à estimula-

\*Professor da Faculdade de Ciências da UP, responsável pelo sector laboratorial do Centro de Estudos de Infertilidade e Esterilidade

ção dos ovários para que estes possam produzir vários ovócitos. Esta hiperovulação realiza-se recorrendo à administração diária de hormona foliculo-estimulante (FSH) humana ou recombinante, sendo a resposta do ovário monitorizada por ecografias sucessivas.

Quando os folículos ováricos atingem determinadas dimensões (superior a 16mm), a ovulação é desencadeada através da administração de uma outra hormona (gonadotrofina coriónica-HCG); os ovários são puncionados 34 a 36 horas depois, sob anestesia.

Imediatamente a seguir à colheita, procede-se à triagem dos ovócitos no laboratório; estes são depois colocados em meio de cultura, à temperatura de 37°C, numa atmosfera com 6% de dióxido de carbono e 5% de oxigénio com saturação de humidade. Concomitantemente procede-se ao tratamento da colheita do esperma com gradientes de concentração. Passadas algumas horas, procede-se à inseminação dos ovócitos com os espermatozóides do cônjuge, cuja concentração usualmente varia entre 50 e 100 × 10<sup>3</sup>/ ml.

Cerca de 16 a 18 horas após a inseminação é feita a avaliação da fecundação, sendo os pré-zigotos de novo colocados em meio de cultura até ao dia da transferência dos embriões que pode ocorrer no espaço de tempo que medeia entre o segundo e o quinto dia após a inseminação. A transferência dos embriões é feita com um cateter apropriado, sob controlo ecográfico e o mais suavemente possível, sem lesar o endométrio. A técnica de transferência é essencial ao êxito do procedimento; transferências traumáticas associam-se a menores taxas de gravidez<sup>4</sup>.

### **MICROINJEÇÃO INTRACITOPLASMÁTICA DE ESPERMATOZÓIDES (ICSI)**

A ICSI revolucionou as tecnologias de reprodução humana assistida e tornou-

-se o tratamento de eleição nos casos de infertilidade masculina severa (oligo/asteno/teratospermias graves).

A primeira gravidez obtida por este tipo de micromanipulação foi relatada por Palermo et al. em 1992<sup>5</sup>. A ICSI consiste na injeção directa de um único espermatozóide no citoplasma de um ovócito.

Basicamente a tecnologia utilizada em ICSI é semelhante à utilizada num ciclo de FIV, excepto, obviamente, a substituição da inseminação dos ovócitos pela microinjeção. Esta realiza-se num microscópio invertido com platina termotatizada e com o auxílio de duas micropipetas acopladas a micromanipuladores (uma que sustenta o ovócito na posição pretendida e outra que permite penetrá-lo com o intuito de depositar um espermatozóide no ooplasma)<sup>6,7</sup>.

A ICSI é também utilizada nos casos de azoospermias em que é possível obter espermatozóides ou espermátides após biópsia testicular (TESE – *testicular sperm extraction*), aspiração de espermatozóides no testículo (TESA – *testicular sperm aspiration*), ou aspiração de espermatozóides no epidídimo (PESA – *percutaneous epididymal sperm aspiration*)<sup>8</sup>.

A microinjeção intracitoplasmática deve ser a metodologia utilizada nos casos em que o membro masculino do casal é portador de vírus de HIV, hepatite B e C. Assim, após o tratamento da amostra de esperma de um modo semelhante ao referido anteriormente, também designado por «lavagem dos espermatozóides», procede-se à determinação da sua carga vírica. No caso de esta ser nula, poder-se-á então proceder à microinjeção dos espermatozóides nos ovócitos.

### **A CRIOBIOLOGIA NA REPRODUÇÃO HUMANA**

#### **Embriões**

As técnicas de criopreservação ofere-

cem diversas vantagens em fertilização *in vitro*.

É consensual, na esmagadora maioria dos centros que se dedicam a esta área, a transferência uterina de um número máximo de dois a três embriões, no sentido de evitar gravidezes múltiplas. Por outro lado, e como já referimos anteriormente, assiste-se, hoje em dia, à produção de embriões supranumerários como consequência do número elevado de ovócitos obtidos através da utilização dos diversos protocolos de indução da ovulação.

Após o relato, em 1983, da primeira gravidez resultante da criopreservação de embriões<sup>9</sup>, este tipo de tecnologia tem sido aperfeiçoado e utilizado na maior parte dos centros de fertilização *in vitro*, onde os embriões supranumerários são criopreservados por rotina, armazenados a -196°C e utilizados em ciclos subsequentes com taxas de gravidez apreciáveis.

No entanto, diversos sectores da sociedade apontam problemas de ordem legal, moral e religiosa relacionados com a criopreservação de embriões humanos de tal forma que esta técnica tem sido restringida e mesmo proibida em alguns países europeus.

### Ovócitos e tecido ovárico

Uma solução para aqueles problemas poderá passar pela criopreservação dos gametas femininos. Para além disso, os casos de falência ovárica prematura, endometriose, infecções pélvicas, esterilidade iatrogénica após rádio ou quimioterapia em patologias neoplásicas podem ser evitadas com este tipo de tecnologia; neste último caso, reveste-se, também, de importância fulcral a criopreservação de tecido ovárico e posterior autotransplante.

A doação de ovócitos constitui uma outra área em que a congelação de células gaméticas femininas se poderá revelar muito útil.

Recentemente tem-se assistido ao

aumento das taxas de sobrevivência de ovócitos após descongelação e das respectivas taxas de fecundação e gravidez, pelo que será fácil vaticinar que a criobiologia de células gaméticas femininas assumirá cada vez mais um papel relevante em vários campos da reprodução humana assistida<sup>10</sup>.

### Espermatozóides

A criopreservação de células espermáticas remonta há cinco décadas<sup>11</sup>. Desde então até à actualidade foram desenvolvidos diversos métodos e crioprotectores que permitem, após descongelação, a obtenção de apreciáveis taxas de sobrevivência e capacidade fecundante em espermatozóides congelados.

O processo de doação de células gaméticas masculinas encontra-se há algumas décadas muito facilitado devido ao facto de ser possível o transporte e armazenamento de alíquotas de amostras de dadores durante largo tempo.

### DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRÉ-IMPLANTAÇÃO (DGPI)

O diagnóstico de patologias do foro genético em embriões em fase de pré-implantação constitui uma alternativa ao diagnóstico pré-natal e reveste-se de grande utilidade, uma vez que permite a selecção de embriões portadores de uma determinada anomalia genética.

O DGPI é realizado a partir de uma ou duas células (glóbulos polares, bastómeros de embriões com oito a doze células, células da trofoectoderme de blastocistos) e, conforme o tipo de patologia, poderá ser empregue a hibridização *in situ* com sondas fluorescentes (FISH) – nos casos de doenças causadas por anomalias cromossómicas – ou a reacção em cadeia da polimerase (PCR) – nas situações de doenças causadas por um gene<sup>12,13,14</sup>.

Factores como idade avançada (> 35

anos) do membro feminino do casal e insucesso repetido em ciclos de FIV são também apontados como indicação de DGPI.

Os resultados obtidos, decorridos dez anos após o início deste tipo de diagnóstico, permitem-nos afirmar que é um método cada vez mais importante na prevenção do nascimento de crianças afetadas por doenças do foro genético<sup>15</sup>.

### CONCLUSÃO

Como se constatou ao longo deste trabalho, necessariamente não exaustivo, temos assistido nos últimos anos a um grande desenvolvimento do conhecimento em reprodução humana e à introdução de novas tecnologias como instrumentos à disposição da medicina da reprodução e da investigação em biologia reprodutiva.

Algumas implicações de ordem ética necessitarão certamente de ser discutidas, tendo como alvo primordial a aplicação do conhecimento científico e técnico no nascimento de crianças saudáveis.

### REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Marcus SF. Intrauterine insemination. In: Brinsden PR, editor. Textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction. London: Taylor and Francis; 2005.
- Berger T, Marrs RP, Moyer DL. Comparison of techniques for selection of motile spermatozoa. Fertil Steril 1985 Feb; 43 (2): 268-73.
- Punjabi U, Gerris J, Van Bijlen J, Delbeke L, Gielis M, Buytaert P. Comparison between different pre-treatment techniques for sperm recovery prior to intrauterine insemination. GIFT or IVF. Hum Reprod 1990 Jan; 5 (1): 75-8.
- Karande V, Gleisher N. IVF in humans: technologies for oocyte retrieval, in vitro insemination and embryo transfer. In: Revelli A, Tur-Kaspa I, Holte JG, Massobrio M, editors. Biotechnology of human reproduction. London: The Parthenon Publishing Group; 2003.
- Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. Lancet 1992 Jul 4; 340 (8810): 17-8.
- Barnes FL. Equipment and general technical aspects of micromanipulation of gametes and embryos. In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z, editors. Textbook of assisted reproductive techniques. Laboratory and clinical perspectives. London: Martin Dunitz; 2001. p. 139-146.
- Palermo G, Raffaelli R, Hariprasad JJ, Neri QV, Takeuchi T, Veeck L, et al. ICSI: technical aspects. In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z, editors. Textbook of assisted reproductive techniques. Laboratory and clinical perspectives. London: Martin Dunitz; 2001. p. 147-158.
- Ubaldi F, Rienzi L. Micromanipulation techniques in human infertility: PZD, SUZI, ICSI, MESA, PESA, FNA and TESE. In: Revelli A, Tur-Kaspa I, Holte JG, Massobrio M, editors. Biotechnology of human reproduction. London: The Parthenon Publishing Group; 2003. p.
- Trounson A, Mohr L. Human pregnancy following cryopreservation, thawing and transfer of an eight-cell embryo. Nature 1983 Oct 20-26; 305 (5936): 707-9.
- Gosden RG, Gosden LL. Cryopreservation of human oocytes and ovarian tissue. In: Brinsden PR, editor. Textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction. London: Taylor & Francis; 2005.
- Bunge RG, Sherman JK. Fertilizing capacity of frozen human spermatozoa. Nature 1953; 172 (4382): 767-8.
- Verlinsky Y, Kuliev A. Preimplantation genetic diagnosis and its role in assisted reproduction technology. In: Brinsden PR, editor. Textbook of in vitro fertilization and assisted reproduction. London: Taylor & Francis, 2005.
- Yaron Y, Gamzu R, Malcov M. Genetic analysis of the embryo. In: Gardner DK, Weissman A, Howles CM, Shoham Z, editors. Textbook of assisted reproductive techniques. Laboratory and clinical perspectives. London: Martin Dunitz; 2001. p. 319-332.
- Gianaroli L, Magli MC, Gregorio AD, Ferraretti AP. Preimplantation genetics in human embryology. In: Revelli A, Tur-Kaspa I, Holte JG, Massobrio M, editors. Biotechnology of human reproduction. London: The Parthenon Publishing Group; 2003.
- Thornhill AR, deDie-Smulders CE, Geeraedts JP, Harper JC, Harton GL, Lavery SA, et al. ESHRE PGD Consortium "Best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS)". Hum Reprod 2005 Jan; 20 (1): 35-48.

#### Endereço para correspondência

Vasco M Almeida  
Rua D. Manuel II 51 B  
4050-345 Porto  
E-mail: valmeida@fc.up.pt