

Ciro Dresch Martinhago

**Identificação do sexo de embriões humanos através da
análise de blastômero pelas técnicas da reação em cadeia
da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) e
hibridização *in situ* fluorescente (FISH)**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia – Área de
Obstetrícia, Faculdade de Medicina de Botucatu –
Unesp, para a obtenção do título de Doutor

Orientador: Prof. Dr. José Gonçalves Franco Junior

**Botucatu – SP
2007**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉCNICA DE AQUISIÇÃO E TRATAMENTO
DA INFORMAÇÃO
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP
Bibliotecária responsável: Selma Maria de Jesus

Martinhago, Ciro Dresch.

Identificação do sexo de embriões humanos através da análise de blastômero pelas técnicas da reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) e hibridização *in situ* fluorescente (FISH) / Ciro Dresch Martinhago. – Botucatu : [s.n.], 2006.

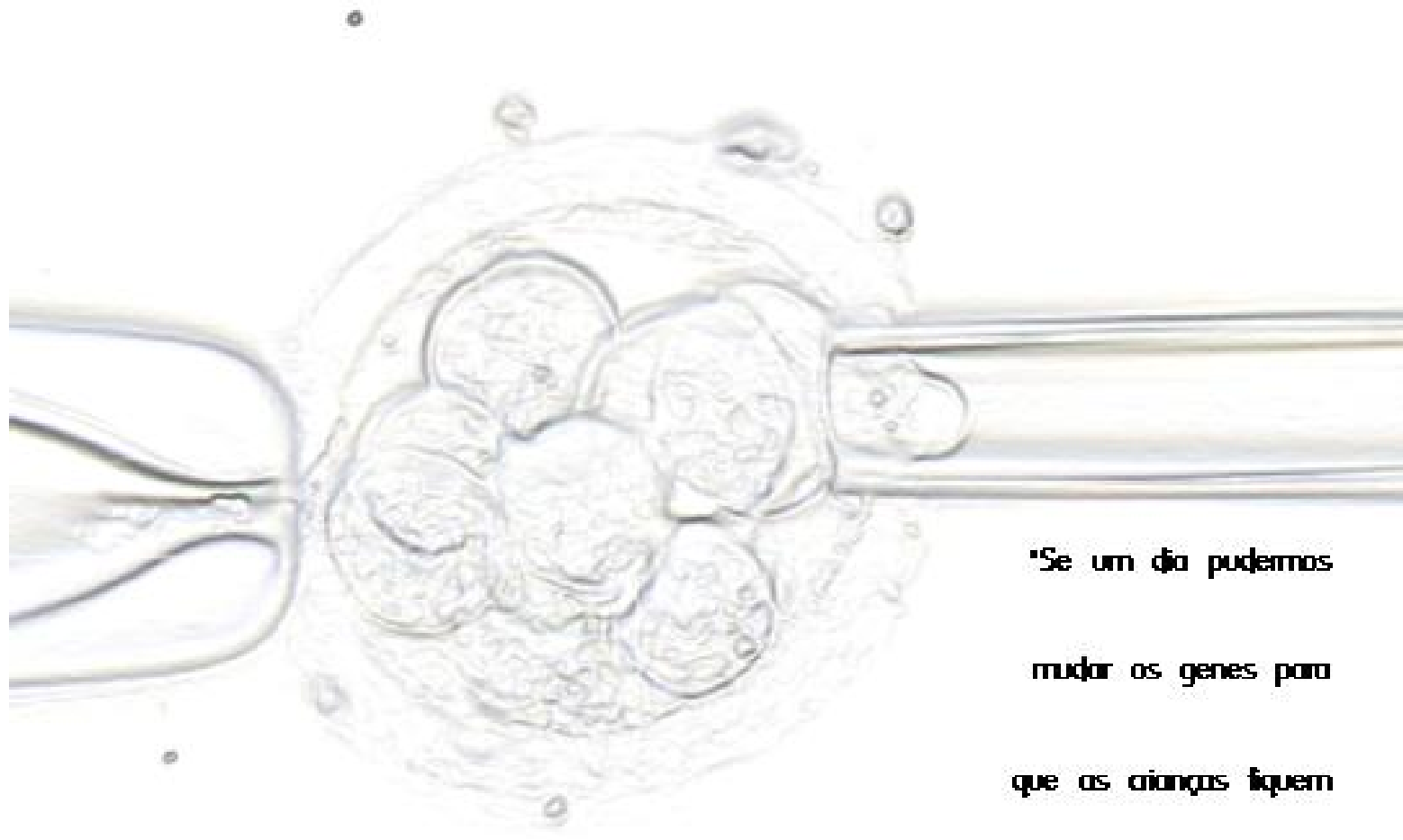
Tese (doutorado) – Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2007.

Orientador: José Gonçalves Franco Junior

Assunto CAPES: 40101150

1. Reprodução humana - Aspectos genéticos 2. Transferência de embriões
CDD 6 12.62

Palavras chave: Blastômero humano; Célula única; Diagnóstico genético pré-implantacional (PGD); Hibridização *in situ* fluorescente (FISH); Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real); TaqMan MGB; Sexagem de embriões humanos;



"Se um dia pudermos
mudar os genes para
que as crianças fiquem
mais bonitas ou
inteligentes, não vejo por
que não fazê-lo"

James Watson

(geneticista que descobriu a estrutura do DNA, em entrevista a revista Veja - Edição 1919
24 de agosto de 2005)



Aos meus pais Nilton Rogério Martinhago, Magda do Carmo Dresch e
a Deus pela oportunidade da Vida.

À minha família por toda dedicação, carinho e incentivo; por mostrar
que com muita persistência e fé, se consegue transpor todas as
barreiras para que se concretizem nossos sonhos...

Ao meu futuro sobrinho que vai renovar a vida em nossa família...

Ao Prof. Dr. José Gonçalves Franco Junior, por acreditar na minha capacidade, dedicação e incentivo durante todo o projeto.

Aos funcionários e corpo clínico do Centro de Reprodução Humana Prof. Franco Junior.

À Laura Vagnini pelo auxílio com o FSH, e dedicação ao projeto; e aos funcionários do CPDP por todo trabalho e empenho prestado.

À Cristiane Abe pelo auxílio com a formatação gráfica da tese.

À todos que participaram da pesquisa direta ou indiretamente o meu muito obrigado.

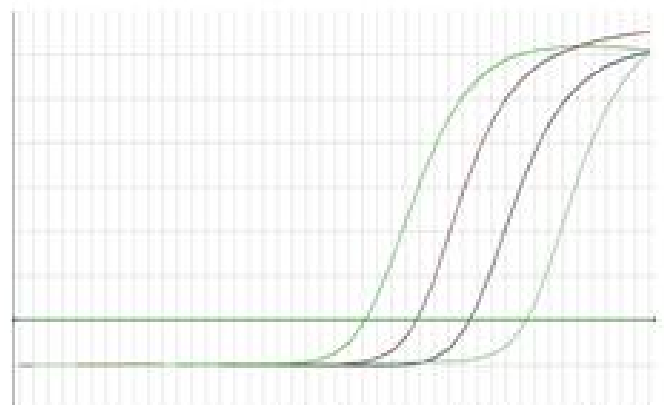
CAPÍTULO I – Diagnóstico genético pré-implantacional: conceitos, realidades e perspectivas	1
Resumo.....	2
Summary.....	3
Introdução	4
Objetivo	7
Materiais e Métodos	8
Discussão	37
Conclusão	39
Referências.....	41
CAPÍTULO II - Identificação do sexo de embriões humanos através da análise de blastômero pelas técnicas da reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) e hibridização in situ fluorescente (FISH)	55
Resumo.....	56
Summary.....	58
Introdução	60
Objetivos	66
Materiais e Métodos	66
Resultados.....	93
Discussão	101
Conclusão	109
Referências.....	110
ANEXOS	
1 – Protocolo de fixação de blastômero em lâmina para realizar FISH	119
2 – Protocolo de isolamento e envio de blastômero para PGD/PCR	120
3 – Protocolo para desenho de sondas e primers para PCR em tempo real	121
4 – Parecer do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP	122
5 – Parecer do Comitê de Ética da Universidade de Ribeirão Preto – UNAERP	123

LISTA DE ABREVIATURAS

- PGD** Diagnóstico genético pré-implantacional
- FISH** Hibridização *in situ* fluorescente (FISH)
- PCR em tempo real** Reação em cadeia da polimerase em tempo real
- FIV** Fertilização *in vitro*
- PGS ou PGD-AS** *Screening* Genético Pré-implantacional, ou *Screening* de Aneuploidia Pré-implantacional
- ZP** Zona pelúcida
- CP** Corúsculo polar
- DNA** ácido desoxirribonucléico
- QF-PCR** PCR multiplex fluorescente-quantitativa
- ADO** Falha de amplificação alélica
- PBS** Solução salina de fosfato

CAPÍTULO I*

*Diagnóstico genético pré-implantacional:
conceitos, realidades e perspectivas**



* De acordo com normas para publicação na revista *Prenatal Diagnosis*

Diagnóstico genético pré-implantacional: conceitos, realidades e perspectivas

Palavras chave: Diagnóstico genético pré-implantacional (PGD);
Hibridização *in situ* fluorescente (FISH); Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real); Fertilização *in vitro*; abortamento de repetição; blastômero humano; infertilidade.

RESUMO

Introdução: o diagnóstico genético pré-implantacional (PGD) é um procedimento o qual permite que embriões sejam testados perante uma doença genética antes de sua transferência para o útero materno, ou seja, antes do início da gestação.

Objetivos: reportar uma revisão bibliográfica sobre o PGD com suas respectivas técnicas utilizadas até o momento, sem deixar de abordar suas realidades e perspectivas.

Materiais e Métodos: essencialmente, existem dois componentes laboratoriais envolvidos no PGD. O primeiro envolve a coleta do material para ser analisado, o qual é obtido através da biópsia embrionária. O segundo, é o teste diagnóstico em si, que usualmente é realizado por duas metodologias: reação em cadeia da polimerase (PCR) ou e hibridização *in situ* fluorescente (FISH).

Conclusão: o PGD é o único teste capaz de diagnosticar desordens genéticas de um embrião antes da concepção da gestação. Assim sendo, além de melhorar os resultados da FIV, também auxilia casais com risco reprodutivo a vir a ter filhos livres da doença.

SUMMARY

Introduction: preimplantation genetic diagnosis (PGD) is a procedure that permits embryos to be tested for a possible genetic disease before being transferred to the maternal uterus, i.e., before the beginning of pregnancy.

Objectives: to perform a bibliographic survey of PGD and to report the techniques used thus far, considering their realities and perspectives.

Materials and Methods: essentially, two laboratory components are involved in PGD. The first consists of collection of the material to be analyzed by an embryo biopsy, and the second is the diagnostic test proper, which is usually carried out using two methods: polymerase chain reaction (PCR) and/or fluorescent *in situ* hybridization (FISH).

Conclusion: PGD is the only test able to diagnose the genetic disorders of an embryo before conception and gestation. Thus, in addition to improving the results of IVF, it also helps couples with a reproductive risk to have children free of disease.

INTRODUÇÃO

O diagnóstico genético pré-implantacional ou pré-implantação (*Preimplantation Genetic Diagnosis - PGD*) é proposto como um novo exame de alta tecnologia, o qual é capaz de auxiliar casais com algum risco genético reprodutivo a terem filhos saudáveis. O PGD utiliza técnicas de biologia ou de citogenética molecular durante a fertilização *in vitro* (FIV) no intuito de selecionar e transferir ao útero materno apenas embriões livres de uma condição genética específica.

A idéia original do PGD surgiu no final dos anos 60 com o intuito de identificar o sexo de embriões de coelhos que estavam na fase de blastocisto (Edwards e Gardner, 1967), de modo que futuramente a técnica pudesse ajudar casais com risco de gerarem filhos com uma doença genética ligada ao sexo, como por exemplo, a hemofilia (Griffin *et al.*, 1991; Veiga *et al.*, 1994; Van de Velde *et al.*, 2000). A primeira descrição de uma gestação onde os embriões foram pré-selecionados para evitar a transmissão de uma doença genética foi em 1990 (Handyside *et al.*, 1990). Na ocasião, foram recrutados cinco casais com risco de transmissão de doenças genéticas ligadas ao cromossomo X, incluindo retardo mental ligado ao X, Adrenoleucodistrofia, Síndrome de Lesch-Nyhan e distrofia muscular de Duchenne. Após a biópsia dos embriões, uma ou duas células de cada embrião foi submetida à lise celular e posteriormente analisada quanto à presença de um segmento do

cromossomo Y, através da técnica chamada reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction* – PCR). A PCR é capaz de amplificar milhões de cópias de uma determinada região do DNA, para que essa região possa ser estudada. No caso da região do cromossomo Y, nas células em que houve a amplificação, o embrião era masculino e os embriões femininos foram diagnosticados pela ausência de amplificação. No mesmo ano, porém alguns meses depois, outro grupo de pesquisadores descreveram também a pré-seleção de embriões perante a outra desordem genética, que no caso foi a Fibrose Cística e Deficiência de alfa1-antitripsina (Verlinsky *et al.*, 1990; Strom *et al.*, 1990). Com rápido desenvolvimento desse campo, ainda em 1990 foi realizado o primeiro simpósio internacional sobre o diagnóstico pré-implantacional em Chicago, nos Estados Unidos. Surgia um novo conceito em diagnóstico pré-natal, o diagnóstico pré-concepcional, o qual diagnostica a presença de uma determinada desordem genética, antes de se estabelecer uma gestação. Após a introdução de uma técnica chamada FISH (*Fluorescence in-situ hybridization*) para análise em célula interfásica, iniciou-se a possibilidade de analisar os embriões perante o número dos cromossomos (Griffin *et al.*, 1991; Delhanty *et al.*, 1993). Através dessa tecnologia, é possível estudar qualquer cromossomo ou parte dele em uma ou duas células retiradas de um embrião, e perante o resultado, transfere-se para o útero materno os embriões cromossomicamente normais.

O PGD requer uma estimulação ovariana e conseqüentemente a FIV para a seleção e transferência dos embriões normais após sua análise genética. Esse tipo de aplicação é de especial interesse na área da medicina reprodutiva, não só por estar diretamente envolvida, mas também, principalmente porque fatores genéticos são envolvidos na fertilidade humana. Casais portadores de uma desordem genética, seja gênica ou cromossômica, podem encontrar dificuldade de conceber espontaneamente, e freqüentemente necessitam de um auxílio médico especializado. Encontramos nesse grupo, principalmente os indivíduos que são portadores de uma translocação cromossômica balanceada, mosaicismos cromossômicos ou qualquer doença gênica que afete sua fertilidade, como por exemplo, a fibrose cística e a microdeleção do cromossomo Y. Portanto, o PGD auxilia casais inférteis não só a terem uma gestação como também os auxilia na prevenção da transmissão de uma desordem genética.

A transferência preferencial de embriões cromossomicamente normais evita gestações aneuplóides o que tem sido mostrado que diminui a incidência de abortos espontâneos, uma traumática ocorrência que afeta 10 a 15% das gestações clínicas (Laurino *et al.*, 2005). Embora um número significativo de ciclos de PGD é realizado para doenças hereditárias e rearranjos cromossômicos, os pacientes inférteis que são submetidos ao diagnóstico pré-implantacional no intuito de identificar os embriões cromossomicamente normais para

transferência em razão de aumentar os índices de sucesso do tratamento, representa o maior grupo. Esse grupo é composto primariamente por mulheres em idade reprodutiva avançada (>35 anos), as quais estão sob um maior risco de produzir oócitos com um número anormal de cromossomos (Gianaroli *et al.*, 1997; Munné e Cohen, 1998; Munné e Wells, 2002). Após estudo realizado com primeiro e segundo corpúsculo polar de 4.255 oócitos oriundos de mulheres em idade avançada, identificou-se que 42,9% desses oócitos apresentavam uma aneuploidia. Como já era esperada, a maioria das alterações encontradas eram no primeiro corpúsculo polar, resultado de erro de não disjunção na meiose I (Verlinsky e Kuliev, 2000). Em trabalho recente, após estudar aproximadamente 8.000 oócitos de mulheres acima de 35 anos, os mesmos pesquisadores reportaram que mais da metade deles possuía aneuploidia (Kuliev e Verlinsky, 2004).

OBJETIVO

Reportar uma revisão bibliográfica sobre o PGD com suas respectivas técnicas utilizadas até o momento, sem deixar de abordar suas realidades e perspectivas.

MATERIAIS E MÉTODOS

O papel das aneuploidias nas falhas gestacionais

Estudos sugerem que 50% dos embriões humanos concebidos naturalmente alcançam sua viabilidade, além disso, a maioria desses é abortada pouco antes ou logo após a implantação (Short, 1979; Edwards e Gardner, 1967). Um quadro similar de mortalidade embriônica é observado na FIV, onde uma proporção significativa de embriões tem seu desenvolvimento interrompido durante os primeiros dias após a fertilização. Daqueles que sobrevivem e são transferidos para o útero materno, apenas uma minoria resulta em um nascimento. Dentro dos múltiplos fatores que podem influenciar negativamente na sobrevivência dos embriões, a anormalidade cromossômica é o fator mais importante. O desenvolvimento de uma célula zigótica em um feto é um processo altamente complexo que requer um controle impecável e preciso da expressão gênica. O desbalanço cromossômico (aneuploidia) usualmente tem um efeito catastrófico no desenvolvimento embrionário, com alteração na expressão de centenas de genes. Por esse motivo, não é surpresa que praticamente todas as monossomias são letais e a grande maioria das trissomias leva a perda gestacional precoce. A letalidade do desbalanço cromossômico é enfatizada por estudos de materiais de abortos espontâneos, os quais revelam que a grande maioria de embriões que

foram abortados possui aneuploidia (Boue *et al.*, 1975; Hassold *et al.*, 1980).

A análise citogenética pré-implantacional de embriões humanos usando a tecnologia da FIV, tem revelado altos índices de alterações cromossômicas no estágio inicial do desenvolvimento embrionário (Harper *et al.*, 1995; Delhanty *et al.*, 1997; Munné e Cohen., 1998). A maioria das anormalidades cromossômicas detectadas nesse estágio parece ser letal e a sua ocorrência pode explicar a proporção significativa de falhas nos ciclos de FIV. Apesar de não ser possível determinar se as anormalidades cromossômicas são igualmente comuns na fertilização natural, sabemos que esses níveis também são altos.

A taxa de sucesso gestacional varia muito entre diferentes clínicas em todo o mundo, porém a probabilidade de arquivar uma gestação através da FIV é em geral 30% por embrião transferido. Na grande maioria dos casos, vários embriões são gerados em cada tratamento e as clínicas de FIV selecionam os embriões a serem transferidos baseando-se nas características morfológicas, tais como o número de blastômeros gerados após a fertilização, e o índice de fragmentação, que são indicadores de viabilidade embrionária. Independente da idade materna, mais de 50% dos embriões gerados por fertilização possui anormalidades cromossômicas (Munné *et al.*, 2006). Porém, como muitos embriões aneuplóides apresentam morfologia normal durante a fase de desenvolvimento pré-implantacional, a avaliação

morfológica é insuficiente para a exclusão de anormalidades cromossômicas. Deste modo, sugere-se que a eficiência das técnicas de reprodução assistida poderia ser melhorada se os embriões cromossomicamente normais fossem selecionados antes da transferência. Em um esforço de melhorar as taxas de gestação ao identificar os embriões que são cromossomicamente normais, alguns centros de infertilidade estão introduzindo testes especificamente desenvolvidos para uma triagem citogenética desses embriões (Munné *et al.*, 1998; Gianaroli *et al.*, 1997; Munné e Wells, 2002). Esses tipos de testes focam o uso da tecnologia desenvolvida para o diagnóstico genético pré-implantacional (PGD), e hoje a metodologia é chamada de *Screening* Genético Pré-implantacional (PGS), ou *Screening* de Aneuploidia Pré-implantacional (PGD-AS). Considera-se prudente e benévolo realizar a biópsia embrionária para o PGS referente à idade avançada, em mulheres acima de 37 anos que gerem ao menos seis embriões em condições de biópsia (Munné *et al.*, 2002a). Para mulheres que geram um número muito pequeno de embriões, é discutível o uso do PGD. A Tabela 1 mostra o aumento da taxa de implantação após o PGS conforme a idade gestacional. Entre as outras indicações de PGS, destacam-se a falha repetitiva de implantação e abortamento recorrente.

Tabela 1 – Aumento da taxa de implantação embrionária devido ao auxílio do PGD, de acordo com a idade materna

Idade	Taxa de implantação	Taxa de implantação	Melhora devido
	em controles (%)	após o PGD (%)	ao PGD (%)
35 – 37	26	31	+5
37 – 39	19	22	+3
39 – 42	13	20	+7
39 – 45	11	18	+7
42 – 45	3	11	+8

Munné et al. 2002

Biópsia embrionária

O primeiro passo para se realizar o PGD é a obtenção adequada do material para a análise. As técnicas de micromanipulação são usadas em todos os casos, porém, existem diferentes metodologias para perfurar a zona pelúcida (ZP) e realizar a biópsia de blastômero. A biópsia embrionária no estágio inicial de clivagem é a metodologia mais usada mundialmente. A grande maioria dos programas de PGD realiza a biópsia embrionária no terceiro dia após fecundação, quando o embrião está no estágio de 6 a 10 células.

Um ponto de discussão é o número de células que devem ser biopsiadas. Usualmente, o biólogo molecular ou o indivíduo que irá realizar a análise genética prefere mais de um blastômero para assegurar

seu diagnóstico, no entanto, o embriologista que realiza a fertilização elege a remoção de apenas um blastômero como melhor opção, pois minimiza o efeito negativo da manipulação e da redução celular embrionária. Dependendo de cada caso (numero de embriões, qualidade embrionária, etc.), um balanço tem que ser estabelecido entre o número de células a ser retirado e a acurácia do diagnóstico. A biópsia do trofoectoderma no estágio de blastocisto proporciona um número maior de células para ser analisadas, contudo, infelizmente melhorias devem ser feitas para aumentar a eficiência e permitir a aplicação clínica dessa técnica (Veiga *et al.*, 1997). Portanto, o PGD no estágio de blastocisto pode ser uma solução no futuro, no momento trata-se de uma técnica experimental. Antes de iniciar o procedimento da biópsia embrionária é importante a identificação do blastômero a ser removido para a análise, pois o orifício na ZP tem que ser feito próximo da célula que vai ser selecionada. Preferencialmente, o núcleo deve ser visualizado no blastômero escolhido para se obter o sucesso diagnóstico.

Existem três diferentes possibilidades para se perfurar a ZP: manipulação mecânica, perfuração química com ácido Tyrode ou metodologia a laser. A limitação da primeira técnica é a dificuldade de se criar um orifício de tamanho consistente e em tempo hábil. Por essa razão, as outras duas metodologias são as mais usadas. A possibilidade de uma “intoxicação” embrionária é a principal objeção para se usar a solução com o ácido Tyrode. Quando a solução ácida é usada para abrir

o orifício na ZP, o procedimento tem que ser feito com grande cuidado para não haver exposição excessiva do ácido Tyrode em grande extensão na ZP para não prejudicar o desenvolvimento do embrião. A lavagem do embrião após a exposição ao ácido é recomendada para evitar acidificação do meio e lise celular. O uso de um laser facilita todo o procedimento e evita o uso do ácido Tyrode. Através do laser é mais fácil, rápido e preciso se fazer uma biópsia embrionária ou de CP, pois por meio dele, aumenta-se a eficiência da biópsia pelo fato de diminuir o tempo necessário para o procedimento, evita o uso de solução ácida e aumenta o controle sobre a perfuração da ZP (Boada *et al.*, 1998). Existem descrições de diferentes sistemas para o uso do laser na abertura da ZP, basicamente com propósito do uso em PGD ou *assisted hatching*. Em todos os casos, a ZP é micro-perfurada através da exposição a uma pequena radiação do laser que gera orifícios padrões pela fototermólise de proteínas da matriz. Existem dois tipos de sistema de laser: a) lasers de contato e b) laser sem contato. O sistema sem contato possui várias vantagens na aplicação clínica e elimina o risco de contaminação. Dependendo do comprimento de onda, alguns emitem radiação ultravioleta que é fortemente absorvida pela água, tem baixa penetração de profundidade e podem potencialmente gerar efeitos mutagênicos, enquanto outros emitem ondas de comprimento longo que são menos absorvidos pela água. Muitos centros optam pelo sistema de laser sem contato (infravermelho com onda de comprimento de 1.48 μ m),

pois proporciona uma absorção mínima pelo material de cultura, é de fácil adaptação pelo microscópio e tem sido demonstrado que perfura a ZP sem efeito mecânico, térmico ou mutagênico (Germond *et al.*, 1995).

Pelo menos três tipos diferentes de biópsia embrionária foram descritos: divisão mecânica, extrusão e aspiração (Tarin e Handyside, 1993). O método de divisão mecânica requer a remoção total da ZP e após a biópsia do blastômero, o com o embrião sem ZP pode levar a danos no seu desenvolvimento. Adicionalmente, essa metodologia é impraticável e não é usada para o PGD em humanos. Já o método de extrusão, é realizado após a perfuração da ZP. O blastômero é retirado através do orifício gerado através de três metodologias possíveis, primeiro, por uma extração com uma pipeta (Gordon e Gang, 1990). Segundo, por deslocamento do blastômero com uma delicada injeção com meio de cultura através do orifício (Roudebush *et al.*, 1990; Pierce *et al.*, 1997) ou terceiro, com o uso de uma micro-agulha através de movimentos delicados. Já o método por aspiração é o mais usado mundialmente para a prática do PGD em humanos (Handyside *et al.*, 1990; Veiga *et al.*, 1994). Através desse método, o blastômero é removido por sucção usando uma pipeta de biópsia de diâmetro similar ao do blastômero.

Biópsia de corpúsculo polar

A reprodução sexual ocorre através da fertilização, quando dois gametas haplóides entram em singamia e produzem um indivíduo geneticamente distinto. A meiose é o processo pelo qual um organismo diplóide ($2n$) é reduzido para a forma haplóide (n), originando os gametas. Para que cada célula filha obtenha uma única cópia do par de cromossomos da célula mãe, as células diplóides sofrem três passos específicos na meiose: pareamento e sinapse dos cromossomos homólogos, *crossover* recíproco formando a estrutura bivalente, e finalmente a separação dos cromossomos homólogos na primeira divisão meiótica. Já a Meiose II, se resume em um passo de apenas em divisão mitótica, formando duas células com o mesmo material genético. Qualquer erro em um desses processos pode resultar em uma aneuploidia ou uma falha de segregação meiótica (Nicklas, 1974). Infelizmente, “errar (meioticamente) é humano” (Hassold e Hunt, 2001) e parece que o erro não se baseia nem na falta de habilidade do pareamento, como também na recombinação cromossômica, e sim na competência da formação, controle e operação do fuso meiótico nos oócitos em mulheres com idade avançada. Embora o erro meiótico seja comum, essa característica será parcialmente atenuada: a grande maioria dos ovos anormais será selecionada através da falha de implantação ou pelo aborto espontâneo dos conceptos cromossomicamente anormais,

que são responsáveis por mais de 60% de todos os abortos de primeiro trimestre de gestação.

Em 1990, Verlinsky e colaboradores foram os pioneiros no diagnóstico pré-concepcional das desordens genéticas monogênicas. A metodologia emprega a análise do primeiro corpúsculo polar (1CP) isolado ou em combinação com o segundo corpúsculo para determinar o status genético desse oócito. Pouco tempo depois, dois autores isoladamente (Verlinsky *et al.*, 1995; Munné *et al.*, 1995) descreveram a viabilidade de se analisar o 1CP e/ou o 2CP perante o número de cromossomos, através da técnica de FISH. Uma vez sabendo que as aneuploidias dos autossomos ocorrem predominantemente na meiose I materna (Hassold *et al.*, 1987, 1991; Antonarakis, 1991), a análise cromossômica do 1CP pode detectar a grande maioria das aneuploidias autossômicas encontradas em blastômeros. Desde que o 1CP é a imagem complementar do ovo, a ocorrência de um cromossomo ou cromátide extra, implicará que no ovo está faltado esse mesmo cromossomo. Já na segunda divisão meiótica, se a cromátide extra é distribuída favoravelmente no 2CP, isso implicaria que o embrião é cromossomicamente normal (Angell, 1997). Assim sendo, o 2CP deve ser analisado para prevenir possíveis erros diagnósticos.

A biópsia do CP possui pelo menos três vantagens sobre a biópsia embrionária. A primeira delas é no parâmetro da ética, pois existe uma grande diferença em se descartar oócitos cromossomicamente

anormais do que descartar embriões. Além disso, em países que possuem leis ultra-conservadoras como a Alemanha e o Chile, a biópsia embrionária não é permitida, sendo a biópsia de CP o único meio de se estudar geneticamente esses embriões. A segunda vantagem é que alguns autores pregam que na biópsia embrionária pode haver alguma lesão para o desenvolvimento embrionário, conseqüentemente diminuindo o sucesso da taxa de fertilização, clivagem ou formação de blastocisto, o que não aconteceria se a biópsia fosse de corpúsculo polar (Verlinsky e Kuliev, 1993). Por ultimo, se considerar que 30% dos embriões são mosaicos e se remover um único blastômero para análise, aproximadamente 5% dos casos haveria um falso diagnóstico normal.

Contudo, a biópsia de CP também possui suas desvantagens. A primeira delas é o numero de sinais do FISH. Usando sondas específicas para cada cromossomo, aparecem dois sinais, um sinal por cromatina. Isso não seria problema se a pré-divisão das cromátides não acontecer, porém, isso frequentemente pode ocorrer (Sandalinas *et al.*, 2002), assim, um sinal de uma cromátide pode confundir com um sinal de um cromossomo se os dois sinais estiverem sobrepostos. Além disso, a pré-divisão parece aumentar artificialmente em ambos os corpúsculos polares e no óvulo com o aumento do tempo em cultura (Munné *et al.*, 1995; Dailey *et al.*, 1996). Outra desvantagem da biópsia de CP é a perda artificial dos cromossomos durante a fixação ou a falta de penetração da sonda em algumas formas da cromátide

(Verlinsky e Kuliev, 1996; Rosenbusch *et al.*, 2001). Por último, uma das maiores desvantagens do diagnóstico pré-inseminação das aneuploidias é que as aneuploidias e aberrações cromossômicas herdadas paternalmente ocorrem na fase pós-zigótica, como a poliploidia, haploidia e alguns mosaicos, e portanto, não podem ser diagnosticadas.

No entanto, atualmente a análise embrionária através da biópsia do CP é utilizada quase que exclusivamente por um grupo, a vasta maioria dos centros que realizam PGD no mundo utilizam a biópsia embrionária na sua rotina (Thornhill e Snow, 2002).

Análise embrionária de alterações cromossômicas

Para a o diagnóstico de anormalidades cromossômicas, o método ideal seria a análise através de cariótipo, onde se visualiza todos os cromossomos e seus segmentos, mas se obter um cariótipo de embriões antes da implantação é muito difícil e problemático. Portanto, o método de escolha é a hibridização *in situ* com fluorescência em células interfásicas (FISH – *fluorescent in situ hybridization*). Nessa técnica, a sonda de DNA é diretamente marcada pela incorporação de um precursor de nucleotídeo marcado com fluorescência. Pode-se estudar praticamente qualquer fragmento cromossômico, cada um com uma coloração diferente. Portanto, a FISH usa sondas específicas de DNA fluorescentes que se liga a regiões cromossômicas específicas. A análise é feita através

da visualização dos sinais que apresentam colorações diferentes sob um microscópio de fluorescência. A coloração diferente de cada sinal é possível através de filtros com comprimento de onda apropriados para cada fluoróforo incorporado a cada sonda (*red, green, blue, yellow, aqua* e *DAPI*). Podem-se usar sondas de FISH para os cromossomos sexuais em casos de doenças ligadas ao cromossomo X (ligadas ao sexo), dos autossomos em casos de translocação ou trissomias, ou ambas ao mesmo tempo para diagnosticar as aneuploidias mais comuns encontradas em abortamento como dos cromossomos X, Y, 13, 14, 15, 16, 18, 21 e 22 (Gianaroli *et al.*, 1999 e 2005) (Figura 1). Esse tipo de triagem é recomendado principalmente para casais que respondem mal a FIV ou com aborto de repetição sem causa aparente e idade materna reprodutiva avançada (Verlinsky *et al.*, 2005; Munné, 2006). Em estudo realizado recentemente, mostra que o índice de embriões com alterações cromossômicas em casais com abortamento de repetição é bem maior que em casais controles, 70,7% e 45,1% respectivamente (Rubio *et al.*, 2003), conseqüentemente justificando o uso do PGD/PGS em casais com aborto de repetição. Se considerarmos as aneuploidias viáveis, ou seja, ao nascimento, usando as sondas X,Y, 13, 18 e 21, elimina-se 95% dos casos (Harper e Wells, 1999).

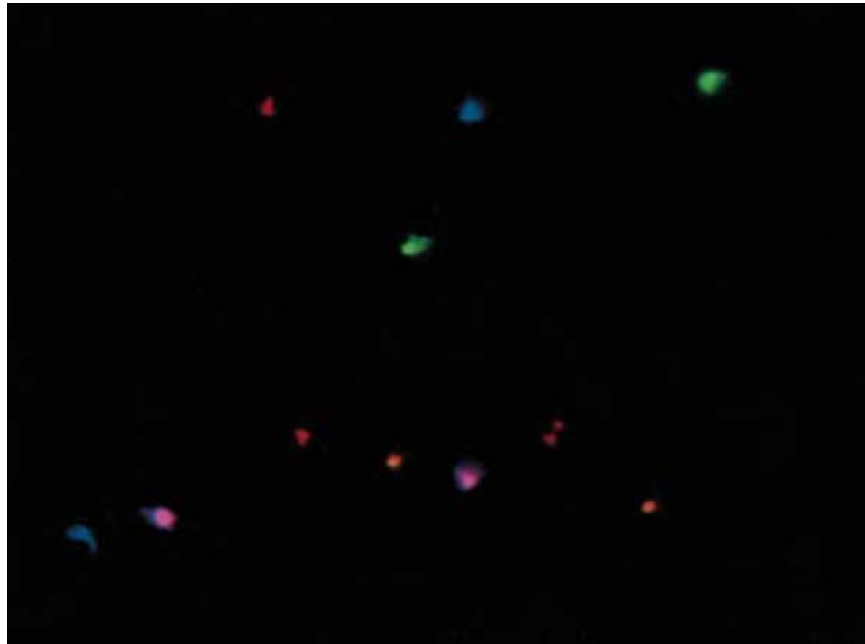


Figura 1 – Análise de um blastômero por FISH, evidenciando uma trissomia do cromossomo 21 (cromossomo X (azul); Y (branco); 13 (amarelo); 16 (verde); 18 (rosa) e 21(vermelho). (Munné e Cohen, 1998)

Portadores de translocação cromossômica

A frequência de translocação cromossômica é significativamente maior em casais inférteis (0,6%) se compararmos com a população geral (0,2%) (Hook e Hamerton, 1977). Essa incidência é ainda maior em casais com história de múltiplas falhas em FIV ou abortos recorrentes (3,2% e 9,2% respectivamente) (Stem *et al.*, 1999). Nos últimos anos, o PGD é oferecido para portadores de translocação cromossômica com o intuito de aumentar os resultados de fertilização

através da transferência de embriões cromossomicamente normais ou balanceados.

Portadores de translocação cromossômica produzem uma alta proporção de gametas geneticamente anormais e conseqüentemente apresentam um alto risco de aborto espontâneo, falha de implantação embrionária ou gerar filhos cromossomicamente alterados. Estudos com gametas de indivíduos portadores de translocação revelam uma alta freqüência de anormalidades cromossômicas em espermatozóide. A freqüência dessas anormalidades pode ir de 4 a 40% em casos de translocação robertsoniana e 47 a 51% nas translocações recíprocas (Egozcue *et al.*, 2000).

A Tabela 2 mostra dados de recente estudo onde foram analisados embriões de 28 portadores de translocação robertsoniana ou recíproca os quais foram submetidos a 43 ciclos de PGD. Foram avaliados 172 embriões usando-se as sondas para as translocações específicas, desse total 166 foram analisados perante os cromossomos 13, 16, 18, 21 e 22, e 107 para os cromossomos sexuais. No caso de portadores da translocação Robertsoniana a proporção de embriões com anormalidades devido à translocação foi de 21%, envolvendo as aneuploidias comuns contribuíram com 31% do total das anormalidades, ao passo que um restante de 36% dos embriões tiveram anormalidades envolvendo os dois tipos de alteração. Já a mesma análise embrionária no grupo de translocação recíproca, obteve 65% dos embriões com

alteração para os cromossomos translocados, apenas 6% envolvendo as aneuploidias comuns, e 16% dos embriões eram portadores de ambas as anormalidades. Com esses resultados os autores postularam que deve haver um efeito intercromossômico que envolve os outros cromossomos além dos envolvidos na translocação no caso dos portadores de translocação Robertsoniana. Portanto, no caso de PGD para translocações Robertsonianas é plenamente justificável o uso das sondas para as aneuploidias mais comuns além das sondas utilizadas para a translocação (Gianaroli *et al.*, 2002).

Tabela 2 – Anormalidades cromossômicas em embriões gerados por portadores de translocação Robertsoniana (Rob) ou recíproca (Rec)

(Adaptado de Gianaroli *et al.*, 2002)

	Rob (%)	Rec (%)
N° de embriões diagnosticados	111	61
N° de FISH anormais	85 (77)	54 (89)
Relacionados à translocação	18 (21) ^a	35 (65) ^a
Qualquer anormalidade (translocação+aneuploidia)	31 (36) ^b	9 (16) ^b
Alterações não relacionadas à translocação	26 (31) ^c	3 (6) ^c
Haploidia/poliploidia	10 (12)	7 (13)

^acP < 0,001 / ^bP < 0,025

Análise embrionária de mutações gênicas

A técnica de FISH é a mais utilizada para sexagem de embriões humanos nos laboratórios em todo o mundo. Nesse sentido, quando há necessidade de selecionar embriões pelo sexo pelo fato de um dos genitores possuírem uma desordem genética ligada ao cromossomo X, utiliza-se a FISH, pois além da seleção pelo sexo, a técnica também é capaz de detectar aneuploidias dos cromossomos sexuais bem como de outros cromossomos (13,16,18 e 21) (Munné *et al.*, 1993, 1998; Staessen *et al.*, 1999). Porém, a FISH apenas detecta a presença dos cromossomos sexuais, não podendo detectar a discriminação alélica gênica em casos de embriões do sexo masculinos normais ou femininos portadores. Além disso, quando a desordem herdada é de caráter gênico que é o caso das doenças monogênicas, a técnica de FISH não pode ser utilizada.

A principal alternativa para o PGD de doenças monogênicas é a PCR, pois é um método *in vitro* rápido e versátil para a amplificação de seqüências-alvo de DNA pré-definidas presentes em uma amostra de DNA. Geralmente, o método é programado para permitir a amplificação seletiva de uma(s) seqüência(s)-alvo de DNA específica(s) a partir de uma coleção heterogênea de seqüências de DNA (p.ex. DNA genômico total ou uma população complexa de cDNA). Para permitir tal amplificação seletiva, alguma informação prévia a respeito das seqüências-alvo é necessária. Essa informação é utilizada para desenhar

dois oligonucleotídeos iniciadores (*primers* ou amplificadores), os quais são específicos para a seqüência-alvo e apresentam, com freqüência, cerca de 15 a 25 nucleotídeos de extensão.

Após os *primers* terem sido adicionados ao DNA-molde desnaturado, eles se ligam especificamente às seqüências de DNA complementares ao seu sítio-alvo. Na presença de uma DNA-polimerase termoestável apropriada e de precursores de DNA (os quatro desoxirribonucleosídeos trifosfatos, dATP, dCTP, dGTP e dTTP), eles iniciam a síntese de novas fitas de DNA, que são complementares a cada uma das fitas de DNA do segmento-alvo de DNA e que irão se sobrepor.

A PCR é uma reação em cadeia porque as fitas de DNA, recentemente sintetizadas, irão atuar como moldes para mais uma síntese de DNA nos ciclos subseqüentes. Após cerca de 25 ciclos de síntese de DNA, os produtos da PCR irão incluir, além do DNA que iniciou a reação, cerca de 10^5 cópias da seqüência-alvo específica, uma quantidade que é facilmente visualizada como uma banda distinta de tamanho específico quando submetida à eletroforese em gel de agarose ou outro método de detecção.

Através da PCR podem-se amplificar seqüências a partir de quantidades ínfimas de DNA, e até mesmo em uma única célula haplóide (n), como os gametas (Li *et al.*, 1988). Tal sensibilidade tem fornecido novos métodos para o estudo da origem molecular de doenças e tem encontrado numerosas aplicações na ciência forense, no

diagnóstico, na análise de ligações genéticas, e nos estudos paleontológicos moleculares, em que as amostras podem conter um número insignificante de células. A PCR pode identificar uma (singleplex) ou mais seqüência de DNA (multiplex) ao mesmo tempo. Já existe descrição na literatura de detecção de mais de 100 mutações ao mesmo tempo usando PCR multiplex em conjunto com outras metodologias (Shuber *et al.*, 1997). Em célula única a análise de múltiplos *loci* é complicada pela presença de mínima quantidade de DNA. No entanto, com auxílio de uma técnica chamada *whole-genome amplification* (WGA) a qual utiliza oligos degenerados (seqüências aleatórias de DNA) e amplifica o DNA genômico em pelo menos 30 vezes, já foi possível analisar em um único blastômero as duas mutações mais comuns para a doença de Tay-Sachs (exon11/intron 12) , Hemofilia A (exon 11/ inton 12), o polimorfismo do gene responsável pela Hemofilia A (*FVIII* – intron 18), a mutação mais comum para Fibrose Cística (ΔF -508), além do gene *ZFX/ZFY* que informa o sexo em caso de doenças ligadas ao cromossomo X (Snabes *et al.*, 1994).

Existem várias estratégias baseadas em teste de PCR que podem ser utilizadas no PGD. Através dessas estratégias já foram descritos PGD de dezenas de doenças monogênicas, e hoje teoricamente é possível realizar o PGD para qualquer doença gênica, a qual se saiba que mutação a causou (Tabela 3). Uma das estratégias mais promissoras é a PCR multiplex fluorescente-quantitativa (QF-PCR). Através da QF-

PCR podem-se detectar defeitos gênicos, a presença do cromossomo X e Y, como também as aneuploidias mais comuns (cromossomos 13, 18, 21). O método utiliza a identificação do número de cromossomos através de marcadores STR (*Short tandem repeat*), os quais vão evidenciar três alelos (trissomia tri-alélica) ou quantificar os dois alelos nos casos de trissomias di-alélica (Figura 2). O princípio para a quantificação é que teoricamente na fase exponencial da PCR, a quantidade produzida é proporcional à quantidade inicial (Ferre, 1992). Esse conceito é fundamental para o desenvolvimento de todos os métodos de PCR quantitativa na atualidade. Após a amplificação do DNA realizada em poucos ciclos, o produto é analisado através de um capilar de eletroforese que em conjunto com um *laser* detecta e quantifica esse produto amplificado. Por meio desse método de detecção do produto da PCR, pode-se aumentar a sensibilidade do método em mil vezes se comparar com a detecção por brometo de etídio que é o método mais utilizado (Thornhill e Snow, 2002).

Tabela 3 – Doenças monogênicas que já foi realizado PGD

<p>Achondroplasia Adenosine Aminohydrolase (ADA) Deficiency Adrenoleukodystrophy (X-Linked ALD) Alpha 1 Antitrypsin Deficiency Alpha-L-Iduronidase (IDUA) Alport Syndrome (X-Linked) Angioedema, Hereditary Ataxia-Telangiectasia (AT) Basal Cell Nevus Syndrome (Gorlin Syndrome) Blepharophimosis, Ptosis, and Epicanthus Inversus Blood Group - Kell Cellano System Brain Tumor, Posterior Fossa of Infancy, Familial Ceroid Lipofuscinosis, Neuronal 2. LAE Infantile. CLN2 (Batten Disease) Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1A (CMT1A) Charcot-Marie-Tooth Disease Type 1B (CMT1B) Charcot-Marie-Tooth Disease, Axonal, Type 2E Charcot-Marie-Tooth Disease, 1 (CMTX1) Choroideremia (CHM) Citrullinemia, Classic Colon Cancer, Familial Nonpolyposis, Type1 Congenital Adrenal Hyperplasia (CAH) Crouzon Syndrome (Craniofacial Dysostosis) Currarino Triad Cystic Fibrosis (CF) Cystinosis (CTNS) Darier-White Disease (DAR) Diamond-Blackfan Anemia (RPS19) Dyskeratosis Congenita, X-Linked Dystonia Torsion (DYT1) Early-Onset Familial Alzheimer Disease Ectodermal Dysplasia 1, Anhidrotic (ED1) Ectodermal Dysplasia 3, Anhidrotic Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy, AD (EDMD3) Emery-Dreifuss Muscular Dystrophy, AR (EDMD3) Epidermolysis Bullosa Dystrophica, Pasini Epiphyseal Dysplasia, Multiple, 1 (EDM1) Exostoses, Multiple, Type 1 Exudative Vitreoretinopathy, Familial, AD Fabry Disease Faciocapulothoracic Muscular Dystrophy Familial Adenomatous Polyposis Familial Dysautonomia (Riley-Day Syndrome, DYS) Fanconi Anemia A (and HLA) Fanconi Anemia C (and HLA) Fragile-X A Syndromes (FMR1) Fragile-X E Syndromes Friederich Ataxia 1 (FRDA) Galactosemia Gaucher Disease, Type 1 Glycogen Storage Disease, Type VI Hemophilia A Hemophilia B HLA Matching Genotyping HLA + Diamond-Blackfan Anemia (DBA) Holoprosencephaly Hunter Syndrome (Mucopolysaccharidosis II) Huntington Chorea</p>	<p>Hurler Syndrome (Mucopolysaccharidosis I) Hydrocephalus, X-Linked (L1CAM) Hoyeraal-Hreidarsson Syndrome (HHS) Hypophosphatasia (Infantile) Immunodeficiency with Hyper-IgM, Type 1 Incontinentia Pigmenti (IP) Krabbe Disease Leukoencephalopathy with Vanishing White Matter Li-Fraumeni Syndrome (Mutations in p53 Gene) Long-Chain Hydroxyacyl-CoA Dehydrogenase Marfan Syndrome Metachromatic Leukodystrophy 5,10-Methylenetetrahydrofolate Reductase (MTHFR) Mucopolysaccharidosis, Type 2 Multiple Endocrine Neoplasia, Type 1 Muscular Dystrophy, Duchenne Type (DMD) Muscular Dystrophy, Becker Type (BMD) Myotonic Dystrophy (DM1) Myotubular Myopathy 1 Neurofibromatosis, Type 1 Neurofibromatosis, Type 2 Norrie Disease Oculocutaneous Albinism, Type 1 Oculocutaneous Albinism, Type 2 Omenn Syndrome Optic Atrophy Ornithine Carbamoyltransferase (OTC) Deficiency Osteogenesis Imperfecta (Col1A1,Col1A2) Osteopetrosis, Malignant, Autosomal Recessive Pelizaeus-Merzbacher Disease Phenylketonuria Polycystic Kidney Disease Autosomal Dominant, 1 Polycystic Kidney Disease Autosomal Dominant, 1 Polycystic Kidney Disease Autosomal Recessive Popliteal Pterygium Syndrome Propionic Acidemia Retinitis Pigmentosa Retinoblastoma (RB1) Rett Syndrome Sandhoff Disease Sickle Cell Anemia Spinal Muscular Atrophy (SMA) Spinocerebellar Ataxia, Type 1 Spinocerebellar Ataxia, Type 2 Spinocerebellar Ataxia, Type 3, (MJD) Spinocerebellar Ataxia, Type 6 Succinic Semialdehyde Dehydrogenase Deficiency Symphalangism Proximal (SYM1) Tay-Sachs Disease (TSD) Thalassemia Alpha Thalassemia Beta Treacher Collins Syndrome Tuberous Sclerosis, Type 1 Tuberous Sclerosis, Type 2 Von Hippel-Lindau Syndrome (VHL) Wiscott Aldrich Syndrome Zellweger Syndrome</p>
---	---

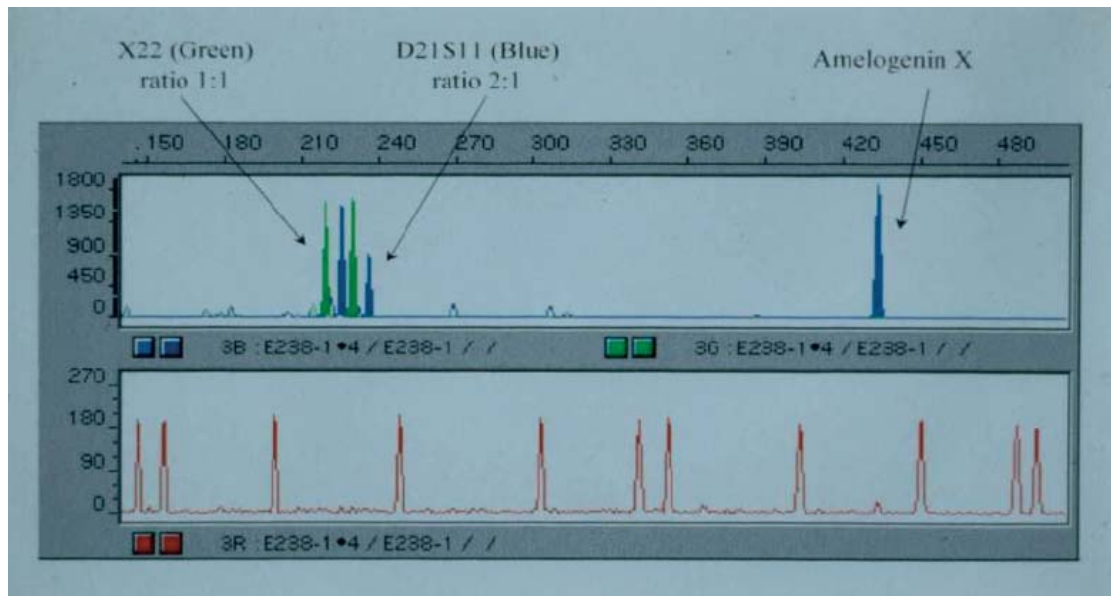


Figura 2 – Análise de blastômero através de PCR fluorescente quantitativa (QF-PCR)

Note a relação de 2:1 no marcador do cromossomo 21(em azul) evidenciando uma trissomia di-alélica; pode-se visualizar também a relação 1:1 do marcador do cromossomo X (X22) o que diagnostica um blastômero do sexo feminino sem aneuploidia do cromossomo X (Sato et al. 2003).

Eficiência de amplificação, amplificação preferencial e falha de amplificação alélica

A eficiência de amplificação a nível de célula única é um grande obstáculo para o PGD, pois a quantidade limitada de DNA (~6,6pg) em uma célula diplóide leva a problemas como falha de amplificação, amplificação alélica preferencial, falha de amplificação alélica (ADO- *allele drop-out*) em casos de heterozigose. Além disso, problemas durante o delicado processo de isolamento da célula podem advir como perda da célula no transporte até o micro-tubo de PCR.

Fatores intrínsecos como células degeneradas ou anucleadas concomitantemente DNA degenerado ou ausente, são os fatores mais abstrusos de se controlar. Além disso, blastômeros provenientes de embriões de baixa qualidade estão relacionados com amplificação pobre, enquanto que os embriões de alta qualidade geram boa eficiência de amplificação, desse modo, a importância da escolha do blastômero no momento da biópsia é fundamental (Cui e Matthews, 1996). Após transferir a célula com sucesso para o micro-tubo de PCR, o protocolo de lise celular torna-se um fator importante. Embora existam vários protocolos consistentes para lise de célula única (Proteinase K, solução alcalina, congelamento e descongelamento, etc.), não existe um consenso de qual deles é melhor, depende da prática do laboratório e o que vai se fazer sucessivamente após a lise (Harper *et al.*, ESHRE PGD Consortium data collection V 2006; Thornhill e Snow, 2002).

A ADO é um fenômeno que ocorre na reação de célula única ou mínima quantidade de DNA, onde apenas um dos dois alelos amplifica (Ray *et al.*, 1994; Findlay *et al.*, 1995). Isso pode não alterar o resultado em casos onde os dois alelos são iguais (homozigoto), porém pode ter resultados catastróficos em heterozigotos, onde os dois alelos são diferentes. A ADO pode ocorrer tanto com blastômero como corpúsculo polar, e apesar de haver discordância, há autores que referem uma porcentagem menor de ADO em corpúsculo polar (Rechitsky *et al.*, 1998).

Existem várias teorias para explicar a origem da ADO, que pode estar relacionado com DNA degenerado, permitindo quebras em ambas as fitas. Outra possibilidade é que a ADO resulte de inacessibilidade ao DNA devido a condições imperfeitas de lise celular (Piyamongkol *et al.*, 2003). Métodos para aumentar a eficiência de amplificação ou minimizar o efeito da ADO têm sido propostos, e incluem a PCR altamente sensíveis como a PCR fluorescente (Findlay *et al.*, 1995), aumento da temperatura de denaturação da PCR (Ray e Handyside, 1996) e o uso de solução de lise apropriada (El-Hashemite e Delhanty, 1997; Thornhill *et al.*, 2001). Porém, nenhuma dessas medidas elimina consistentemente a ADO, e os laboratórios de PGD mais experientes conseguem reduzir a taxa de ADO para 5-15%. No entanto, altas taxas de ADO não são incomuns e em alguns casos afeta mais de 40% das amplificações, comprometendo severamente o resultado das reações (Piyamongkol *et al.*, 2003).

Mosaicismo embrionário

O mosaicismo refere-se à presença de duas ou mais linhagens celulares em uma pessoa ou amostra de tecido. A alta frequência de mosaicismo encontrada após a análise de embriões através da técnica de FISH restrita a um pequeno número de cromossomo é assunto de crítica, e visto como um artefato da técnica. No entanto, altas taxas de mosaicismo também têm sido encontradas através de outras

técnicas como PRINS (Pellestor, 1996) e cariótipo (Almeida e Bolton, 1996). Mas também é evidente que os estudos de mosaicismo não são ideais, uma vez que para se calcular a taxa de mosaicismo verdadeira, todas as células do embrião devem ser estudadas. O início do mosaicismo no desenvolvimento embrionário pode ser determinado, como todos os blastômeros de um embrião monospérmico são anormais, uma vez que a anormalidade ocorreu durante a primeira divisão celular. Quando a metade ou um quarto dos blastômeros são anormais, o mosaicismo surgiu na segunda ou terceira divisão celular respectivamente (Munné *et al.*, 1994). Impressionante diferença no mecanismo e início do mosaicismo ocorre quando comparamos a haploidia em embriões monoespérmicos com diespérmicos. Embriões mosaicos poliplóides e haplóides são usualmente gerados na segunda divisão celular em diante. Os resultados sugerem que em embriões diplóides, a singamia pronuclear usualmente ocorre corretamente, uma vez que o mosaicismo é gerado de aberrações mitóticas.

Os tipos de mosaicismo encontrados no estágio de clivagem embrionária são mais diversos que aqueles observados em abortos espontâneos, provavelmente porque alguns desses embriões são incompatíveis com a implantação (Sandalinas *et al.*, 2001). Uma classificação sugerida para o mosaicismo é através da ploidia (mosaico haplóide, diplóide ou poliplóide), e de acordo com o mecanismo (não disjunção, endo-reduplicação, mosaicos caóticos, diplóides ou outra

haploidia). Outro modo de classificação sugerido é distinguir embriões mosaicos de acordo com sua origem (mosaico, não disjunção, $2n/4n$) e os caóticos não são classificados como mosaicos (Harper *et al.*, 1995; Harper e Delhanty, 1996). Os tipos de mosaicismo mudam com o desenvolvimento embrionário, pré-embriões diplóides/tetraplóides iniciam seu desenvolvimento normalmente e se tornam embriões, já as formas poliplóides são comuns em pré-embriões usualmente descartados (Sandalinas *et al.*, 2001; Bielanska *et al.*, 2002). Enquanto a aneuploidia é significativamente encontrada em maior frequência com o avanço da idade tanto em óvulos como em embriões, para o mosaicismo a idade avançada não parece ser um fator de risco. No entanto, Munné *et al.*, (2002) reportaram que a média da idade materna de embriões mosaicos causados por não disjunção mitótica era substancialmente maior que para embriões normais ou outro tipo de mosaico embrionário.

Apesar de ainda não ter sido comprovado em laboratório, tem-se sugerido repetitivamente que as células anormais entre o mosaico possuem um menor potencial de desenvolvimento que a linhagem normal, e usualmente terminam o seu desenvolvimento no trofoectoderma. Os mosaicos com linhagem diplóide/tetraplóide podem representar um processo de desenvolvimento habitual, indo até o estágio da formação de trofoblasto. Núcleos poliplóides foram descritos em vários estudos de mamíferos inclusive em blastocisto humano (Benkhalifa *et al.*, 1993; Clouston *et al.*, 1997; Sandalinas *et al.*, 2001; Bielanska *et al.*, 2002). A

produção experimental de embriões de ratos com linhagem diplóide/tetraplóide sugere que existe um mecanismo para excluir células cromossomicamente anormais da linhagem exodérmica primitiva (James e West, 1994). Algumas células tetraplóides podem ser incorporadas na massa celular interna, porém elas não contribuem para a formação do feto. Contudo, em estudos recentes, foi observado que a alta proporção de poliploidia celular pode ser prejudicial para o desenvolvimento embrionário até o estágio de blastocisto (Sandalinas *et al.*, 2001).

Diferentemente de células poliplóides e multinucleadas, as células aneuplóides experimentalmente combinadas com células diplóides normais em embriões de ratos podem formar embriões mosaicos e são capazes de participar da embriogênese e contribuir para estágios de pós-implantação, e portanto, formar uma prole viável (Epstein *et al.*, 1982; Dyban e Baranov, 1987). Já recentes estudos em embriões humanos não evidenciam a seleção euplóide para massa celular interna (Evsikov e Verlinski, 1998).

Os fatores suspeitos de contribuir para a formação do mosaicismo são diversos e ainda pouco investigados. O mosaicismo pode ser causado por um número anormal de centríolos, centríolos defeituosos, ou baixa oxigenação folicular (Palermo *et al.*, 1994; Sathananthan *et al.*, 1996; Van Blerkom *et al.*, 1997). Embriões com uma fração pequena de células anormais podem na verdade ser produzidos mais por condições de cultura que gametas anormais. Por exemplo, uma pequena queda na

temperatura pode afetar a citocinese, resultando em embriões diplóides/poliplóides ou com blastômeros multinucleados. Embriões de diferentes laboratórios cultivados sob diferentes condições e diferentes protocolos de estimulação podem ter diversas taxas de mosaicismo, por isso, estudos mais informativos são necessários (Munné *et al.*, 1997).

A grande maioria dos estudos realizados em embriões no estágio de clivagem indica uma taxa de mosaicismo de 30% (Delhanty *et al.*, 1993, 1997; Munné *et al.*, 1994, 1995; Munné e Cohen, 1998; Márquez *et al.*, 2000). Dependendo da definição, o mosaicismo pode variar bastante, e dependendo do tipo de mosaico o risco para um diagnóstico errôneo também. Em um recente estudo, onde foram analisados 1.903 embriões descartados, evidenciou que 29% dos embriões possuíam mosaicismo para pelo menos cinco cromossomos. O tipo de mosaicismo mais comum foi do tipo caótico (48%), diplóide/poliplóide (26%), e causados por não disjunção mitótica (25%). Já o número de células anormais por embrião estendeu de uma média de 44% em diplóides/poliplóides para 84% em mosaicos caóticos (Munné *et al.*, 2002)

Os mosaicos podem ser classificados como “benigno” se tiver 1-2 células anormais em um embrião de 8 células, ou “prejudicial” se apresentar 3 ou mais células anormais. Dessa maneira, o mosaicismo pode produzir dois diferentes tipos de erros no PGD, dependendo de sua gravidade. O primeiro tipo de erro diagnóstico é considerar um embrião

com mosaïcismo “prejudicial” como normal, que pode ocorrer em 4,3% dos diagnósticos. Esse tipo de mosaïcismo é produzido na maioria das vezes por mosaicos caóticos ou aneuploidias mitóticas. O segundo tipo de erro diagnóstico é resultar como anormal um mosaico “benigno”, o qual pode acontecer em 1,3% dos diagnósticos, e é produzido por classificação errônea de um mosaico “benigno” $2n/Pol$ como anormal. Em conclusão, a taxa de erro produzida pelo PGD através de mosaïcismo é de 5,6% (Munné *et al.*, 2002) (Tabela 4).

Tabela 4 - Risco de erro diagnóstico em PGD devido ao mosaicismo

1903 embriões analisados ao menos por 5 sondas (X,Y, 13,18 e 21)			
Risco de classificar um embrião anormal como normal:			
	Frequência Geral (A)	% céls. normais (B)	Risco de erro (AxB)
2n/Pol (prejudicial)	3,7%	34,8%	1,3%
Caótico (prejudicial)	12,7%	9,8%	1,2%
“Split” (prejudicial)	0,3%	29,8%	0,1%
Aneupl. Mitótica	6,6%	24,2%	1,6%
Aneupl. Mitótica e meiótica	0,6%	12,2%	0,1%
TOTAL	23,9%	18,0%	4,3%
Risco de classificar um embrião praticamente normal como anormal:			
	Frequência Geral (A)	% céls. normais (B)	Risco de erro (AxB)
2n/Pol (benigno)	3,9%	23,1%	0,9%
Caótico (benigno)	1,3%	24,9%	0,3%
“Split” (benigno)	0,2%	26,7%	0,1%
TOTAL	5,3%	23,6%	1,3%
Taxa total de erro devido ao mosaicismo:			5,6%

Dados retirados e adaptados: *Munné et al.* (2002)

O caminho elegível para se estudar o erro diagnóstico do PGD é através do estudo dos embriões não transferidos. Através desse estudo se confirma com precisão os erros diagnósticos além de estabelecer se houve ou não um mosaicismo. Uma taxa geral de erro diagnóstico em PGD é descrita como 7,2%, da qual 5,6% é atribuída ao mosaicismo (Munné *et al.*, 2002)

Na verdade o que mais preocupa no mosaicismo são os casos que possuem um potencial de nascimento. Vários estudos descrevem que a frequência de mosaicos diplóides/aneuplóides na fase de blastocisto é baixa (10%) com uma média de 5 células aneuplóides por blastocisto (Evsikov e Verlinsky, 1998; Ruangvutilert *et al.*, 2000; Bielanska *et al.*, 2002). Além disso, embriões mosaicos com uma alta taxa de células anormais raramente chegam à fase de blastocisto.

DISCUSSÃO

O benefício que o PGD trouxe principalmente para casais com risco reprodutivo durante a última década é indiscutível. Há pouco tempo atrás, o aconselhamento genético para casais portadores de uma desordem genética se resumia na porcentagem de transmissão da doença para sua prole e qual seria o método de detecção pré-natal para o diagnóstico de uma gestação já estabelecida. Através dessas informações, o casal decidia se realmente correria o risco de estabelecer

uma gestação perante a chance de conceber uma criança afetada, seja por problemas físicos ou mentais. Como se já não fosse suficiente a angústia inicial da decisão da concepção, uma vez a gestação estabelecida, o casal deveria decidir se iria realizar o exame pré-natal para saber se o feto é portador da desordem, ou apenas deixar que a gestação evolua normalmente. Caso a opção fosse o diagnóstico pré-natal, a segunda ou talvez a maior dúvida seria se o resultado for positivo para doença, o que se fazer com a gestação em andamento. Se considerarmos a legislação Brasileira atual, a única opção do casal é levar a gestação até o final mesmo que a desordem genética seja letal, como é o caso da trissomia do cromossomo 18 (Síndrome de Edwards), que 50% morrem durante a primeira semana de vida, e a grande maioria remanescente falece antes de um ano de idade (Jones, 2006). Apenas 5 a 10% sobrevivem após os doze meses porém, com retardo mental grave necessitando de auxílio para qualquer atividade diária. Além disso, o diagnóstico pré-natal sempre envolve a possibilidade de uma complicação durante o procedimento. Seja através da coleta de vilosidade coriônica, líquido amniótico ou sangue do cordão umbilical, todos são procedimentos invasivos e que geram o risco de 0,5% a 2% de abortamento ou outras complicações com infecção ou descolamento de placenta. Porém, em casos especiais como anencefalia, pode-se pedir recurso judicial para o término da gestação.

Além de auxiliar casais com risco genético para sua prole, o PGD também ajuda a medicina reprodutiva a ter melhores resultados durante a FIV. Pressupondo que mais da metade dos embriões possuem uma anormalidade cromossômica e que essa é a maior responsável pela falha de implantação ou abortamento precoce, é injustificável não oferecer o PGD para casais que vão se submeter à FIV com história de falha de repetição, aborto recorrente ou idade materna reprodutiva avançada.

Obviamente, todo procedimento em medicina apresenta suas vantagens e desvantagens. A principal desvantagem do PGD além de uma possível complicação durante o procedimento da FIV em si, é o alto preço da técnica. O PGD é uma recente metodologia que envolve tecnologia de ponta e que conseqüentemente no Brasil a maioria do material é importado. Portanto, o desenvolvimento de técnicas financeiramente mais acessíveis à população em geral, poderia beneficiar casais independente do seu poder aquisitivo ou classe social.

CONCLUSÃO

O PGD é o único teste capaz de diagnosticar desordens genéticas de um embrião antes da concepção da gestação. Assim sendo, além de melhorar os resultados da FIV, também auxilia casais com risco reprodutivo a vir a ter filhos livres da doença. Os testes de PGD atualmente focam-se em duas metodologias principais: hibridização *in situ*

com fluorescência ou FISH (*fluorescent in situ hybridization*) e reação em cadeia da polimerase ou PCR (*polymerase chain reaction*). Em regra geral, a FISH é aplicada para análise de alterações cromossômicas, e a PCR para alterações gênicas. Até o momento, foram realizados mais de 3.500 casos de PGD em todo o mundo, resultando em mais de 500 gestações saudáveis (Wells e Levy, 2003; ESHRE, 2002), apesar de haver aproximadamente 2.400 ciclos publicados na literatura. O PGD já foi usado com sucesso em mais de 30 doenças monogênicas (Wells e Delhanty, 2001), e também para a detecção de desbalanço cromossômico em famílias portadoras de rearranjos como as translocações cromossômicas (Munné e Wells, 2002; Munné *et al.*, 1998b e 2000; Conn *et al.*, 1998).

REFERÊNCIAS

- Almeida PA, Bolton VN. 1996. The relationship between chromosomal abnormality in the human preimplantation embryo and development *in vitro*. *Reprod Fertil Devel* **8**:235–241.
- Angell, R. 1997. First-meiotic-division non-disjunction in human oocytes. *Am J Hum Genet* **61**: 23–32.
- Antonarakis SE. 1991. Parental origin of the extra chromosome in trisomy 21 as indicated by analysis of DNA polymorphisms. Down Syndrome Collaborative Group. *N Engl J Med* **324**:872–876.
- Benkhalifa M, Janny L, Vye P, Malet P, Boucher D, Menezo Y. 1993. Assessment of polyploidy in human morulae and blastocysts using co-culture and fluorescent *in-situ* hybridization. *Hum Reprod* **8**: 895–902.
- Bielanska M, Lin Tan S, Ao A. 2002. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development *in vitro*: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum Reprod* **17**: 413–419.
- Boada M, Carrera M, De la Iglesia C, Sandalinas M, Barri PN, Veiga AS. 1998. Successful Use of a laser for human embryo biopsy in Preimplantation Genetic diagnosis: Report of two cases. *J Assist Reprod Genet* **15**: 302–307.
- Clouston HJ, Fenwick J, Webb AL, Herbert M, Murdoch A, Wolstenholme J. 1997. Detection of mosaic and non-mosaic chromosome

abnormalities in 6- to 8-day old human blastocysts. *Hum Genet* **101**: 30–36.

Conn CM, Harper JC, Winston RM, Delhanty JD. 1998. Infertile couples with Robertsonian translocations: preimplantation genetic analysis of embryos reveals chaotic cleavage divisions. *Hum Genet* **102**: 117–123.

Cui KH, Matthews CD. 1996. Nuclear structural conditions and PCR amplification in human preimplantation diagnosis. *Mol Hum Reprod* **2**: 63–71.

Boue J, Bou A, Lazar P. 1975. Retrospective and prospective epidemiological studies of 1500 karyotyped spontaneous human abortions. *Teratology* **12**: 11–26.

Dailey T, Dale B, Cohen J, Munné S. 1996. Association between non-disjunction and maternal age in meiosis-II human oocytes detected by FISH analysis. *Am J Hum Genet* **59**: 176–184.

Delhanty JD, Griffin DK, Handyside AH, *et al.* 1993. Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent in situ hybridisation (FISH). *Hum Mol Genet* **2**: 1183–1185.

Delhanty JD, Harper JC, Ao A, Handyside AH, Winston RM. 1997. Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet* **99**: 755–760.

Dyban AP, Baranov VS. 1987. Functional activity of Chromosomes and control mechanisms of early embryonic development. In: Clarendon Press. Oxford. *Cytogenetics of Mammalian Embryonic Development* pp 267–294.

Edwards RG, Gardner RL. 1967. Sexing of live rabbit blastocysts. *Nature* **214**: 576–577.

Egozcue S, Blanco J, Vendrell JM, *et al.* 2000. Human male infertility: chromosomal anomalies, meiotic disorders, abnormal spermatozoa and recurrent abortion. *Hum Reprod Update* 6: 93–105.

El-Hashemite N, Delhanty JD. 1997. A technique for eliminating allele specific amplification failure during DNA amplification of heterozygous cells for preimplantation diagnosis. *Mol Hum Reprod* **3**: 975–978.

Epstein CJ, Smith S, Zamora T. 1982. Production of viable adult trisomy 17 reversible diploid mouse chimeras. *Proc Natl Acad Sci* **79**: 4376-80

ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). 2002. *Hum Reprod* **17**: 233–246.

Evsikov S, Verlinsky Y. 1998. Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. *Hum Reprod* **11**: 3151–3155.

Ferre F. 1992. Quantitative or semi-quantitative PCR: reality versus myth. *PCR Methods Appl* **2**: 1–9.

Findlay I, Ray P, Quirke P, Rutherford A, Lilford R. 1995. Allelic drop-out and preferential amplification in single cells and human blastomeres:

implications for preimplantation diagnosis of sex and cystic fibrosis.

Hum Reprod **10**: 1609–1618.

Germond M, Nocera D, Senn A, Rink K, Delacrétaz G, Fakan S. 1995.

Microdissection of mouse and human zona pellucida using a 1.48 μm diode laser beam: Efficacy and safety of the procedure. *Fertil Steril* **64**: 604–611.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Fiorentino A, Garrisi J, Munné S.

1997. Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertil Steril* **68**: 1128–1131.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munné S. 1999. Preimplantation

diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril* **72**: 837–844.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, *et al.* 2002. Possible

interchromosomal effect in embryos generated by gametes from translocation carriers. *Hum Reprod* **17**: 3201–3207.

Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, *et al.* 2005. The beneficial effects of

preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy support extensive clinical application. *Reprod Biomed Online* **10**: 633–640.

Gordon JW, Gang Y. 1990. Use of zona drilling for safe and effective

biopsy of murine oocytes and embryos. *Biol Reprod* **42**: 869–876.

Griffin DK, Handyside AH, Penketh RJ, Winston RM, Delhanty JD. 1991. Fluorescent in-situ hybridization to interphase nuclei of human preimplantation embryos with X and Y chromosome specific probes. *Hum Reprod*. **6**:101-5.

Harper JC, Coonen E, Handyside AH, *et al.* 1995. Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic preimplantation human embryos. *Prenatal Diagn* **15**: 41–49.

Harper JC, Boelaert K, Geraedts J, *et al.* 2006. ESHRE PGD Consortium data collection V: cycles from January to December 2002 with pregnancy follow-up to October 2003. *Hum Reprod* **21**: 3–21. Epub 2005 Sep 19.

Harper JC, Delhanty JDA. 1996. Detection of chromosomal abnormalities in human preimplantation embryos using FISH. *JARG* **13**: 137–139.

Harper JC, Wells D. 1999. Recent advances and future developments in PGD. *Prenat Diagn* **19**: 1193–1199.

Hassold T, Chen N, Funkhouser J, *et al.* 1980. A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions. *Ann Hum Genet* **44**: 151–178.

Hassold T, Hunt P. 2001. To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* **2**: 280–291.

Hassold T, Jacobs PA, Leppert M, Sheldon M. 1987. Cytogenetic and molecular studies of trisomy 13. *J Med Genet* **24**: 725–732.

Handyside AH, Kontogianni FH, Hardy K, Winston RML. 1990. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* **244**: 768–770.

Hook EB, Hamerton JL. 1977. The frequency of chromosome abnormalities detected in consecutive newborn studies, differences between studies, results by sex and by severity of phenotypic involvement. In *Population Cytogenetics*, Hook EB and Porter IH (eds.). Academic Press: New York; 66–79.

James RM, West JD. 1994. A chimeric animal model for confined placental mosaicism. *Hum Genet* **93**: 603–604.

Kuliev A, Verlinsky Y. 2004. Meiotic and mitotic nondisjunction: lessons from preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod Update* **10**: 401–407. Review.

Laurino MY, Bennett RL, Saraiya DS, *et al.* 2005. Genetic evaluation and counseling of couples with recurrent miscarriage: recommendations of the National Society of Genetic Counselors. *J Genet Couns* **14**: 165–181.

Li H, Gyllenstein UB, Cui X, Saiki RK, Ehrlich H, Arnheim N. 1988. Amplification and analysis of DNA sequences in single human sperm and diploid cells. *Nature* **335**: 414–417.

Márquez C, Sandalinas M, Bahçe M, Alikani M, Munné S. 2000. Chromosome abnormalities in 1255 cleavage-stage human embryos. *Reprod Biomed Online* **1**: 17–27.

Munné S. 2006. Chromosome abnormalities and their relationship to morphology and development of human embryos. *Reprod Biomed Online* **12**: 234–253. Review.

Munné S, Alikani M, Tomkin G, Grifo J, Cohen J. 1995. Embryo morphology, developmental rates and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* **64**: 382–391.

Munné S, Cohen J. 1998. Chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod Update* **4**: 842–855.

Munné S, Cohen J, Sable D. 2002. Preimplantation genetic diagnosis for advanced maternal age and other indications. *Fertil Steril* **78**: 234–236.(a)

Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. 1993. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* **8**: 2185–2191.

Munné S, Magli C, Adler A, *et al.* 1997. Treatment-related chromosome abnormalities in human embryos. *Hum Reprod* **12**: 780–784.

Munné S, Magli C, Bahce M, *et al.* 1998. Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat Diagn* **18**: 1459–1466.

- Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Fung J, Gianaroli L, Cohen J. 2000. Outcome of preimplantation genetic diagnosis of translocations. *Fertil Steril* **73**: 1209–1218.
- Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Marquez C, Cohen J. 2002. Chromosome mosaicism in cleavage stage human embryos: evidence of a maternal age effect. *Reprod Biomed Online* **4**: 183–196.
- Munné S, Scott R, Sable D, Cohen J. 1998b. First pregnancies after preconception diagnosis of translocations of maternal origin. *Fertil Steril* **69**: 675–681.
- Munné S, Weier HUG, Grifo J, Cohen J. 1994. Chromosome mosaicism in human embryos. *Biol Reprod* **51**: 373–379.
- Munné S, Wells D. 2002. Preimplantation genetic diagnosis. *Curr Opin Obs & Gyn* **14**: 239–224.
- Nicklas RB. 1974. Chromosome segregation mechanisms. *Genetics* **78**: 205–213.
- Palermo G, Munné S, Cohen J. 1994. The human zygote inherits its mitotic potential from the male gamete. *Hum Reprod* **9**: 1220–1225.
- Pellestor F. 1996. The primed in situ technique and preimplantation chromosome analysis. *Assisted Reprod Rev* **6**: 62–66.
- Pierce KE, Michalopoulos J, Kiessling AA, Seibel MM, Zilberstein M. 1997. Preimplantation development of mouse and human embryos biopsied at

cleavage stages using a modified displacement technique. *Hum Reprod* **12**: 351–356.

Piyamongkol W, Bermudez MG, Harper JC, Wells D. 2003. Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* **9**:411–420.

Ray PF, Handyside AH. 1996. Increasing the denaturation temperature during the first cycles of amplification reduces allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* **2**: 213–218.

Ray PF, Winston RML, Handyside AH. 1994 Single cell analysis for diagnosis of cystic fibrosis and Lesch-Nyhan syndrome in human embryos before implantation. *Miami Bio/Technol*, 5:46 (Abstract)

Rechitsky S, Strom C, Verlinsky O, *et al.* 1998. Allele dropout in polar bodies and blastomeres. *J Assist Reprod Genet* **15**: 253–257.

Roudebush WE, Kim JG, Minhas BS, Dodson MG. 1990. Survival and cell acquisition rates after preimplantation embryo biopsy: Use of two mechanical techniques and two mouse strains. *Am J Obst Gynecol* **162**: 1084–1090.

Rosenbusch B, Glaeser B, Schneider M. 2001. Aneuploidy in human oocytes: non-disjunction or pre-division? *Cytogenet Cell Genet* **94**: 241–243.

Rubio C, Simon C, Vidal F, *et al.* 2003. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod* **18**: 182–188.

Ruangvutilert P, Delhanty JD, Serhal P, Simopoulou M, Rodeck CH, Harper JC. 2000. FISH analysis on day 5 post-insemination of human arrested and blastocyst stage embryos. *Prenat Diagn* **20**: 552–560.

Sandalinas M., Marquez C, Munné S. 2002. Spectral karyotyping of fresh, non-inseminated oocytes. *Mol Hum Reprod* **8**: 580–585.

Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, Munné S. 2001. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. *Hum Reprod* **16**: 1954–1958.

Sathananthan H, Ratman SS, Ng SC, Tarin JJ, Gianaroli L, Trounson A. 1996. The sperm centriole: Its inheritance, replication and perpetuation in early human embryos. *Hum Reprod* **11** :345–356.

Short RV. 1979. When a conception fails to become a pregnancy. *Ciba Found Symp* **64**: 377–394.

Shuber AP, Michalowsky LA, Nass GS, *et al.* 1997. High throughput parallel analysis of hundreds of patient samples for more than 100 mutations in multiple disease genes. *Hum Mol Genet* **6**: 337–347.

Snabes MC, Chong SS, Subramanian SB, Kristjansson K, DiSepio D, Hughes MR. 1994. Preimplantation single-cell analysis of multiple

- genetic loci by whole-genome amplification. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**: 6181–6185.
- Staessen C, Van Assche E, Joris H, *et al.* 1999. Clinical experience of sex determination by fluorescent in-situ hybridization for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* **5**: 382–389.
- Stem C, Pertile M, Norris H, Hale L, Baker HWG. 1999. Chromosome translocations in couples with in vitro fertilization implantation failure. *Hum Reprod* **14**: 2097–2101.
- Strom CM, Verlinsky Y, Milayeva S, *et al.* 1990. Preconception genetic diagnosis of cystic fibrosis. *Lancet* **336**: 306–307.
- Tarin JJ, Handyside AH. 1993. Embryo biopsy strategies for preimplantation diagnosis. *Fertil Steril* **59**: 943–952.
- Thornhill AR, McGrath JA, Eady RA, Braude PR, Handyside AH. 2001. A comparison of different lysis buffers to assess allele dropout from single cells for preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* **21**: 490–497.
- Thornhill AR, Snow K. 2002. Molecular diagnostics in preimplantation genetic diagnosis. *J Mol Diagn* **4**: 11–29. Review.
- Wells D, Delhanty JD. 2001. Preimplantation genetic diagnosis: applications for molecular medicine. *Trends Mol Med* **7**: 23–30.
- Wells D, Levy B. 2003. Cytogenetics in reproductive medicine: the contribution of comparative genomic hybridization (CGH). *Bioessays* **25**: 289–300.

- Van de Velde H, De Vos A, Sermon K, *et al.* 2000. Embryo implantation after biopsy of one or two cells from cleavage-stage embryos with a view to preimplantation genetic diagnosis. *Prenat Diagn* **20**:1030-7.
- Van Blerkom J, Antezak J, Schrader R. 1997. The developmental potential of the human oocyte is related to the dissolved oxygen content of follicular fluid: Association with vascular endothelial growth factor levels and perifollicular blood flow characteristics. *Hum Reprod* **12**: 1047–1055.
- Veiga A, Sandalinas M, Benkhalifa M, *et al.* 1997. Laser blastocyst biopsy for preimplantation diagnosis in the humano. *Zigote* **5**: 351–354.
- Veiga A, Santaló J, Vidal F, *et al.* 1994. Twin pregnancy after preimplantation diagnosis for sex selection. *Hum Reprod* **9**: 2156–2159.
- Verlinsky Y, Kuliev A (eds.). 2000. *An Atlas of Preimplantation genetic diagnosis*. The Parthenon: New York
- Verlinsky Y, Cieslak J, Friedline M, *et al.* 1995. Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescence in-situ hybridization. *Hum Reprod* **10**: 1923–1927.
- Verlinsky Y, Ginsberg N, Lifchez A, Valle J, Moise J, Strom CM. 1990. Analysis of the first polar body: preconception genetic diagnosis. *Hum Reprod* **5**: 826–829.

Verlinsky Y, Kuliev AM (eds). 1993. *Preimplantation diagnosis of Genetic diseases: A new technique in Assisted Reproduction*. Wiley-Liss: New York.

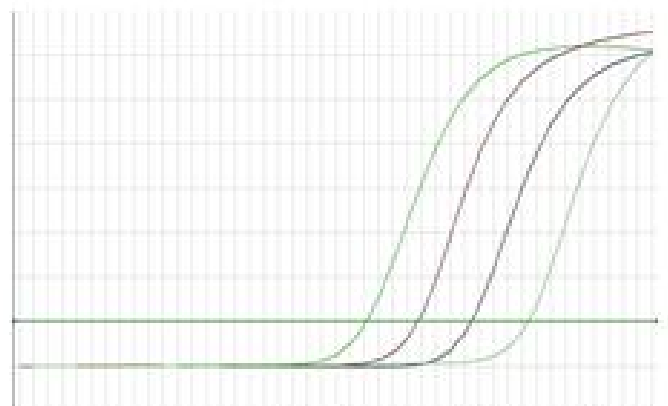
Verlinsky and Kuliev. 1996. Preimplantation polar body biopsy. *Biochem Molec Med* **58**: 13–17.

Verlinsky Y, Tur-Kaspa I, Cieslak J, *et al.* 2005. Preimplantation testing for chromosomal disorders improves reproductive outcome of poor-prognosis patients. *Reprod Biomed Online* **11**: 219–225.

CAPÍTULO II *



*Identificação do sexo de embriões humanos através da análise de blastômero pelas técnicas da reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) e hibridização in situ fluorescente (FISH) **



* De acordo com normas para publicação na revista *Prenatal Diagnosis*

Identificação do sexo de embriões humanos através da análise de blastômero pelas técnicas da reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) e hibridização *in situ* fluorescente (FISH)

Palavras chave: Diagnóstico genético pré-implantacional (PGD);

Hibridização *in situ* fluorescente (FISH); Reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real); TaqMan MGB; sexagem de embriões humanos; blastômero humano; célula única.

RESUMO

Introdução: atualmente, sabe-se que os genes no cromossomo X são responsáveis por pelo menos 250 doenças hereditárias. Após a fertilização *in vitro* (FIV), a simples seleção do sexo de embriões antes da transferência uterina, pode evitar prole afetada em casais sob risco dessas desordens genéticas.

Objetivos: desenvolver um método de diagnóstico pré-implantacional (PGD) pela técnica de PCR em tempo real para sexagem de embriões humanos e compará-lo com a técnica de FISH considerada padrão ouro.

Materiais e Métodos: após a biópsia de 40 embriões excedentes e não viáveis para a transferência, um total de 98 blastômeros foram analisados durante o projeto, sendo que foi possível analisar por ambas as técnicas 24 embriões (60%), gerando um total de 70 blastômeros (35 por técnica), e 28 blastômeros de 16 embriões (40%) foram analisados apenas pela PCR em tempo real.

Resultados: quando comparada à técnica de FISH que obteve um índice de 80,00% (28/35), a PCR em tempo real obteve 74,3 % (26/35). Não houve discrepância entre os resultados das duas técnicas quando comparados.

Conclusão: através desse trabalho, foi desenvolvido um método rápido e seguro para o diagnóstico sexual em célula única humana (bucal e blastômero), por uma tecnologia emergente chamada PCR em tempo real.

SUMMARY

Introduction: genes in chromosome X are known to be responsible for at least 250 hereditary diseases. After *in vitro* fertilization (IVF), the simple selection of embryo sex before uterine transfer can prevent the occurrence of affected offspring among couples at risk for these genetic disorders.

Objectives: to develop a method of preimplantation genetic diagnosis (PGD) using real-time PCR for the sexing of human embryos and to compare it to the FISH technique, considered to be the gold standard.

Materials and Methods: after biopsies were obtained from 40 excess embryos inviable for transfer, a total of 98 blastomeres were analyzed during the project. It was possible to analyze 24 embryos (60%) by both techniques, generating a total of 70 blastomeres (35 per technique), while 28 blastomeres from 16 embryos (40%) were analyzed only by real-time PCR.

Results: compared to the FISH technique, which yielded an 80.0% rate (28/35), real-time PCR yielded a 74.3 % rate (26/35). There was no discrepancy between the results obtained by the two techniques.

Conclusion: a rapid and safe method was developed in the present study for the sexual diagnosis of a single human cell (buccal cell and blastomere) using an emerging technology called real-time PCR.

INTRODUÇÃO

Antes mesmo do primeiro gene autossômico ser revelado (Grupo sanguíneo *Duffy*) no cromossomo 1 em 1968, já se sabia da existência de alguns genes localizados no cromossomo X. As primeiras descrições de genes ligados ao cromossomo X são baseadas em heredogramas, porque evidenciavam que as doenças não poderiam estar em um autossomo pelo fato de haver apenas homens afetados, os quais herdavam a doença de mulheres normais. Dentre essas doenças incluíam-se a daltonismo, hemofilia e a distrofia muscular de Duchenne. Nesse primeiro catálogo de descrições de doenças ligadas ao cromossomo X publicadas em 1964, abrangiam 59 desordens que tinham forte evidencia de ligação, e 21 as quais possuíam menos evidencias de serem ligadas ao sexo (McKusick, 1964).

Atualmente, sabe-se que os genes no cromossomo X são responsáveis por pelo menos 250 doenças hereditárias (*X-linked diseases*, OMIM, 2006), onde a maioria segue a forma recessiva de herança e são expressas em 50% dos filhos nascidos de mães que carregam um alelo mutado. Adicionalmente, podemos considerar as condições relacionadas à infertilidade que são ligadas ao cromossomo Y, como no caso das microdeleções (Stouffs *et al.*, 2005). O único método capaz de diagnosticar uma doença genética antes de estabelecer uma gestação é Diagnóstico genético pré-implantacional (PGD). Através de

hibridização *in situ* fluorescente (*Fluorescent in-situ hybridization* – FISH) com sondas para os cromossomos X, Y e outra autossômica, hoje é a técnica de PGD mais usada para sexagem de embriões (Harper *et al.*, 2006), pois possui principalmente a vantagem de detectar as aneuploidias dos cromossomos sexuais. No entanto, a eficiência dessa técnica é altamente dependente da habilidade técnica e experiência do laboratório envolvido. A fixação pobre dos blastômeros e falta de um rigoroso controle na contagem dos sinais, podem reduzir a confiabilidade da técnica de FISH (Munné *et al.*, 1998). Adicionalmente, a técnica de FISH apenas detecta a presença dos cromossomos sexuais, não podendo detectar a discriminação alélica gênica em casos de embriões do sexo masculinos normais ou femininos portadores.

A técnica da reação em cadeia da polimerase (*Polymerase chain reaction* – PCR) é uma alternativa em relação ao FISH para detecção dos cromossomos sexuais em célula única. A PCR é um método *in vitro* rápido e versátil para a amplificação de seqüências-alvo de DNA pré-definidas, presentes em uma amostra de DNA. A PCR pode identificar uma (singleplex) ou mais seqüência de DNA (multiplex) ao mesmo tempo. Na verdade a análise de blastômeros por PCR foi o primeiro método usado para identificar o sexo dos embriões de casais sabidamente com risco de transmitir doenças ligadas ao cromossomo X (Handyside *et al.*, 1990). Esse teste envolveu a amplificação de regiões altamente repetitivas do cromossomo Y em um único blastômero isolado

através de biópsia embrionária. Embriões que não geravam a amplificação do produto específico do cromossomo Y eram diagnosticados como femininos e então transferidos para o útero, desse modo evitava-se o nascimento de possíveis afetados. Muitas meninas já nasceram através desse método, porém a descrição de erros diagnósticos e conseqüente transferência de embriões do sexo masculino, presumivelmente devido à falha de amplificação, ilustra um dos riscos dessa estratégia diagnóstica pré-implantacional (Hardy e Handyside, 1992). Protocolos subseqüentes reduziam o erro diagnóstico através da co-amplificação de seqüências “homologas” no cromossomo X como um controle interno da reação (Kontogianni *et al.*, 1991). Mesmo assim, altas taxas de erros diagnósticos (3-8%) e falha de amplificação (7-20%) levaram muitos pesquisadores a abandonar essa técnica em relação à FISH ou a outras estratégias de PCR (Pierce *et al.*, 2000).

Necessitando aumentar a especificidade da técnica de PCR, alguns pesquisadores iniciaram a tentativa de amplificar genes que apresentam uma única cópia no cromossomo Y, como o gene SRY (sex *determining region Y*), utilizando uma estratégia chamada *nested PCR*. Nessa tática, o produto de uma reação de amplificação inicial é diluído e utilizado como fonte de DNA-alvo para uma segunda reação, na qual é utilizado um conjunto diferente de *primers*, correspondendo a seqüências localizadas próximas, mas internas àquelas utilizadas na primeira reação. Usando essa estratégia, blastômeros masculinos e femininos podem ser

distinguidos via amplificação do gene *SRY* (Cui *et al.*, 1994), do gene *AMELX/AMELY* (*amelogenin*) (Levinson *et al.*, 1992), e ainda pelo gene *ZFX/ZFY* (*zinc finger protein*) (Chong *et al.*, 1993). Cópias homologas, porém não idênticas, tanto para *amelogenin* como *ZFX/ZFY* estão localizadas no cromossomo X e Y na região pseudo-autossômica e podem servir como um controle de amplificação utilizando o mesmo par de *primers*. Podem-se distinguir os fragmentos amplificados do cromossomo X e Y através de um gel de eletroforese, pois os tamanhos dos fragmentos são diferentes. Todavia, a estratégia de *nested PCR* requer um número maior de ciclagem para amplificação, acrescenta o tempo de trabalho e manuseio do material, e conseqüentemente aumenta a chance de contaminação do laboratório por produtos de amplificação.

Progressos adicionais no intuito de melhorar a amplificação de genes de cópia única para a identificação sexual foram alcançados através do uso de marcação fluorescente de *primers* (QF-PCR)(Findlay *et al.*, 1995; Sherlock *et al.*, 1998). Em recente estudo, onde os autores compararam a técnica de QF-PCR com a FISH para detecção de aneuploidias em blastômeros humanos, foi demonstrada total concordância entre as duas técnicas no diagnóstico do sexo dos embriões. No entanto, a análise pela técnica de QF-PCR foi alcançada em apenas 77% dos blastômeros, enquanto que com a FISH foi de 93%. Além do mais, provavelmente devido ao fenômeno de amplificação preferencial ou ausência de amplificação de um dos alelos (ADO – *allele*

drop-out), levou a resultados inconclusivos ou discrepantes entre as duas técnicas (Sato *et al.*, 2003). Porém, a QF-PCR é uma técnica muito promissora, pois através dela hoje é possível analisar blastômeros perante as aneuploidias juntamente com doenças monogênicas, e avaliar HLA compatível (Rechitsky *et al.*, 2006; Fiorentino *et al.*, 2004). Além disso, em alguns países a cariotipagem de líquido amniótico vem sendo substituída pela QF-PCR por ser um método rápido e confiável (Brown *et al.*, 2006; Donaghue *et al.*, 2005).

A reação em cadeia da polimerase em tempo real (PCR em tempo real) é uma tecnologia de inovação a qual permite mensurar a taxa de acúmulo de amplificação através da detecção de fluorescência emitida a cada ciclo da reação (Heid *et al.*, 1996). Dentre os vários sistemas suportados pela PCR em tempo real, o mais utilizado é o TaqMan[®]. O método de detecção pelo sistema de TaqMan[®] foi descrito em 1991 (Holland *et al.*, 1991) e utiliza um oligonucleotídeo marcado (sonda) com uma molécula fluorescente (fluoróforo) na extremidades 5', e outra de "apagamento" intramolecular (*quencher*) na extremidade 3', além do par de oligos iniciadores (*primers*) que se utilizam na PCR comum. Portanto, quando a sonda se liga na seqüência-alvo, o fluoróforo e o *quencher* são separados, e a fluorescência pode ser mensurada pela máquina através de uma câmera CCD (*charge-coupled devices*) que capta o sinal a cada ciclo.

Com a emergência de uma nova tecnologia de sondas chamadas TaqMan[®] MGB[™] (minor groove binder), foi possível desenvolver sondas menores porém com a mesma temperatura de anelamento. Além disso, essas sondas não possuem sinal fluorescente na extremidade 3' onde o *quencher* fica acoplado, permitindo utilizar um filtro a mais da máquina que utilizaria com o sinal do *quencher*. Com essas características, é possível desenhar *primers* e sondas para amplificar regiões muito pequenas do genoma (70pb), deixando esse sistema de detecção mais sensível e com a possibilidade do uso de várias sondas ao mesmo tempo (multiplex) (Kutyavin *et al.*, 2000). Deste modo, o sistema TaqMan[®] MGB[™] permite o aumento da sensibilidade sem perder a especificidade, e pode ser muito útil para sistemas que necessitem a detecção de várias regiões na mesma reação (multiplex).

Através da técnica de PCR em tempo real utilizando outro método de detecção chamado *Molecular beacons*, pesquisadores reportaram uma excelente eficiência na detecção do sexo de embriões através da detecção do cromossomo Y em blastômeros (Pierce *et al.*, 2000). Nesse trabalho, os autores usaram além da região *TSPY* específica do cromossomo Y, outra região de controle denominada de genes *U2* localizada no cromossomo 17. A eficiência geral da técnica para o diagnóstico do sexo embrionário através da análise de blastômero foi de 83,8%, sendo que houve variância nesse índice dependendo do estado de fragmentação dos embriões. Os embriões mais fragmentados foram os

que obtiveram pior eficiência. Porém, o que chamou a atenção foi o fato de que quando o núcleo do blastômero oriundo de embriões pouco fragmentados era visualizado antes de colocá-los nos microtubos de PCR, a eficiência da reação era superior. Além disso, o índice de acerto em linfócitos (célula única) foi de 99,1% (erro em 1 dos 108 linfócitos) o maior reportado pela literatura se compararmos com outras técnicas como PCR com primers fluorescente (97%), FISH (96%) e PCR convencional (89%) (Findlay *et al.*, 1998).

OBJETIVOS

O principal objetivo desse trabalho é desenvolver um método pela técnica de PCR em tempo real para sexagem em blastômero humano e compará-lo com a técnica de FISH considerada padrão ouro.

MATERIAIS E MÉTODOS

Congelamento dos embriões

O congelamento dos embriões excedentes do programa de ICSI foi realizado, através de soluções de congelamento (Irvine Scientific, EUA) contendo PBS, 1.5M propanodiol (PROH) e 1.5 M de PROH + 0.1M de sucrose. Para o congelamento utilizou-se um freezer programável (Cryologic CL 863, Austrália) e uma curva de congelamento

descrita a seguir. O procedimento de congelamento foi iniciado à temperatura de 24°C, a taxa de resfriamento foi de -2°C / min até atingir a temperatura de -6° C, onde o “*seeding*” foi realizado manualmente, através de uma pinça metálica pré-resfriada. Em seguida, a temperatura de resfriamento foi reduzida para -0,3° C/ min até atingir a temperatura de -35°C, seguida por queda livre até -150°C. Nesse momento, as *pailletes* contendo os embriões foram transferidas para o nitrogênio líquido a -196°C.

Descongelamento dos embriões

Para o processo do descongelamento dos embriões excedentes, utilizaram-se soluções decrescente de PROH (Irvine Scientific, EUA) com as seguintes soluções de descongelamento (1.0M de PROH/0.2M sucrose, 0.5M de PROH/0.2M sucrose e 0.2M de sucrose). A metodologia se inicia com a retirada das *pailletes* dos botijões de nitrogênio líquido, as quais foram expostas à temperatura ambiente por 30 segundos e em seguida imergidas em banho-maria à 30°C por 40 segundos. Os embriões foram então retirados das *pailletes* e sucessivamente adicionados nas soluções de descongelamento por 5 minutos em cada solução. A rehidratação foi então completada, transferindo-se os embriões para meio de PBS em temperatura ambiente por 5 min e em seguida à 37°C. Após esse período, os embriões foram transferidos para microgotas de meio de cultura P1 com adição 10% de

soro albumina humana (HAS) ou meio de blastocisto com 10% HSA, dependendo do dia em que foram congelados, e permanecendo em cultura por 24 horas à 37°C e CO₂ a 5,5% (Mauri *et al.*, 2001).

O critério morfológico de avaliação de sobrevivida foi que embriões descongelados deveriam apresentar pelo menos um blastômero intacto após o descongelamento e ausência de sinais de danos na zona pelúcida (Lai *et al.*, 1996). A transferência foi realizada apenas quando houve divisão de pelo menos um blastômero após 32 horas do descongelamento. Os embriões que não obtiveram nenhuma divisão celular após esse período, foram usados para o projeto.

Isolamento dos blastômeros

Após o pré-consentimento dos casais que assinaram o termo livre e esclarecido, embriões não viáveis e impróprios para transferência foram escolhidos para ser submetidos às análises. A biópsia dos blastômeros foi realizada em embriões de 2 a 8 células, e no mínimo 2 blastômeros são retirados após realização da abertura da zona pelúcia através de um diodo laser (Fertilase TM system - Medical Technologies Montreux - Switzerland). O laser possui uma luz piloto que opera via uma objetiva de 40x acoplada em microscópio invertido (Eclipse TE 300 - Nikon). A abertura da zona pelúcida é realizada através de 3 a 4 irradiações de laser de 9ms , o qual permite uma abertura de

aproximadamente 20 μ m, suficiente para a retirada do blastômero (Figura 1).

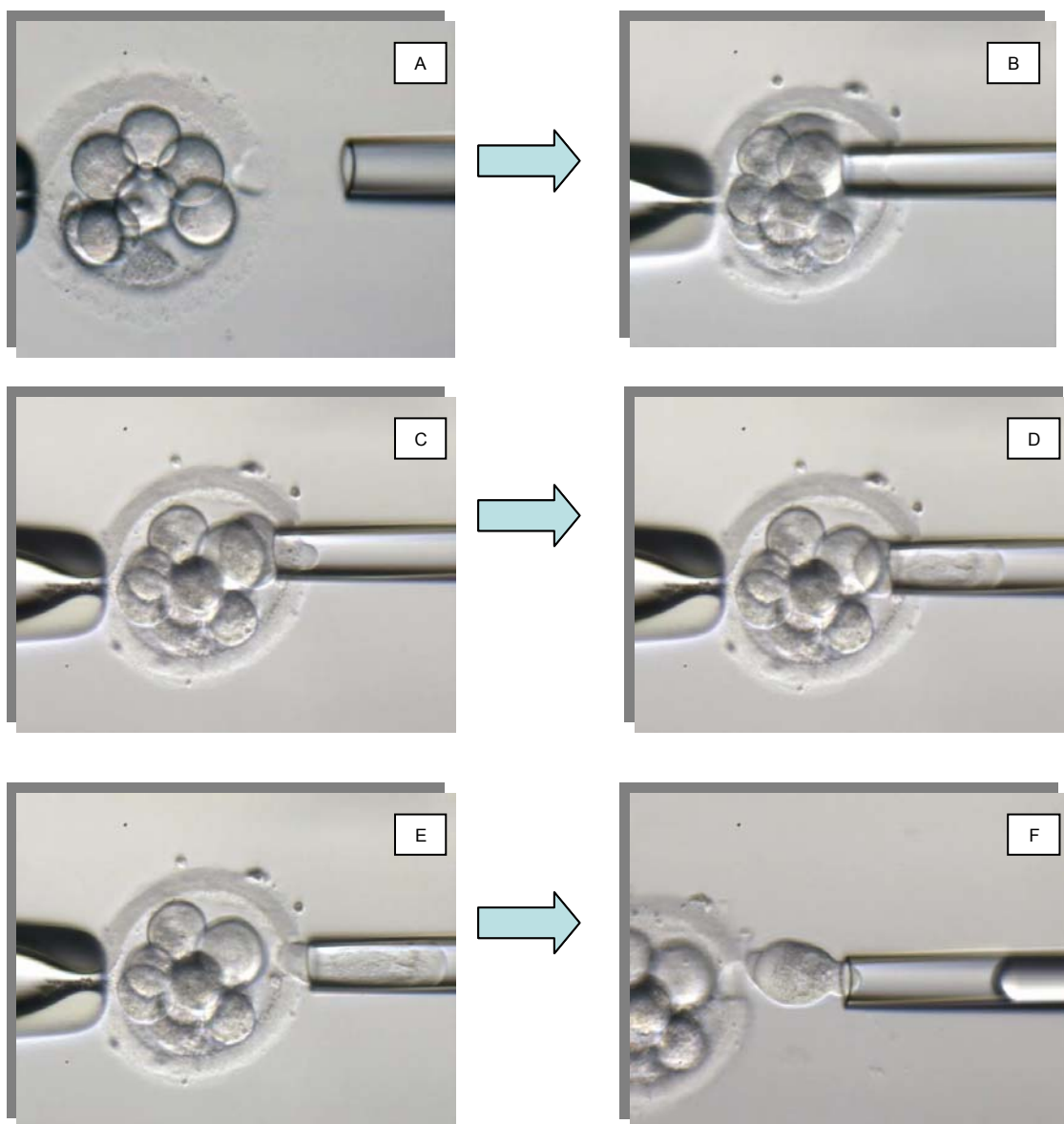


Figura 1 - Biópsia embrionária de blastômero humano

- A- Note o orifício realizado por *Laser*
- B- A pipeta de biópsia sendo posicionada
- C- Início da aspiração do blastômero
- D- Aspiração e retirada mecânica do blastômero
- E- Retirada completa do blastômero pelo orifício na zona pelúcida
- F- Exposição do blastômero após a biópsia

Depois da retirada dos blastômeros, um é transferido para lâmina onde se realiza a fixação para iniciar a reação de hibridação (FISH) (Anexo1), o outro transferido para um microtubo para reação da PCR. Para a análise pela PCR, cada blastômero foi lavado duas vezes com PBS livre de cálcio e magnésio, e então transferido diretamente para um tubo de PCR 0,2 ml, contendo 5 μ l de PBS ou 3 μ l de solução de lise, dependendo do protocolo utilizado. A amostra de controle foi preparada com volume final similar de solução de lavagem e posta também em tubo de PCR nas mesmas condições para servir como controle de contaminação. Logo em seguida, os tubos de PCR são congelados à -20° C por pelo menos 3 horas (Anexo2).

Preparo e isolamento de célula única bucal

Aleatoriamente foram escolhidos dois indivíduos de sexo diferente para serem doadores de células bucais. Esses indivíduos permaneceram pelo menos 40 minutos sem ingerir qualquer tipo de comida ou bebida.

As células da mucosa bucal foram obtidas através de um esfregaço utilizando uma escova citológica. Após o procedimento, agita-se a escova em um microtubo de PCR de 1,5 mL contendo 0,5 mL de NaCl 0,9%, que é então centrifugado a uma velocidade de 4.000 RPM por 5 minutos. O sobrenadante é removido e repete-se esta lavagem por mais

duas vezes. Após a lavagem, o material que ficou no fundo do tubo é ressuspendido em 0,2 mL de PBS estéril e livre de cálcio e magnésio. Imediatamente após o procedimento, as células são isoladas manualmente utilizando-se um capilar sob um estereoscópio, e transferidas individualmente para um tubo de PCR de 0,2 mL, o qual foi posto previamente 5µL de solução salina (PBS livre de cálcio e magnésio) ou diretamente em 3µL de solução de lise, dependendo do protocolo utilizado (50µL e 25µL respectivamente). Essas células são então congeladas à -20° C, até que sejam utilizadas como controle positivo masculino e feminino, ou para a padronização das reações de PGD. Todo material utilizado era estéril, e o procedimento foi realizado em fluxo laminar.

Real-time polymerase chain reaction (PCR em tempo real)

O método de PCR em tempo real é baseado na asserção de que existe uma relação quantitativa entre o número de DNA-alvo presente no início da reação da PCR e o montante de produto amplificado durante a fase exponencial. A inovação conceptual crucial, e a chave para entender a quantificação através da PCR em tempo real, é o ciclo de *threshold* (Ct). Para determinar os Ct's, primeiramente os níveis de ruído fluorescente devem ser determinados (linha de base ou *baseline*). Compreende-se por linha de base o intervalo entre o terceiro ciclo até 3 a 5 ciclos precedentes ao primeiro ciclo que inicia o sinal fluorescente de

amplificação. O Ct ocorre quando a fluorescência ultrapassa a linha de *threshold*, que pode ser fixa ou determinada pelo operador. No entanto, a linha de *threshold* deve ser determinada na fase exponencial da curva para resultados mais precisos (Figura 2). Isso se deve ao fato de que, nessa fase presume-se que existe a eficiência máxima da reação, já que todos os reagentes, enzima, dNTPs, oligos estão em abundância, o que otimiza essa fase da reação. Partindo-se do princípio que a PCR quantitativa em tempo real reflete o número de cópias do DNA-molde, quanto maior a concentração desse DNA, ou quanto maior o número de cópias iniciais, mais precocemente vai aparecer a fluorescência, e conseqüentemente, menor vai ser o valor do Ct (Figura 3). Portanto, aliando a enorme sensibilidade da técnica com a eficiência de sua quantificação, é possível quantificar até mesmo a diferença entre uma, duas ou três cópias iniciais (Gao *et al.*, 2005; Joncourt *et al.*, 2004; Writzl *et al.*, 2006; Yobb *et al.*, 2005). Outra definição importante em PCR em tempo real é o ΔR_n (*baseline-corrected normalized fluorescence*), que nada mais é que a fluorescência final emitida após a amplificação menos a fluorescência basal emitida naturalmente pela reação e os reagentes (Figura 2). Quanto maior o ΔR_n mais robusta e eficiente foi a reação. O valor do ΔR_n depende de vários fatores, dentre os mais importantes estão o desenho dos *primers* e sonda, a eficiência da reação, concentração de *primers* e sondas e o conjunto de todos os reagentes, ou seja, reflete diretamente a eficácia com que a reação foi realizada.

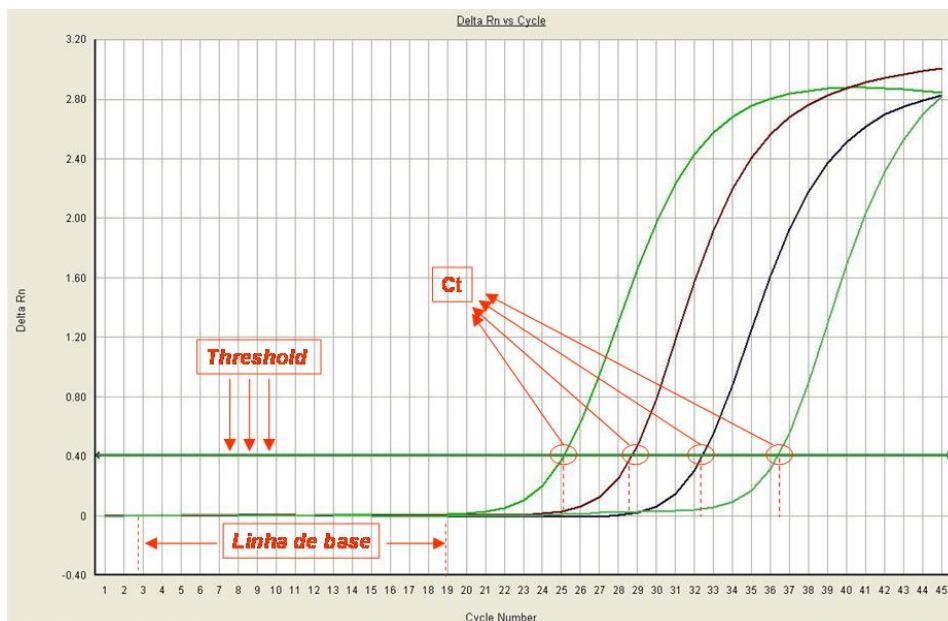


Figura 2 - Conceitos básicos de PCR em tempo real

Ct – *Threshold cycle*

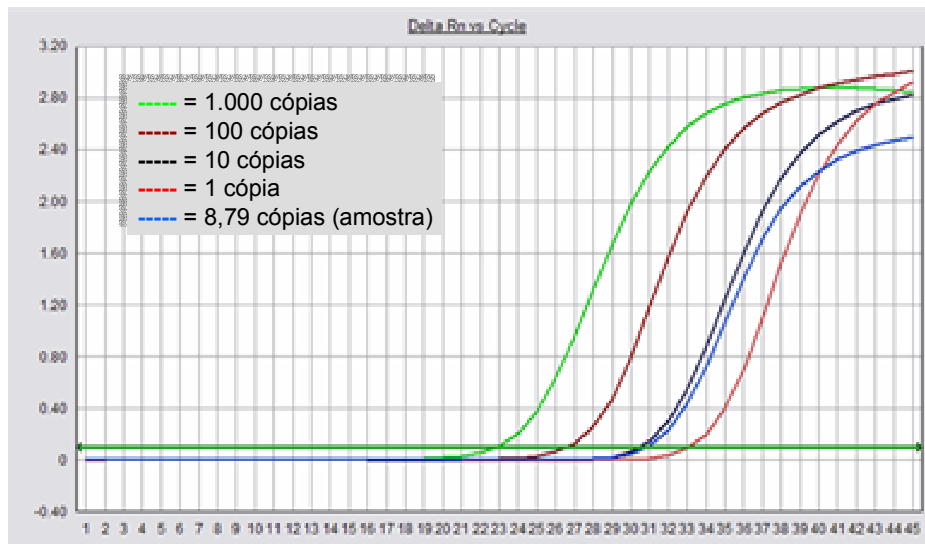


Figura 3 - Curvas de PCR em tempo real: note que as curvas padrões vão de 1.000 a 1 cópia do genoma humano; em azul a amostra que foi quantificada

Note que quanto maior a concentração de DNA inicial, mais cedo vai iniciar a emissão de sinal da fluorescência.

As curvas também são usadas para avaliar a eficiência de *primers* e sonda.

As reações foram realizadas em uma máquina de PCR em Tempo Real (7500 Real Time PCR System – Applied Biosystems) (Figura 4) utilizando o sistema *TaqMan*[®] para detecção do produto de amplificação. As aplicações suportadas pela máquina de PCR em tempo real podem ser caracterizadas em dois diferentes grupos cuja característica predominante é o momento onde é feita a leitura de sinal. O princípio do sistema utilizado na PCR em Tempo Real consiste na combinação de um termo-ciclador com a detecção de fluorescência emitida em cada ciclo. A técnica é versátil e segura, pois o procedimento de amplificação e detecção é realizado no mesmo tubo e ao mesmo tempo, reduzindo drasticamente a chance de contaminação no laboratório. O método *TaqMan*[®] utiliza uma sonda marcada com um fluoróforo e *quencher* além do par de oligos iniciadores (*Primers*) que se utiliza na PCR comum. A sonda é constituída de uma seqüência alvo que está entre os dois *primers*, e deve ter uma temperatura de anelamento de 10° C superior aos mesmos. Enquanto a sonda está livre em solução, o fluoróforo e o *quencher* que ficam nas extremidades da sonda, não emitem sinal, apenas quando são separados por meio da clivagem da sonda pela atividade de exonuclease 5'→3' da enzima Taq[®]DNAPolimerase durante a reação (Figura 5). Portanto, durante a reação quando as sondas se anelam na seqüência alvo, o fluoróforo e o *quencher* são separados, e a fluorescência pode ser mensurada (Martinago *et al.*, 2006b). Existem outros métodos de detecção para

PCR em tempo real, dentre eles se destacam o *Syber-Green*, *Molecular beacons*, *Eclipse probes*, *FRET*. Alguns deles com o *Syber-Green* não necessitam do uso de sonda, e portanto, são mais baratos, porém pouco específicos, pois emitem sinal de qualquer DNA amplificado.



Figura 4 - Máquina de PCR em Tempo Real (7500 Real Time PCR System – Applied Biosystems)

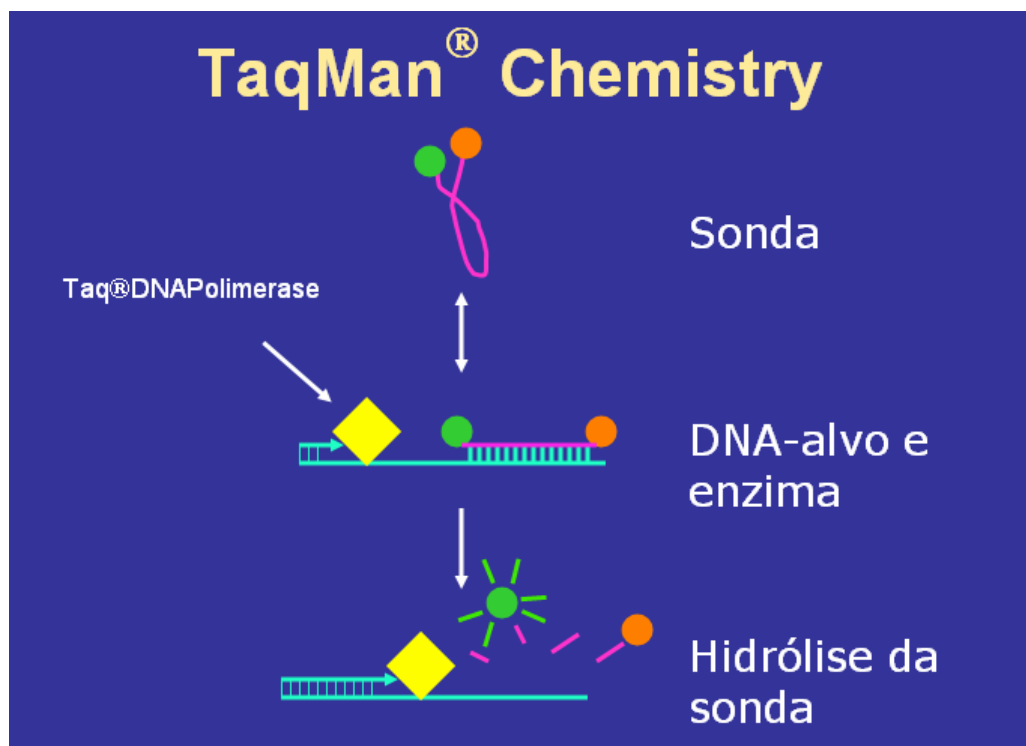


Figura 5 - Sistema *TaqMan*[®] para PCR em tempo real

Para obter melhores resultados, foram utilizadas as sondas denominadas *TaqMan* MGB[®], as quais possuem MGB ligada a sua extremidade 3' que não emite fluorescência. Sendo assim, a sonda não utiliza a fluorescência de um filtro da máquina que utilizaria com o fluoróforo do *quencher*, admitindo a possibilidade de usá-lo com outra sonda em uma reação multiplex. Além disso, as sondas *TaqMan* MGB[®] são mais fáceis de sintetizar, mais eficientes por proporcionar aumento na sensibilidade e especificidade, e por apresentarem alta temperatura de anelamento, permitem o desenho de sondas mais curtas, as quais são mais específicas mesmo quando usadas em duplex para distinguir a

diferença de apenas um nucleotídeo em análise de SNPs (*Single nucleotide polymorphism*), onde se utiliza duas sondas, uma com o alelo normal e outra com o mutado, e o mesmo par de *primers* (Kutyavin *et al.*, 2000). Cada sonda possui um sinal diferente, portanto pode-se na mesma reação em menos de duas horas diagnosticar o perfil alélico para um determinado gene, sabendo-se se o indivíduo é homocigoto normal, mutado ou heterocigoto. Portanto, as sondas *TaqMan* convencionais precisam ser desenhadas em um tamanho maior para atingir a mesma temperatura de anelamento de uma sonda *TaqMan* MGB®. Adicionalmente, as sondas MGB proporcionam ainda alta especificidade mesmo em regiões ricas em nucleotídeos A-T (Walburger *et al.*, 2001).

Desenho dos *primers* e sondas *TaqMan* MGB®

A escolha da região genômica como o desenho dos *primers* e sondas são fundamentais para o sucesso e eficiência de uma reação em multiplex. Foram escolhidas duas regiões genômicas para realizar as reações de PCR em duplex. Uma das regiões é comum para ambos os sexos (beta-globina), e outra específica de uma região do cromossomo Y chamada *TSPY* (DYS-14). A região da beta-globina escolhida possui 4 cópias genômicas em uma célula diplóide, serve como controle de amplificação e evita um resultado falso negativo devido a inibidores da reação de PCR. Já a região do marcador *DYS-14*, amplifica apenas quando o DNA é do sexo masculino. Trata-se de uma região que

possui 20 a 30 cópias no cromossomo Y, diferente de outras regiões como SRY que possui apenas uma cópia. Isso eleva a sensibilidade da reação, pois se houver um dano no DNA na região escolhida pode não haver a amplificação, já uma região de múltiplas cópias, além de existir varias cópias iniciais, se houver um dano em uma dessas cópias, existem as outras para amplificar.

Os *primers* e sondas foram desenhados através do programa *Primer Express 2.0* (Applied Biosystems) nas condições sugeridas pelo fabricante (Anexo 3). Para PCR em tempo real usando o sistema *TaqMan* MGB®, amplicons pequenos (50-150pb) rendem tipicamente resultados mais consistentes e sinais robustos. Após o desenho dos oligos, os mesmo foram submetidos a análise do BLAST e In-Silico PCR para checar a especificidade dos mesmos. O BLAST e In-Silico PCR são ferramentas da biotecnologia disponível livremente na internet (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>; <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr>), pelas quais se checa a similaridade de regiões do DNA para se saber a especificidade das mesmas. Os *primers* e sondas utilizadas bem como informações sobre seu produto estão dispostos na Tabela 1.

Tabela 1 - Primers e sondas utilizados no projeto

Região	Primers	Tm (°C)	Sonda MGB	Fragmento
β-globina	F - 5'-TGCTGTTATGGGCAACCCTAA-3'	62.6	(VIC)TGAAGGCTCATGGCAAG	74pb
	R - 5'-GAGCCAGGCCATCACTAAAGG-3'	63.2		
TSPY	5'-AGAGCGTCCCTGGCTTCTG-3'	63	(FAM)TCCTTCTCAGTGTTTCTT	77pb
	5'-GAGAGCACCTCTCCACTAGAAAGG-3'	62.1		

Controle de contaminação

A atividade de preparação da solução de lise e dos reagentes da PCR foi realizada dentro de um fluxo laminar, o qual foi restrito de outras atividades, com material único para essa manipulação. Todo o material como pipetas e superfície onde foram realizadas as reações, foi mantido apenas para o projeto, e foram sempre manipulados com luvas sem talco. Uma rotina de descontaminação das superfícies de trabalhos foi realizada antes de cada reação com álcool a 70% ou com água sanitária a 10%. O indivíduo que realizou as reações sempre estava munido de máscara e toca como também avental descartável. As luvas foram trocadas sempre que eram tocadas em qualquer ambiente com possível contaminação. Após o término e análise de cada reação, todo material foi descartado, evitando qualquer contaminação com material já amplificado (no caso do PCR). Em nenhum momento os tubos de PCR foram abertos após a reação.

Para evitar contaminação vinda de espermatozóide oriundo de outros métodos de fertilização como *FIV*, as amostras utilizadas para a pesquisa (blastômeros) foram de embriões provenientes de fertilização por injeção intracitoplasmática de espermatozóide (ICSI). Após a biópsia, os blastômeros foram lavados em PBS para evitar contaminação de qualquer resíduo celular. Para cada blastômero analisado, utilizou-se o mesmo volume de PBS da lavagem para saber se houve contaminação de material exógeno durante a biópsia embrionária. Além disso, foi usado duas amostras “brancas” em cada reação para saber se teve alguma contaminação na formulação do mix da PCR.

As reações foram realizadas com o Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems - PN 4304437) pelo fato de apresentar o mix pronto com todos os reagentes necessários para a reação de PCR, necessitando apenas a adição dos *primers* e sondas. A utilização de um mix pronto reduz a chance de contaminação exógena que pode ocorrer durante a formulação do mesmo. Além disso, o Máster Mix contém dUTP e *AmpErase UNG* que são produtos de estratégia contra uma possível contaminação oriunda de reações anteriores. O dUTP é um nucleotídeo que não é encontrado no DNA-molde (apenas RNA), o qual é incorporado no produto de amplificação durante a reação, portanto o DNA amplificado vai possuir essa unidade de nucleotídeo em suas fitas. Toda reação foi iniciada com uma temperatura de 50° C durante 2 min para que a enzima *AmpErase UNG* possa digerir a possível

contaminação desses produtos, que eventualmente possam estar incorporados na reação atual.

Todas essas normas foram estritamente seguidas e quando necessário, discutidas com toda a equipe e reformuladas.

Otimização do protocolo de PCR em tempo real para detecção cromossomos específicos

Para a otimização do protocolo da reação em duplex, primeiramente, os *primers* e sondas foram otimizados em reações separadas (singleplex). Após determinar qual era a concentração ideal de cada região separadamente, verificou-se a eficiência de amplificação de cada região, e ambas apresentaram 100%. A eficiência de 100% é considerada quando após cada ciclo da PCR produz duas cópias do seu produto inicial, e em um DNA diluído em 10 vezes, deve apresentar a média de 3,3 ciclos de um para o outro (Figura 3). Uma vez determinado a concentração dos reagentes e a eficiência de cada reação, inicia-se a padronização em duplex. A padronização em duplex foi feita com concentrações diferentes de *primers* e sonda para cada região na mesma reação, utilizando como amostra DNA masculino em concentração equivalente a uma cópia genômica (~6.6pg de DNA). Para PCR em tempo real consideram-se as concentrações associadas que geram o menor Ct, e posteriormente, analisam-se as concentrações as quais oferecem um

sinal mais robusto, ou seja, geram um ΔRn com maior fluorescência. Através desses artifícios, foi escolhida uma concentração de *primers* para as duas regiões de 400nM, já para as sondas foi de 150nM para *TSPY* e 250nM para região da beta-globina, pois essa última necessitou de uma concentração maior para atingir os mesmos níveis de ΔRn da primeira. Além dos critérios citados, também foi utilizado o índice de sucesso de amplificação e menor variância de Cts entre as replicas para escolha da concentração definitiva de cada *primer* e sonda (Tabela 2). Uma vez determinada a concentração dos *primers* e sonda de cada região para trabalhar em duplex, várias reações foram realizadas com DNA masculino equivalente a uma cópia genômica para se saber a regularidade de detecção do método aplicado. Verificou-se então que a diferença de Ct entre as duas regiões era de aproximadamente quatro Cts, ou seja, a região *DYS-14* amplificava ~4 Cts antes da beta-globina por apresentar o maior número de cópias iniciais (Figura 6). Isso reflete a diferença de cópias entre as duas regiões e evidencia a extrema sensibilidade da técnica para quantificação relativa.

O último passo da padronização foi nas condições em que se realiza o PGD, porém ao invés de blastômero, utilizou-se célula única bucal, onde se testou também as condições da solução de lise celular e especificidade da técnica através do uso de células femininas e masculinas.

Tabela 2 - Padronização das reações em PCR em tempo real em duplex

Primers	Beta_MGB			Primers	TSPY_MGB		
	Média ΔRn	Média Ct	Índice		Média ΔRn	Média Ct	Índice
400nM	0,58	38,82	66,66%	300nM	1,51	34,99	100,00%
300nM	0,60	38,13	50,00%	400nM	1,36	34,93	100,00%
400nM	0,65	37,07	91,66%	400nM	1,00	33,93	91,66%
400nM*	0,48	38,93	58,33%	400nM*	1,33	35,20	100,00%
500nM	0,60	37,58	83,33%	400nM*	1,10	33,62	100,00%
600nM	0,47	39,18	91,66%	400nM	1,22	33,81	100,00%

Cada linha representa uma combinação de concentração diferente

Destaque em vermelho os melhores resultados obtidos

Índice – Índice de amplificação do locus

* - 150nM sonda TSPY e Beta



Figura 6 - Curvas de reação da PCR em tempo real em blastômero (azul) e célula bucal (roxo)

Note que ambas as células possuem o mesmo perfil de amplificação e apresentam em média 4 ciclos de diferença entre a região TSPY para beta-globina.

Padronização da PCR em tempo real em célula única

A primeira etapa consistiu na padronização da técnica em célula única para estabelecer o melhor volume final da reação e melhor método de lise. Toda reação apresentava além dos blastômeros e seus respectivos controles, um controle masculino e feminino que era composto por uma célula de cada sexo, e também dois controles brancos denominados NTC (*No Template Control*). Com o volume de 50µL foram testadas 31 células bucais e 9 blastômeros de 5 embriões. As condições de lise celular para esse volume eram as seguintes: os microtubos contendo a célula única em 5µL de PBS eram descongelados a temperatura ambiente por 10 min, e em um fluxo laminar foram adicionados 10µL de solução de lise celular (100 µg/ml proteinase K; 5µM sodium dodecyl sulfate (SDS); 10 mM Tris-HCl, pH 8.3 (TRIZMA® Pre-Set Crystals, Sigma)). O material era submetido a uma temperatura de 50° C em um bloco de termo-ciclador por 30 minutos, e posteriormente a 96° C por mais 10 minutos para inativação da proteinase K (Pierce *et al.*, 2000). A proteinase K é uma serino-protease de elevada atividade enzimática, isolada do fungo *Tritirachium album*. Apresenta um tamanho molecular de 28,904 KDa, e atividade de clivagem específica em proteínas nativas ou desnaturadas, sendo largamente utilizada na purificação de DNA e RNA. A sua atividade é aumentada com a adição de agentes desnaturantes como SDS 1%, uréia e em temperaturas elevadas.

Imediatamente após o procedimento de lise, foram realizadas as reações de PCR em tempo real. Do volume total de 50µL, aproximadamente 15µL eram da solução de lise contendo o blastômero ou célula única bucal, 25µL de Taqman Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems - PN 4304437), sistema composto de reagentes necessários para a realização da atividade 5'nucleásica, como enzima AmpliTaq Gold; Enzima AmpErase UNG; dNTPs com dUTP; referência passiva e buffer, adicionados os *primers* da β-globina em uma concentração de 400nM e 250nM para sonda, e para a região TSPY 400nM de *primers* e 150nM para a sonda. Para completar o volume final de cada reação, foi utilizada água pura estéril (Sigma-Aldrich -*Water for embryo transfer* Catalogue# W1503).

Para a ciclagem foram utilizados os seguintes parâmetros: Incubação inicial a 50° C por 2 min para permitir a atividade da *AmpErase uracil N-glycosilase* quebrar qualquer possível produto de contaminação oriunda de reações anteriores. O primeiro passo de denaturação foi de 10 min a 95° C, e posteriormente 45 ciclos de PCR em dois passos: denaturação a 95° C por 15 segundos, seguido de temperatura de anelamento a 60° C por 60 segundos. A fluorescência contínua foi monitorada no passo de anelamento (Figura 7). Para maior segurança, em toda reação foram utilizados controles positivos (uma célula bucal feminina e outra masculina) além de dois brancos (todos os reagentes sem DNA). O *Threshold* foi fixado em 0.10 em todas as reações para

padronização dos resultados (Ct). A duração média de uma reação de 45 ciclos foi de 1h e 50 min.

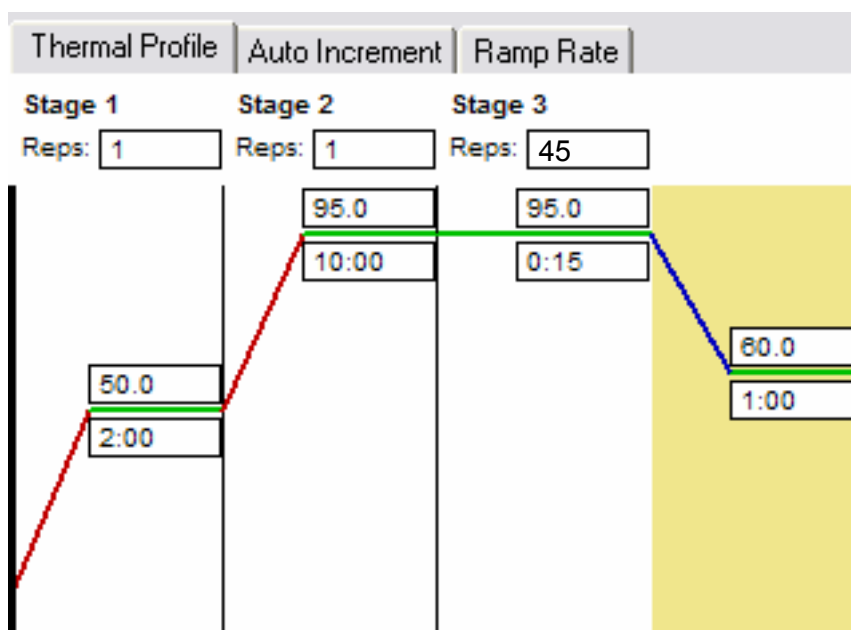


Figura 7 - Condições de ciclagem realizadas pela PCR em tempo real em célula única

Os retângulos superiores mostram a temperatura em graus Celsius, e nos retângulos inferiores o tempo em minutos. Note que fluorescência contínua foi monitorada no passo de anelamento (amarelo).

Nas células bucais foi obtido um índice de sucesso de amplificação de 87,1% (detectadas 27 de 31) e nos blastômeros de 55,5% (5 de 9). Das quatro amostras que não amplificaram, em três não houve amplificação e em uma amplificou apenas a região do Y. Além disso, os resultados de amplificação não foram consistentes, ou seja, houve grande variação entre os Cts das amostras, bem como entre as duas regiões na

mesma amostra entre os blastômeros. Adicionalmente, houve sinal de contaminação das amostras brancas em duas das três reações. O índice de amplificação tanto em célula bucal como blastômero está contido na Tabela 3.

Tabela 3 - Sumário da sexagem humana em célula única por PCR em tempo real

Amostra	Vol PCR (µL)	Total de células	Sexo		Índice de detecção (%)
			Feminino	Masculino	
Célula bucal	50	31	14	13	87,1
Célula bucal	25	33	17	16	100
Blastômero	50	9	0	5	55,5
Blastômero	25	54	35	10	83,3

Com o pobre resultado encontrado em 50µL, foi iniciado os testes com volume 25µL e outro procedimento de lise que segue na segunda fase do experimento. Após o isolamento do blastômero ou célula bucal, o tubo contendo a célula única com 3µL da solução de lise é congelado por um período de pelo menos 3 horas. O tubo é então descongelado em temperatura ambiente por 10 minutos. Posteriormente, é posto em um bloco de termo-ciclador (PCR), onde é submetido a uma temperatura de 37° C por 60 minutos para a ação da proteinase K, e a 96° C por 15 minutos para a inativação da enzima. Logo após o procedimento

os tubos são postos dentro de um fluxo laminar quando se colocam os reagentes da PCR (Mix, *primers* e sondas), e o material retorna ao termociclador para análise. A solução de lise celular é composta por 17 mmol/L SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate* – Sigma) e 125 mg/mL proteinase K (Roche Diagnostics). Os controles com as células bucais foram submetidos à lise celular juntamente com os blastômeros em todas as reações. Esse procedimento foi realizado como controle do procedimento de lise e também posteriormente na análise dos resultados dos blastômeros. Partindo do princípio que tanto a célula bucal como o blastômero estão sendo submetidos a procedimento de lise ao mesmo tempo e analisados na mesma reação, espera-se a mesma eficiência técnica para ambos, e conseqüentemente os parâmetros de comparação tornam-se o mais próximo do ideal possível (Figura 6). Através desses cuidados, pode-se presumir em caso de falha de amplificação se o erro foi no processo de lise ou falha da técnica como um todo.

Com volume de 25 μ L foram analisados 19 blastômeros de 11 embriões dos quais 9 eram femininos e 2 do sexo masculino. As condições de ciclagem e concentrações dos reagentes foram às mesmas descritas com volume de 50 μ L. Nessa fase foi possível verificar o sexo nos blastômeros em 100% dos casos (19/19), como também nas células bucais. A média dos Cts em blastômero foi de 37,36 e do Δ Rn de 1,15 para a beta-globina, e para a região *TSPY* o Ct foi 32,96 e Δ Rn foi de 1,48. A média da diferença de Ct para as duas regiões ficou de 4,11, e

para ΔR_n foi de 0,75. Foi reportado contaminação em apenas uma das reações, a qual gerou um sinal para *TSPY* positivo para um dos dois NTCs (Ct: 40,50), porém não influenciou o resultado das amostras por apresentar um Ct “alto” e o outro NTC na mesma reação não apresentou sinal, além disso o resultado das amostras foi feminino.

Após os excelentes resultados obtidos nessa fase, considerou-se que a reação estava otimizada, e passou-se então para comparação com a técnica de FISH.

Durante a fase de comparação direta entre as duas técnicas, todo o embrião não viável que possuía pelo menos dois blastômeros intactos e com núcleo foi biopsiado. Após a biópsia, um blastômero era fixado em lâmina e o outro posto no microtubo de PCR contendo a solução de lise. A numeração de cada blastômero era diferente em ambas as técnicas para se realizar o estudo as cegas. Em seguida a análise dos blastômeros por cada técnica, o resultado era passado para embriologista que arquivou os dados durante o projeto. Posteriormente ao término da análise de todos os casos, os resultados forma comparados e analisados estatisticamente.

Fluorescence in situ hybridization (FISH)

Fixação do blastômero

Após a lavagem dos blastômeros biopsiados em meio Earle suplementado com 0,5% de albumina humana, sob um microscópio invertido os blastômeros foram fixados individualmente em lâminas, em local previamente marcado por um círculo atrás da lâmina, onde foi colocado 1-2 μ L de solução de difusão (HCl 0,01N; 0,1% TWEEN) (Coonen *et al.*, 1994). Após o procedimento, as lâminas ficam em temperatura ambiente por 30 minutos até serem transferidas para o laboratório de FISH (Figuras 8 e 9).

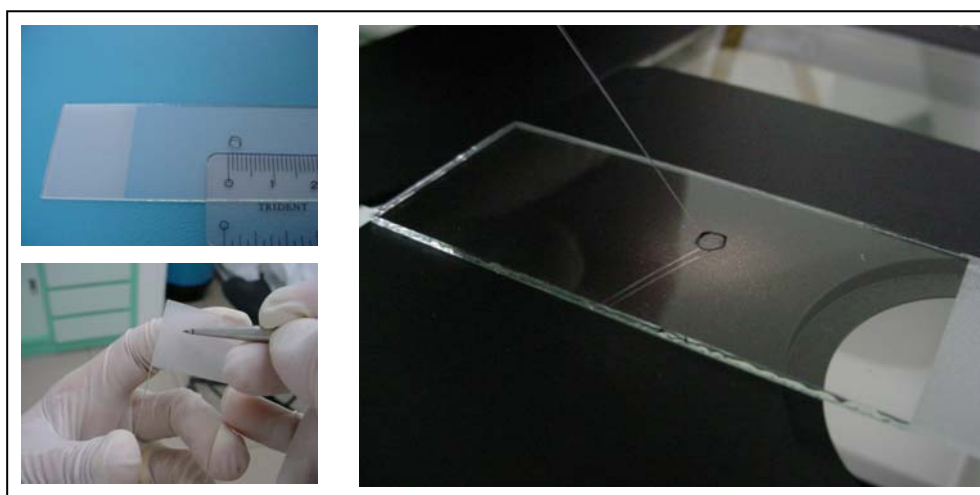


Figura 8 - Fixação do blastômero em lâmina para análise por FISH

- A. Círculo feito com caneta de marcação antes da transferência do blastômero (4mm).
- B. Transferência do blastômero para a lâmina através de um capilar.
- C. Caneta de diamante para fazer a marcação do círculo após a fixação do blastômero.

FISH em PGD

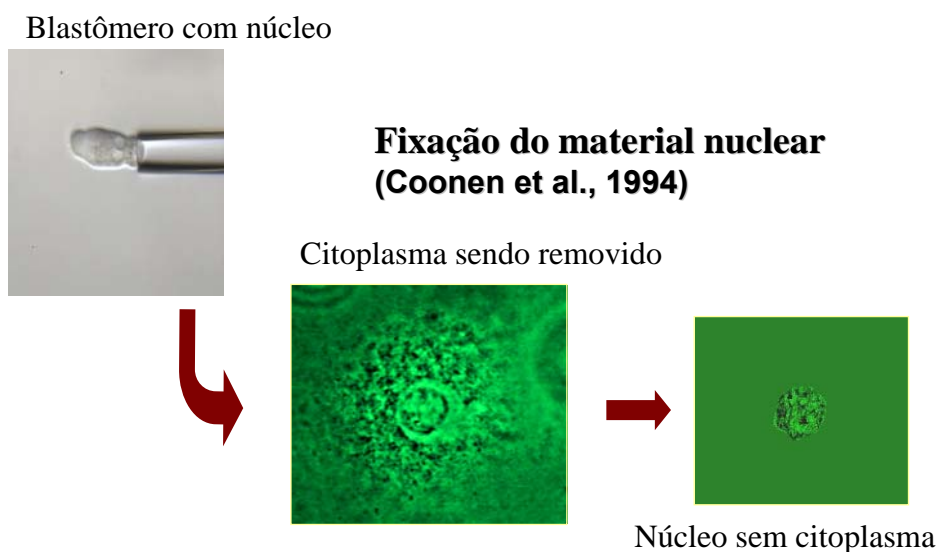


Figura 9 - Fixação do blastômero

Note que o blastômero deve perder todo seu citoplasma durante a fixação para ocorrer o acesso das sondas do FISH adequadamente ao DNA.

Pré-tratamento

As lâminas são enxaguadas com PBS (Phosphate buffered saline) e logo em seguida desidratadas passando por 20 seg. em 70% etanol, 90% etanol e finalmente duas vezes em 100% etanol. Logo após secarem, são tratadas a 37° C (0,01 HCl contendo 50 µL de pepsina 10%) por 5 minutos. As lâminas são enxaguadas em água purificada e PBS e submergidas no fixador Carnoy a 4° C por 10 min e enxaguadas novamente.

Após as lâminas serem submetidas a novo processo de desidratação, são deixadas à temperatura ambiente para iniciar a etapa do FISH propriamente dita.

Primeira etapa do FISH

Aplica-se a solução das sondas (DXZ1, *Spectrum Blue*; DYZ3, *Spectrum Gold*; LSI13, *Spectrum RED*; D18Z1, *Spectrum Aqua*; LSI21 *SpectrumGreen*; Multivision PGT Probe Panel; Vysis Inc., Downers Grove, IL ref: 32-131080) no local previamente marcado. Coloca-se a lamínula sobre a solução e em seguida denatura-se a lâmina a 75° C sobre uma placa aquecedora por 3 minutos. Após esse procedimento, veda-se a lamínula sobre a lâmina com cola de borracha.

A hibridização das sondas é feita em uma câmara umidificadora, onde se põe a lâmina em uma caixa de plástico com tampa contendo um papel toalha úmido com água purificada, e deixa-se pelo menos por uma hora em um banho-maria pré-aquecido a 37° C.

Lavagem pós-hibridização

Em um banho-maria a 73° C coloca-se uma jarra Coplin contendo 0.4X SSC/0,3%NP40, onde são postas as lâminas (já sem a lamínula) por 5 minutos. Lava-se as lâminas em uma solução 2X SSC/0,1% NP-40 por alguns segundos, e logo em seguida aplica-se a solução *anti-fade* (Vectashield, Burlingame, CA) na área marcada que é coberta com uma lamínula. Após esse procedimento, as lâminas estão prontas para serem analisadas sob um microscópio óptico fluorescente

com lâmpada de mercúrio de 100Watts, utilizando os filtros adequados (*Olympus – BX50*).

Análise estatística

Os valores de concordância entre as duas técnicas foram comparados pelo teste de Mann-Whitney.

Aspectos éticos

Os casais que gentilmente doaram os embriões não viáveis para pesquisa assinaram o termo de consentimento que está em atendimento com a resolução 196/96 – CNS-MS, e estavam totalmente cientes e de acordo com todo o projeto de pesquisa. O projeto foi submetido previamente à avaliação e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu/SP, e está moldado dentro das exigências do mesmo (Anexo 4 e 5).

RESULTADOS

Um total de 98 blastômeros oriundos de 40 embriões não viáveis para transferência foram analisados durante o projeto, sendo que 26 eram femininos, 12 masculinos e 2 os quais não foi possível o diagnóstico. Desse total, foi possível analisar por ambas as técnicas 24

embriões (60%), gerando um total de 70 blastômeros (35 por técnica). Por outro lado, 16 embriões (40%) com retirada de 28 blastômeros foram analisados apenas pela PCR em tempo real (Tabela 4).

Tabela 4 - Resumo da análise dos embriões

	<i>Nº de embriões (blastômeros)</i>
Total	40 (98)
Analisados apenas por PCR em tempo real	16 (28)
Comparação entre os métodos	24 (70)*
Femininos	26
Masculinos	12
Resultados não foi possível	2

* 35 blastômeros por cada técnica

Na fase de comparação entre os métodos, dos 24 embriões, 17 eram femininos, 6 masculinos e um o qual não foi possível o diagnóstico. Dos 35 blastômeros analisados por cada técnica, a PCR em tempo real foi capaz de diagnosticar o sexo em 26, gerando um índice de 74,3%. Já pela técnica de FISH foi possível analisar 28 dos 35 blastômeros, levando a um índice de 80,0%. Dos 9 casos que não foi possível o diagnóstico por PCR em tempo real, 2 deles também não foi possível pela técnica de FISH (Tabela 5).

Tabela 5 - Comparação da sexagem embrionária entre as duas técnicas

Embrião	FISH	PCR
1	Núcleo não visualizado	FALHA
2	XX,13,18,21- NL	FEMININO
	XX,13,18,21- NL	FEMININO
3	Erro fixação	FEMININO
	Triss X, mono 18, 13 e 21- NL	FEMININO
4	Tetraploidia, X	FEMININO
5	Triss X, 13,18 e 21 - NL	FEMININO
	Apenas 2 sinais 18	FALHA
	Mono X; 13,18 e 21 - NL	FEMININO
6	Mono X e 18; 13 e 21 - NL	FEMININO
7	Erro fixação	MASCULINO
	XY, 13, 18 e 21 - NL	MASCULINO
8	XY, 13, 18 e 21- NL	MASCULINO
9	Triss X, triss 18 e 21; 13 - NL	FALHA
10	Triss X, 18, 21 e 13 - NL	FEMININO
11	XX, triss 21, 13; 18 - NL	FEMININO
12	XY, mono 13,18 e 21	MASCULINO
13	Mono X, anormalidades combinadas	FEMININO
	Triss X, anormalidades combinadas	FEMININO
14	Monoploidia (n), X	FEMININO
	Mono X, caótico	FALHA
15	Núcleo não visualizado	FEMININO
16	XX,13,18,21- NL	FEMININO
	XX, triss 21, 13 e 18 - NL	FEMININO
17	Triploidia, X	FEMININO
18	XY, triss 21, 13 e 18 - NL	FALHA
	XY, triss 21, 13 e 18 - NL	MASCULINO
19	XX, anormalidades combinadas	FALHA
20	XY, 13, 18 e 21 - NL	MASCULINO
21	XY, 13, 18 e 21 - NL	Falha (masc?)
22	XX,13,18 e 21 - NL	FALHA
23	Núcleo não visualizado	FEMININO
	XX,13,18 e 21- NL	FALHA
24	XX,13,18 e 21 - NL	FEMININO
	Núcleo não visualizado	FEMININO

NL – Normal (dois sinais)

mono – monossomia

triss- trissomia

A média geral dos Cts foi de 36,79 para a beta-globina e 34,42 para *TSPY*, e do ΔRn foi de 0,96 e 1,26 respectivamente. A diferença entre os Cts das duas regiões (quantificação relativa) ficou em 3,99, e do ΔRn foi de 0,72. Não foi possível diagnosticar o sexo em um dos blastômeros pela PCR em tempo real (embrião 21), na qual a reação mostrou amplificação de ambas as regiões, porém com Ct menor para a beta-globina, contrariando o índice geral que amplificou em média 4 ciclos antes para a região *TSPY* (Figura 10 e 11). O resultado do FISH para esse mesmo embrião foi do sexo masculino, porém como a amplificação das duas regiões não estabeleceu a regra, o resultado ficou como indefinido. Adicionalmente, também não foi possível o diagnóstico do sexo em um dos blastômeros analisados por FISH (embrião 5) pelo fato de ter apresentado apenas dois sinais para o cromossomo 18.

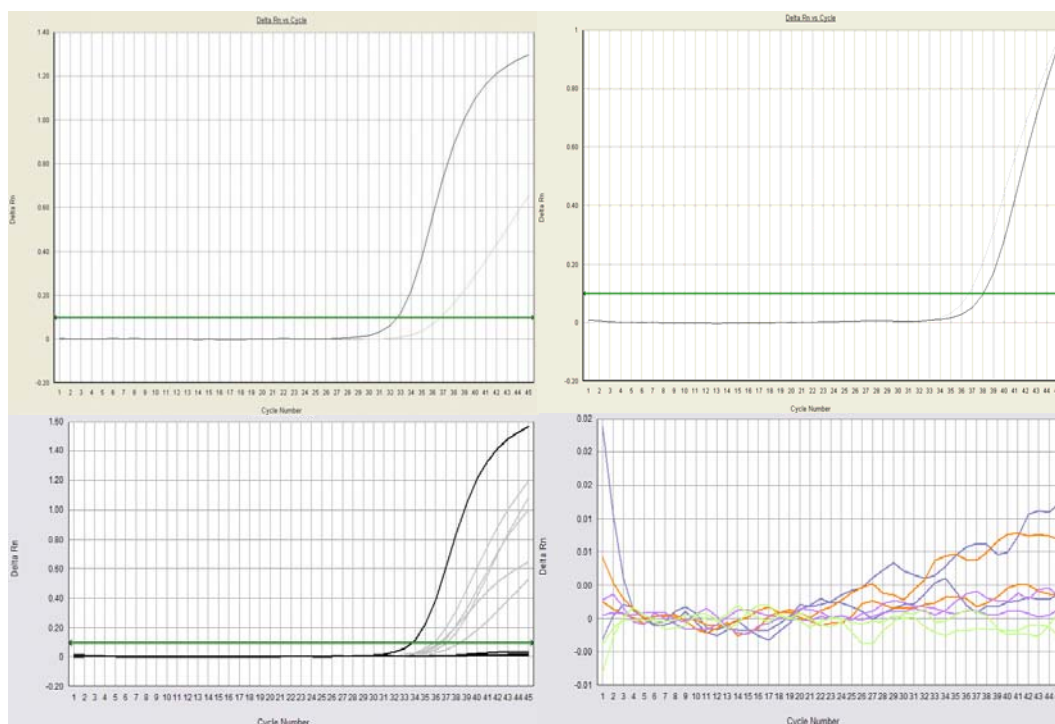


Figura 10 - Gráficos de PCR em Tempo Real em blastômero humano

Linha preta – TSPY;
Linha cinza – Beta-globina

- Gráfico padrão de amplificação de célula única
- Gráfico de possível contaminação
- Gráfico de 3 blastômeros e 1 célula bucal na mesma reação. Note o padrão de amplificação típico (~4 Ct de diferença entre TSPY e a beta-globina)
- Gráfico dos NTC's. Note que não houve amplificação pela escala do DeltaRn

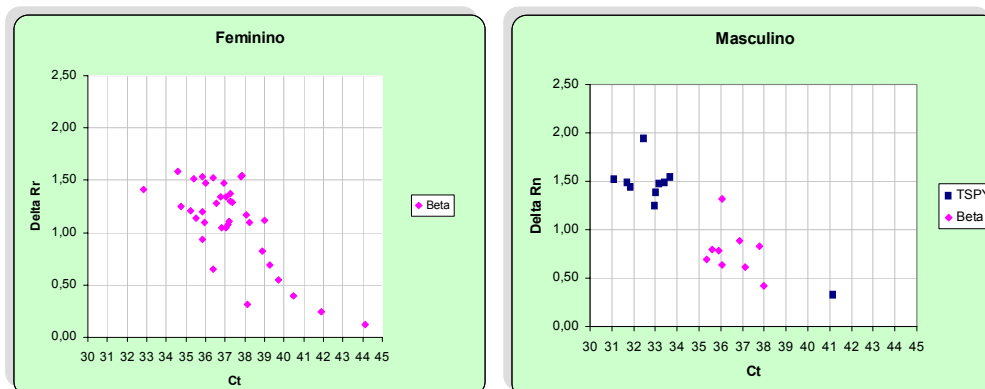


Figura 11. Gráficos correlacionando o ΔRn com os Cts de blastômeros diagnosticados como masculino e feminino em reação de 25 μ L

Note que a eficiência da região da beta-globina foi perdida quando houve amplificação da região TSPY ao mesmo tempo (blastômeros masculino), pois apesar dos Cts serem parecidos, houve queda do ΔRn .

Gráfico feminino: o menor Ct (32,83) foi de um embrião tetraplóide, o qual contém uma maior quantidade de DNA inicial.

Gráfico masculino: Sinal único do TSPY que está fora do padrão é de possível contaminação.

Através da FISH foi possível identificar que dos 24 embriões, 33,3% (8/24) eram normais para os cromossomos estudados, 58,3% (14/24) eram anormais e em 8,3% (2/24) não foi possível à análise do embrião. A trissomia (sexuais e autossomos) foi a alteração mais comum, encontrada em 25% dos embriões (6/24) (Figura 12), seguida de anormalidades relacionada à haploidia 12,5% (3/24) e anormalidades combinadas 8,3% (2/24) e por fim o núcleo caótico que foi encontrado em 4,2% (1/24). Perante o número total de embriões, 12,5% (3/24) apresentavam anormalidades apenas nos cromossomos sexuais, dos quais 2 eram trissomia e 1 monossomia do cromossomo X. Não foram

encontrados embriões com anormalidade do cromossomo Y. Foi encontrado mosaicismos em 4 embriões dos quais foi possível analisar mais de um blastômero, levando um índice de mosaicismos de no mínimo 18,2%, ou 4 dos 22 embriões em que foi possível a análise.

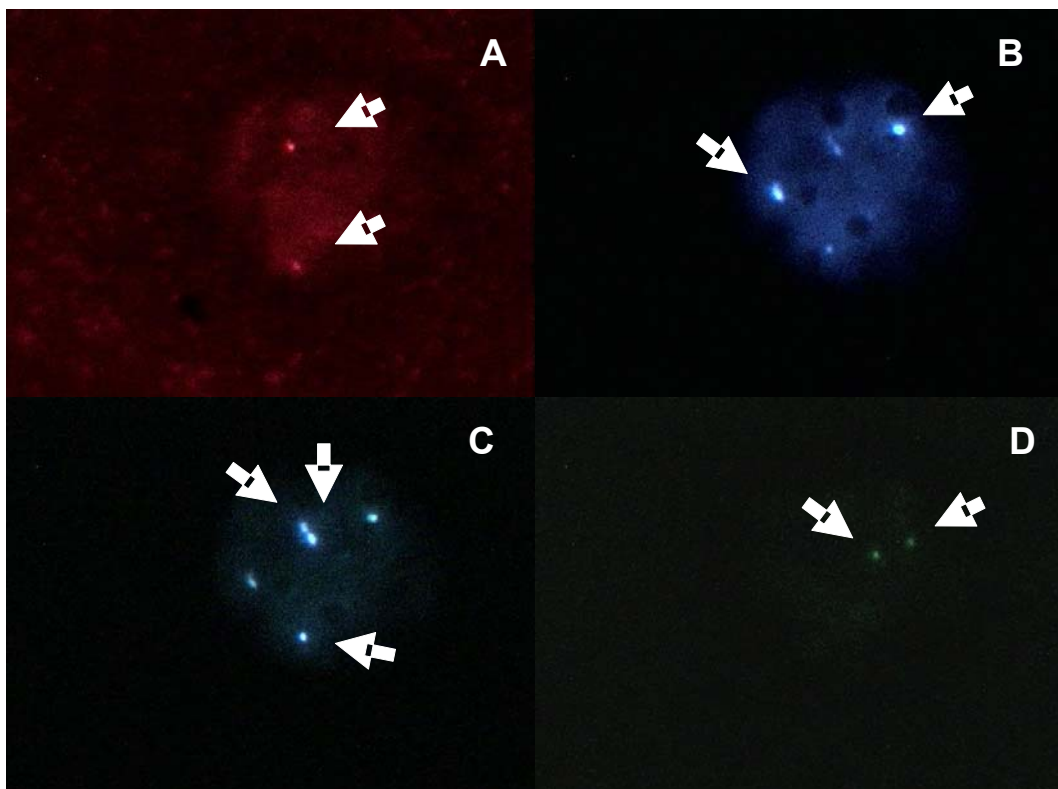


Figura 12 - Análise de blastômero por FISH

- A – Sonda do cromossomo 13 (dois sinais; LSI13, *Spectrum RED*)
- B – Sonda do cromossomo 18 (dois sinais; D18Z1, *Spectrum Aqua*)
- C – Sonda do cromossomo X, evidenciando a trissomia do X (três sinais; DXZ1, *Spectrum Blue*)
- D – Sonda do cromossomo 21 (dois sinais; LSI21 *Spectrum Green*)

Obs.: Não houve marcação da sonda do cromossomo Y (DYZ3, *Spectrum Gold*), pelo fato do embrião ser do sexo feminino

O resumo geral dos dados de todas as reações de PCR em tempo real, como a média dos Cts e ΔRn , está disposto na Tabela 6 e Figura 13.

Tabela 6 - Média do Ct e fluorescência ΔRn (desvio padrão)

Tipo de célula	Total	Sinal	Ct (desvio padrão)	ΔRn (desvio padrão)
Primeira fase (50μL)				
bucal feminina	16	β -globina	38,86 ^a (1,94)	1,04 (0,27)
bucal masculina	15	β -globina	38,24 ^b (0,97)	1,01 (0,18)
		TSPY	33,85 ^c (1,22)	1,70 (0,26)
blastômero masculino	9	β -globina	39,73 ^d (1,33)	0,72 (0,50)
		TSPY	36,72 ^e (2,47)	1,07 (0,55)
Segunda e terceira fase (25μL)				
bucal feminina	17	β -globina	37,34 ^{a, f} (1,18)	0,94 (0,25)
bucal masculina	15	β -globina	36,76 ^{b, g} (1,35)	0,72 (0,23)
		TSPY	33,47 ^{c, h} (1,40)	1,17 (0,44)
blastômero feminino	38	β -globina	37,27 ^f (2,08)	1,09 (0,40)
blastômero masculino	9	β -globina	36,59 ^{d, g} (1,00)	0,83 (0,15)
		TSPY	33,57 ^{e, h} (2,98)	1,28 (0,38)

Obs.: Na primeira fase não houve blastômero feminino

Diferença significativa:

^{a, b, d, e} $P < 0,01$

^{c, f, g, h} $P > 0,05$

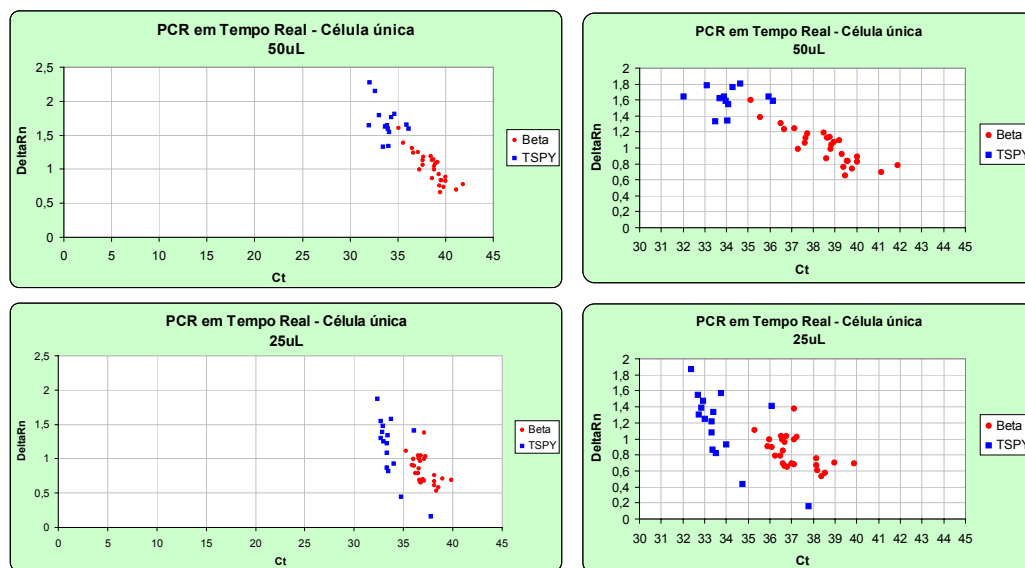


Figura 13. Comparação das reações com célula única bucal no volume de 50 e 25µL ($\Delta Rn \times Ct$)

Note que com volume menor a média de Cts é menor principalmente com o marcador da beta-globina, o que significa aumento da sensibilidade.

Obs.: O baixo desempenho de algumas amostras na reação de 25 µL ($\Delta Rn < 0,6$ para TSPY) foi causado pela degradação das sondas após mais de um ano em estoque, além disso as células estavam armazenadas há mais de seis meses (ultimas reações).

DISCUSSÃO

Pelo fato de se tratar de um exame de alta responsabilidade e complexidade, o PGD só pode ser empregado em rotina após exaustiva padronização do método utilizado. Por esse motivo, foram escolhidas as melhores condições possíveis para o desenvolvimento do método por PCR em tempo real e posteriormente os resultados comparados com a técnica padrão ouro para a sexagem de embriões humanos que é a FISH. A escolha do melhor método para lise

celular como também as melhores regiões genômicas para o desenho dos *primers* e sonda é de fundamental importância para se obter os melhores resultados possíveis. Além disso, o extremo cuidado em relação a uma possível contaminação de DNA exógeno é ponto crucial para resultados consistentes e confiáveis.

As regiões *TSPY* (DYS-14) e beta-globina foram escolhidas como alvo por serem cromossomo Y e 11 específicas, respectivamente. A região *TSPY* é uma região do cromossomo Y moderadamente repetitiva e conservada. A natureza repetitiva da região pode reduzir o impacto de variações pequenas no início da amplificação e pode conseqüentemente aumentar a chance de sucesso da técnica em célula única, sem o uso de *nested primers*. A região repetitiva aumenta a sensibilidade da técnica se comparar com a detecção de apenas uma cópia que é o que acontece com a região *SRY*, que é outra região específica do cromossomo Y. Adicionalmente, a detecção de apenas uma cópia inicial pode gerar ADO, o que dificilmente aconteceria com *TSPY* por possuir 20 a 30 cópias por genoma. Já a região do gene da beta-globina foi escolhida por três motivos principais. Primeiro, é uma região que já vem sendo usada no laboratório a longa data por outros experimentos com alto índice de sucesso de amplificação mesmo em pequenas quantidades de DNA (Martinhago *et al.*, 2006b). Segundo, é uma região localizada no cromossomo 11 o qual dificilmente apresenta aneuploidia (Gardner e Sutherland, 2004), o que intitula a região como um

excelente controle, diminuído a possibilidade de grandes variações de Ct. Por último, os primers foram desenhados para amplificar um fragmento da região da beta-globina que possui 4 cópias genômicas, e não apenas uma ou duas o que diminuiria a sensibilidade da técnica.

A solução de lise a base de proteinase K foi escolhida por seus altos índices de sucesso de amplificação além de ser atualmente a melhor escolha de lise celular contra ADO, segundo alguns autores (Piyamongkol *et al.*, 2003; Pierce *et al.*, 1999). Além disso, foram testados outros protocolos de lise dos quais tivemos um índice de sucesso de amplificação bem abaixo do esperado. A solução de lise celular foi feita a cada 3 meses em alíquotas de 30 μ L que eram imediatamente congeladas a -20° C. Toda alíquota descongelada e não usada foi descartada, pois uma vez descongelada a proteinase K pode perder sua atividade, sendo usada sempre uma nova alíquota para cada reação.

O principal motivo por ter escolhido o 25 μ L como volume final da reação foi o fato de apresentar mais uniformidade e consistência nos resultados além de resultar em menor índice de contaminação do que 50 μ L como volume final. A uniformidade dos resultados provavelmente se deve ao fato de que a quantidade inicial de DNA é fixa (uma célula), portanto é mais fácil detectá-lo em um volume menor (Tabela 5). Concernente a contaminação, no protocolo com volume maior, era obrigatório à abertura dos microtubos antes do passo da lise celular para poder adicional a solução de proteinase K. Adicionalmente, foi usado uma

solução salina dentro dos tubos para depositar a célula, o que é mais uma fonte de contaminação. Já no volume de 25µL, a embriologista colocava o blastômero direto na solução de lise, necessitando abrir o microtubo apenas para colocar os reagentes da PCR. Já os motivos da escolha de um mix pronto para realizar as reações de PCR em tempo real foram, primeiro, sua utilização evita possíveis fontes de contaminação durante a formulação do mesmo, e segundo, o mix já vem otimizado para o uso, não necessitando a otimização prévia dos reagentes, o que é na maioria das vezes dispendioso e caro.

Existe apenas um trabalho na literatura que utiliza a PCR em tempo real como técnica para sexagem de embriões humanos (Pierce *et al.*, 2000), porém utilizou outro método para detecção do produto amplificado (*Molecular beacons*), e outra região como controle que foi genes *U2*. No entanto, apesar do número de blastômeros analisados no nosso trabalho ter sido menor, obtivemos o mesmo índice geral de amplificação que foi de 83,33% (45/54), contra 83,78% (155/185). Além disso, o nosso índice geral de amplificação de célula única bucal otimizada que foi 100% (33/33), é semelhante com o reportado pelos referidos autores que embora tenha sido em linfócitos, foi de 99,07% (107/108). Sendo assim, nossos dados confirmam a referência da literatura sobre que a PCR em tempo real possui os melhores índices na identificação sexual em célula única (exceto blastômero) (Pierce *et al.*,

2000), pois o método de PCR fluorescente é de 97%, do FISH de 96% e por PCR convencional de 89% (Findlay *et al.*, 1998).

Perante os dados relacionados à PCR em tempo real em célula única, não houve diferença significativa dos Cts entre as células bucais e os blastômeros com o volume de 25µL. No entanto, podemos destacar que a variância de Ct entre os blastômeros foi maior que nas células bucais independente do volume final da reação. Isso provavelmente se deve pelas condições adversas que possa se encontrar em cada blastômero analisado, já que o DNA dessas células é oriundo de diferentes amostras e podem estar em diversas condições de haploidia (3n, 2n ou n) ou aneuploidia (Trissomias e monossomias). Além disso, pelo fato de se tratar de embriões que pararam sua divisão celular, seus blastômeros podem estar em condições de apoptose o que pode resultar em amplificação pobre ou ausência de amplificação. Certamente haveriam resultados mais consistentes e um índice de amplificação melhor, se fossem analisados blastômeros de embriões que clivam normalmente. Diferentemente, as células bucais oriundas de um mesmo indivíduo, apresentam uma grande similaridade genômica, assim podem gerar resultados mais uniformes. Além do mais, existe a possibilidade escolher as melhores células as quais eram bem delimitadas e continham núcleo visível durante o procedimento de isolamento de célula bucal, o que nem sempre é possível realizar com os blastômeros. Outro fato importante é que a média dos Cts resultantes do volume de 25µL foram

menores do que 50µL independente do tipo de célula, isso significa um aumento da sensibilidade da reação com o volume menor, com exceção *TSPY* em célula bucal masculina ($P=0,2217$). Além disso, o desvio padrão dos Cts foi menor em todas as reações de 25µL, com exceção apenas das células bucais masculinas (Tabela 5 e Figura 13).

Na fase em que foi comparado a PCR em tempo real com a FISH para detecção sexual dos embriões em blastômeros, o índice da PCR em tempo real de 74,3% foi menor do que da FISH de 80,00%. Porém, não houve discrepância no diagnóstico dos embriões entre as duas técnicas, mostrando uma especificidade absoluta. Porém, se desconsiderarmos erros de fixação dos blastômeros, ou nos casos em que não foi visto núcleo na lâmina antes da análise ($n=5$), o índice da FISH aumenta para 96,67% dos casos (29/30).

Estudos prévios sobre anormalidades genéticas em embriões produzidos por fertilização *in vitro*, documentam uma alta incidência de alterações cromossômicas e assume esse fato como a maior causa de falha de implantação e aborto precoce (Munné *et al.*, 1993, 1995 a, b, 1999; Delhanty *et al.*, 1993 e 1997; Harper *et al.*, 1995). No nosso projeto o qual utilizamos as sondas das cinco aneuploidias mais freqüentes em embriões impróprios para transferência, encontramos um índice de 54,17% (13/24 embriões) de embriões que possuíam pelo menos uma alteração cromossômica, conferindo o mesmo índice referido pela literatura.

Apesar de ter sido reconhecido um blastômero feminino tetraplóide (4n) por ter gerado o menor Ct para beta-globina (32,83), não foi possível reconhecer diferenças de DNA apenas pelo Ct. Como a máquina de PCR em tempo real que foi utilizada tem capacidade para detectar sondas de cinco comprimentos de onda diferentes, e nas reações para sexagem foi usado apenas três: um para o FAM, outro para VIC e o último é da referência passiva que está contida no mastermix (ROX), existe a possibilidade de se incorporar pelo menos mais uma ou duas sondas com seus respectivos *primers*. Com a incorporação da detecção de mais uma região genômica, como por exemplo, do cromossomo 21, é possível que se possa diferenciar os casos de trissomia do 21 (Síndrome de Down) com a quantificação relativa (entre duas regiões). Isso já é feito com sucesso quando se tem uma razoável quantidade de DNA, como no caso de diagnóstico pré-natal através do líquido amniótico (Tsuji *et al.*, 2006; Zimmermann *et al.*, 2006). Na quantificação relativa, utiliza-se uma região como controle e outra para a dosagem, a relação entre os Cts das duas regiões determina se existe uma cópia a mais ou a menos (Gao *et al.*, 2005; Joncourt *et al.*, 2004; Writzl *et al.*, 2005; Yobb *et al.*, 2005). Isso foi realizado no projeto com as regiões da beta-globina e *TSPY*, onde apresentou uma diferença relativa de 4. Porém, para se obter resultados mais consistentes em quantificação relativa, deve-se usar um controle de região de cópia única. Portanto, como teste foi usado uma região crítica do cromossomo 21 (*DSCR1*) com

uma sonda marcada com NED que possui comprimento de onda diferente do VIC (cromossomo 11) e realizada a quantificação relativa em DNA de um indivíduo com Síndrome de Down comparado com o DNA de um indivíduo normal. Os resultados preliminares são animadores, pois foi possível diferenciar nitidamente a cópia a mais do DNA portador da trissomia do 21 (Figura 14). Esperamos em curto espaço de tempo, padronizar a reação para pequenas quantidades de DNA como em célula única e conseqüentemente diagnosticar blastômeros perante o sexo e portador da trissomia do cromossomo 21.

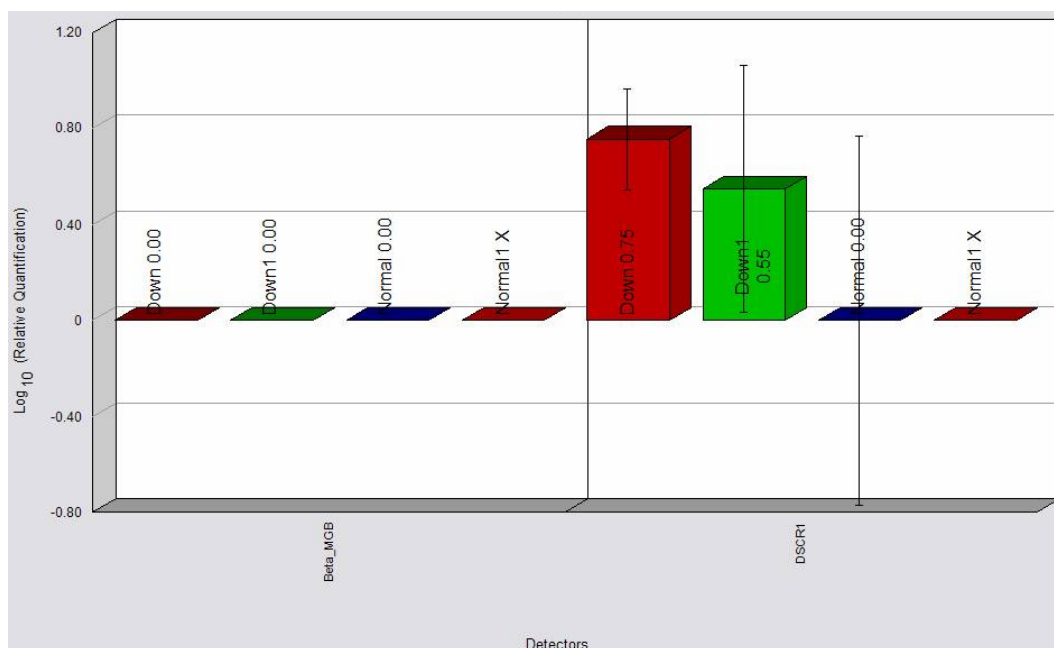


Figura 14 - Análise de quantificação relativa por PCR em tempo real de DNA de um indivíduo com Síndrome de Down comparada com um DNA normal

Note que na comparação da região do gene *DSCR1* (cromossomo 21) apresenta 0,55 a 0,75 cópias a mais que o indivíduo normal, evidenciando a enorme sensibilidade do método.

Outra possibilidade de estudo futuro em embriões com através duas técnicas, é a comparação de expressão de alguns genes que podem estar envolvidos com o mecanismo de aneuploidia. Através da técnica de FISH se diagnostica os embriões normais e aneuplóides e por PCR em tempo real compara-se a expressão dos genes (Gal *et al.*, 2006; Rinaudo *et al.*, 2006)

CONCLUSÃO

O método desenvolvido demonstrou rápido e seguro para a detecção do gênero sexual em célula única humana (bucal e blastômero), por uma tecnologia emergente chamada PCR em tempo real.

A comparação entre PCR tempo real e FISH mostrou absoluta concordância no diagnóstico do sexo embrionário.

REFERÊNCIAS

- Brown L, Abigania M, Warburton D, Brown S. 2006. Validation of QF-PCR for prenatal aneuploidy screening in the United States. *Prenat Diagn* Sep 4; [Epub ahead of print].
- Chong SS, Kristjansson K, Cota J, Handyside AH, Hughes MR. 1993. Preimplantation prevention of X-linked disease: reliable and rapid sex determination of single human cells by restriction analysis of simultaneously amplified ZFX and ZFY sequences. *Hum Mol Genet* 2:1187–1191.
- Coonen E, Dumoulin JMC, Ramaekers FCS, Hopman AHN. 1994. Optimal preparation of preimplantation embryo interphase nuclei for analysis by fluorescent *in situ* hybridisation. *Hum Reprod* 9: 533–537.
- Cui KH, Matthews CD. 1994. Preimplantation diagnosis. *Lancet* 343: 972–973.
- Delhanty J, Griffin D, Handyside AH, *et al.* 1993. Detection of aneuploidy and chromosomal mosaicism in human embryos during preimplantation sex determination by fluorescent *in situ* hybridisation (FISH). *Hum Mol Genet* 2: 1183–1185.
- Delhanty JDA, Harper JC, Ao A, Handyside AH, Winston RML. 1997. Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic

division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet* **99**: 755–760.

Donaghue C, Mann K, Docherty Z, Ogilvie CM. 2005. Detection of mosaicism for primary trisomies in prenatal samples by QF-PCR and karyotype analysis. *Prenat Diagn* **25**: 65–72.

Findlay I, Corby N, Rutherford A, Quirke P. 1998. Comparison of FISH PRINS, and conventional and fluorescent PCR for single-cell sexing: suitability for preimplantation genetic diagnosis. *J Assist Reprod Genet* **15**: 258–265

Findlay I, Urquhart A, Quirke P, Sullivan K, Rutherford AJ, Lilford RJ. 1995. Simultaneous DNA 'fingerprinting', diagnosis of sex and single-gene defect status from single cells. *Hum Reprod* **10**:1005–1013.

Fiorentino F, Biricik A, Karadayi H, *et al.* 2004. Development and clinical application of a strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders combined with HLA matching. *Mol Hum Reprod* **10**: 445–460. Epub 2004 Mar 25.

Gal AB, Carnwath JW, Dinnyes A, Herrmann D, Niemann H, Wrenzycki C.. 2006. Comparison of real-time polymerase chain reaction and end-point polymerase chain reaction for the analysis of gene expression in preimplantation embryos. *Reprod Fertil Dev* **18**:365-71.

- Gao Q, Thurston VC, Vance GH, Dlouhy SR, Hodes ME. 2005. Genetic diagnosis of PLP gene duplications/deletions in patients with Pelizaeus-Merzbacher disease. *Clin Genet* **68**: 466–467.
- Gardner RJM, Sutherland GR. 2004. *Chromosome abnormalities and genetic counseling*. Oxford University press: New York
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. 1990. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* **344**:768–770.
- Hardy K, Handyside AH. 1992. Biopsy of cleavage stage human embryos and diagnosis of single gene defects by DNA amplification. *Arch Pathol Lab Med* **116**: 388–392. Review.
- Harper JC, Boelaert K, Geraedts J, *et al.* 2006. ESHRE PGD Consortium data collection V: cycles from January to December 2002 with pregnancy follow-up to October 2003. *Hum Reprod* **21**: 3–21. Epub 2005 Sep 19.
- Harper JC, Coonen E, Handyside AH, Winston RML, Hopman AHN, Delhanty JDA. 1995. Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic, Preimplantation human embryos. *Prenat Diagn* **15**: 41–50.
- Heid CA, Stevens J, Livak KJ, Williams PM. 1996. Real time quantitative PCR. *Genome Res* **6**: 986–994.

- Holland PM, Suzanne M, Campbell JS, Noselli S, Cooper JA. 1991. Detection of specific polymerase chain reaction product by utilizing the 5'----3' exonuclease activity of *Thermus aquaticus* DNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 7276–7280.
- Joncourt F, Neuhaus B, Jostarndt-Foegen K, Kleinle S, Steiner B, Gallati S. (2004). Rapid identification of female carriers of DMD/BMD by quantitative real-time PCR. *Hum Mutat* **23**: 385-91.
- Kontogianni EH, Hardy K, Handyside, AH. 1991. Co-amplification of X- and Y-specific sequences for sexing preimplantation human embryos. In *Preimplantation Genetics*, Verlinsky Y, Kuliev A (eds.). Plenum Press: New York; 139–145.
- Kutyavin IV, Afonina IA, Mills A, *et al.* 2000. 3'-minor groove binder-DNA probes increase sequence specificity at PCR extension temperatures. *Nucleic Acids Res* **28**: 655–661.
- Lai AC, Lin BP, Chang CC, Tsai HD, Hwang VW, Lo HY. 1996. Pregnancies after transfer of ultrarapidly frozen human embryos. *J Assist Reprod Genet* **13**: 625–628.
- Levinson B, Fields RA, Harton GL, *et al.* 1992. Reliable gender screening for human preimplantation embryos, using multiple DNA target-sequences. *Hum Reprod* **7**: 1304–1313.

- Martinhago CD, de Oliveira RM, Tomitao Canas MD, *et al.* 2006a. Accuracy of fetal gender determination in maternal plasma at 5 and 6 weeks of pregnancy. *Prenat Diagn* Nov 7; [Epub ahead of print]
- Martinhago CD, de Oliveira RM, Canas MCT, *et al* 2006b. Determinação precoce do sexo fetal pela análise do DNA no plasma materno. *Rev Bras Ginecol Obstet* **28**: 190–194
- Mauri AL, Petersen CG, Baruffi RL, Franco JG Jr. 2001. A prospective, randomized comparison of two commercial media for ICSI and embryo culture. *J Assist Reprod Genet* **18**:378–381.
- McKusick VA. 1964. *On the X Chromosome of Man*. Waverly Press: Baltimore.
- Munné S, Grifo J, Alikani M, Cohen J, Tomkin G. 1995a. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. *Fertil Steril* **64**: 382–391.
- Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. 1993. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human Preimplantation embryos. *Hum Reprod* **8**: 2185–2191.
- Munné S, Magli C, Cohen J, *et al.* 1999. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Hum Reprod* **14**: 2191–2199.

- Munné S, Marquez C, Magli C, Morton P, Morrison L. 1998. Scoring criteria for preimplantation genetic diagnosis of numerical abnormalities for chromosomes X, Y, 13, 16, 18 and 21. *Mol Hum Reprod* **4**:863–870.
- Munné S, Sultan KM, Weier HU, Grifo JA, Cohen J, Rosenwaks Z. 1995b. Assessment of numeric abnormalities of X, Y, 18, and 16 chromosomes in preimplantation human embryos before transfer. *Am J Obstet Gynecol* **172**: 1191–1201.
- Pierce KE, Rice JE, Sanchez JA, Brenner C, Wangh LJ. 2000. Real-time PCR using molecular beacons for accurate detection of the Y chromosome in single human blastomeres. *Mol Hum Reprod* **6**: 1155–1164.
- Pierce KE, Rice JE, Sanchez JA and Wangh LJ. 1999. Comparison of cell lysis conditions for single cell PCR using molecular beacons to monitor reactions in real time. *Fertil Steril* **72**: s169.
- Piyamongkol W, Bermudez MG, Harper JC, Weels D. 2003. Detailed investigation of factors influencing amplification efficiency and allele drop-out in single cell PCR: implications for preimplantation genetic diagnosis. *Mol Hum Reprod* **9**: 411–240.
- Rechitsky S, Kuliev A, Sharapova T, *et al.* 2006. Preimplantation HLA typing with aneuploidy testing. *Reprod Biomed Online* **12**: 89–100.

- Rinaudo PF, Giritharan G, Talbi S, Dobson AT, Schultz RM. 2006. Effects of oxygen tension on gene expression in preimplantation mouse embryos. *Fertil Steril* **86** s 1252-65.
- Sato T, Ikuta K, Sherlock J, Adinolfi M, Suzumori K. 2003. Comparison between fluorescence in situ hybridization (FISH) and quantitative-fluorescent polymerase chain reaction (QF-PCR) for the detection of aneuploidies in single blastomeres. *Prenat Diagn* **23**:678–684.
- Sherlock J, Cirigliano V, Petrou M, Tutschek B, Adinolfi M. 1998. Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells. *Ann Hum Genet* **62**: 9–23.
- Stouffs K, Lissens W, Tournaye H, Van Steirteghem A, Liebaers I. 2005. The choice and outcome of the fertility treatment of 38 couples in whom the male partner has a Yq microdeletion. *Hum Reprod* **20**: 1887–1896. Epub 2005 Mar 24.
- Walburger DK, Afonina IA, Wydro R. 2001. An improved real time PCR method for simultaneous detection of C282Y and H63D mutations in the HFE gene associated with hereditary hemochromatosis. *Mutat Res* **432**: 69–78.
- Writzl K, Zorn B, Peterlin B. 2006. Preliminary analysis of AZFb region duplication by quantitative real-time PCR. *Hum Reprod* **21**: 753–754.

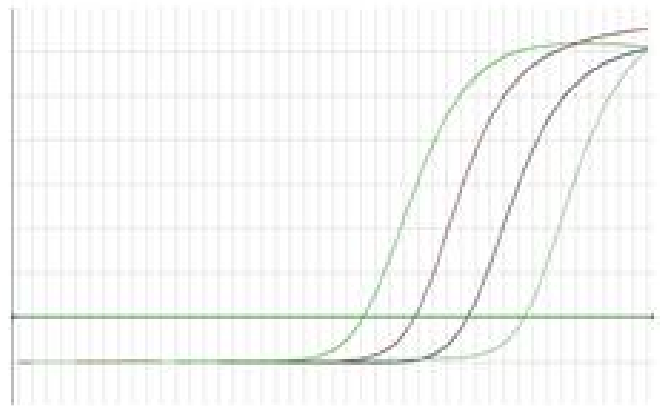
Yobb TM, Somerville MJ, Willatt L, et al. 2005. Microduplication and triplication of 22q11.2: a highly variable syndrome. *Am J Hum Genet* **76**: 865–876.

Tsujie T, Takemura M, Kimura T, et al. 2006. Rapid detection of trisomy 21 by gene dosage analysis using quantitative real-time polymerase chain reaction. *J Obstet Gynaecol Res* **32**: 368–372.

Zimmermann B, Levett L, Holzgreve W, Hahn S. 2006. Use of real-time polymerase chain reaction for the detection of fetal aneuploidies. *Methods Mol Biol* **336**: 83–100



Anexos



Anexo 1 – Protocolo de fixação de blastômero em lâmina para realizar FISH

Solução de difusão e pré-tratamento

1. Lavar os blastômeros biopsiados em meio Earle suplementado com 0,5% de albumina humana, usando microscópio estéreo.
2. Fazer um pequeno círculo atrás da lâmina (4mm).
3. Transferir o blastômero para gota de a 1-2 μ l de solução de difusão sobre a região marcada da lâmina. (Coonen *et al.*, 1994)
4. Espalhe o material nuclear utilizando um microscópio invertido (Olympus CK2; obj. 4x, 10x, 20x), não deixando a lâmina secar até que se visualize apenas o núcleo com citoplasma todo removido
5. Deixar as lâminas secarem a temperatura ambiente.(30 min).

Anexo 2 – Protocolo de isolamento e envio de blastômero para PGD/PCR

1. Manter a caixa congelada até que seja utilizada na biópsia.
2. Deixe os tubos de PCR e suas tampas sob luz UV durante 20 minutos.
3. Descongelar a solução de lise apenas imediatamente antes do uso, e mante-la resfriada na caixa.
4. Descongelar a solução de lise apenas uma vez, e descartar o que sobrar.
5. Colocar **3uL da solução de lise em cada tubo**. Manter os tubos fechados e na caixa para que não ocorra contaminação e mantenha os tubos resfriados.
6. Sempre manter os tubos fechados e abrir apenas o que está sendo utilizado.
7. Transferir para os tubos apenas blastômeros que seja visualizado núcleo, e logo que possível congelar os tubos.
8. Transferir 2-5 μ L do meio onde foi feito a biópsia em um tubo com solução de lise para ser utilizado como controle de contaminação (realizar um tubo para cada blastômero enviado). Esse tubo deve ser identificado com o número do embrião biopsiado com a letra C na frete.
9. Em caso de dúvida de contaminação, descartar o material.
10. Sempre usar luvas (sem talco) durante o procedimento, e caso seja necessário, troca-las constantemente.
11. Identificar os tubos nas tampas.
12. Imediatamente após o procedimento, congelar a caixa com os tubos durante pelo menos 3 horas. Sempre congelar a caixa no sentido correto (horizontal).
13. Retirar a caixa do freezer apenas quando for transportado, e embalar em uma caixa de isopor forrada com gelo seco.
14. Não deixar os blastômeros mais que 12 horas congelados para não comprometer a qualidade do DNA, e consequentemente o resultado do exame.

Anexo 3 – Protocolo para desenho de sondas e *primers* para PCR em tempo real

Sondas *TaqMan*

- Concentração de nucleotídeos C-G entre 30 a 80%
- Evitar nucleotídeos idênticos seqüenciais (especialmente guanina, onde há 4 ou mais G's – Ex. catcgggtaac)
- Evitar G na posição 5'
- Temperatura de anelamento entre 68-70° C p/ PCR quantitativa e, 65-67° C para discriminação alélica.
- Escolher regiões com mais C's que G's

***Primers* (oligonucleotídeos iniciadores)**

- Concentração nucleotídeos C-G entre 30-80%
- Evitar nucleotídeos idênticos seqüenciais (especialmente guanina, onde há 4 ou mais G's – Ex. catcgggtaac)
- Temperatura de anelamento entre 58-60° C
- Limite de G e/ou C na região final 3'. Os 5 nucleotídeos finais não devem ter mais que 2 G's ou C's
- Manter os *primers* mais próximos possíveis da sonda sem sobrepor-los.
- Usar tempo de anelamento de 60° C para PCR quantitativa, e 62° C para discriminação alélica.

Anexo 4 – Parecer do Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP



Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu



Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de
abril de 1997

Botucatu, 08 de novembro de 2.004

OF 541/2004-CEP
MACAH/asc

Ilustríssimo Senhor
Prof. Dr. José Gonçalves Franco Júnior
Departamento de Ginecologia e Obstetria
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezado Prof. Franco,

De ordem da Senhora Coordenadora deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Avaliação da eficácia das técnicas de FISH e PCR quantitativa (Real Time PCR) na detecção dos cromossomos sexuais em blastômero humano", de autoria de Ciro Dresch Martinhago, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 08/11/2004.

O CEP esclarece que mesmo se tratando de Genética Humana, o projeto não tem necessidade de envio a CONEP, pois cumpre as normas da Resolução 340 de 08/07/2004.

Situação do projeto perante o CEP: APROVADO.

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP

Anexo 5 – Parecer do Comitê de Ética da Universidade de Ribeirão Preto
– UNAERP



Memorando ComÉt/ N.º 024/05

Para: **Ciro Dresch Martinhago**

De: **Profª. Luciana Rezende Alves de Oliveira**
Comitê de Ética em Pesquisa

Data: **21 de Setembro de 2005**


REF.: Projeto de pesquisa n. 024/05

Prezado Senhor,

Encaminho o parecer desta comissão referente ao Projeto de pesquisa n. 024/05 intitulado: "Avaliação da eficiência do diagnóstico do sexo fetal e genotipagem do fator Rh em plasma materno pela técnica de PCR em tempo Real", para conhecimento do PARECER FAVORÁVEL, desta comissão.

Sem mais para a oportunidade,

Atenciosamente.


Profª. Luciana Rezende Alves de Oliveira
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade de Ribeirão Preto



Memorando ComÉt/ N.º 57/04

Para: **Dr. CIRO DRESCH MARTINHAGO**
Faculdade de Medicina de Botucatu UNESP

De: **Profa. Dra. Eneide Pereira dos Santos Aguiar**
Presidente da Comitê de Ética

Data: *18 de outubro de 2004*

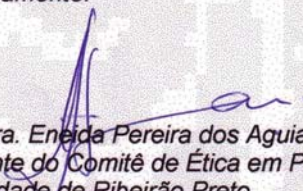
REF.: Projeto de pesquisa n. 31/04

Prezado Senhor,

Encaminho em anexo, o Programa n. 31/04 intitulado: "AVALIAÇÃO DA EFICÁCIA DAS TÉCNICAS DE FISH E PCR QUANTITATIVA (REAL TIME PCR) NA DETECÇÃO DOS CROMOSSOMOS SEXUAIS EM BLASTÔMERO HUMANO", para conhecimento do parecer desta comissão.

Sem mais para a oportunidade,

Atenciosamente.


Prof.ª Dra. Eneide Pereira dos Aguiar
Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade de Ribeirão Preto

Ribeirão Preto 18 de outubro de 2004

À
Profª Drª Eneida Pereira dos Santos Aguiar

O trabalho em destaque, “Avaliação da eficiência das técnicas de FISH e PCR quantitativa (Real Time PCR) na detecção dos cromossomos sexuais em blastômero humano”, de responsabilidade do pesquisador Dr. Ciro Dresch MARTINHAGO Sob a orientação do Prof. Dr. José Gonçalves Franco Junior deverá trazer contribuição com subsídios importantes a especialidades, o parecer é favorável e o projeto poderá ser desenvolvido.