

Diagnóstico genético pré-implantacional na fibrose cística: relato de caso

Preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis: a case report

Maria Cristina Santoro Biazotti¹, Walter Pinto Junior², Maria Cecília Romano Maciel de Albuquerque³, Litsuko Shimabukuro Fujihara⁴, Cláudia Haru Suganuma⁵, Renata Bednar Reigota², Carmen Sílvia Bertuzzo²

RESUMO

A fibrose cística é uma doença autossômica recessiva causada por mutações no gene regulador de condutância transmembrana na fibrose cística. Produz fenótipo variável, incluindo doença pulmonar, insuficiência pancreática, íleo meconial, além de agenesia bilateral dos ductos deferentes, causando azoospermia obstrutiva e infertilidade masculina. O diagnóstico genético pré-implantacional é uma alternativa diagnóstica, que permite identificar embriões portadores de fibrose cística e outras doenças genéticas. Relatamos o caso de um casal portador de fibrose cística, sendo a mulher portadora da mutação I148 T e o homem da mutação gênica Delta F508. O casal foi submetido a técnicas de fertilização *in vitro* associadas ao diagnóstico genético pré-implantacional, com consequente seleção de embriões saudáveis, que foram transferidos para o útero, resultando em gravidez sem intercorrências e com feto saudável, do sexo masculino.

Descritores: Fibrose cística; Fertilização *in vitro*; Diagnóstico genético pré-implantação; Relatos de casos

ABSTRACT

Cystic fibrosis is an autosomal recessive disorder caused by mutations in the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator gene. This disorder produces a variable phenotype including lung disease, pancreatic insufficiency, and meconium ileus plus bilateral agenesis of the vas deferens causing obstructive azoospermia and male infertility. Preimplantation genetic diagnosis is an alternative that allows identification of embryos affected by this or other genetic diseases. We report a case of couple with cystic fibrosis; the woman had the I148 T mutation and the man had the Delta F508 gene mutation. The couple underwent *in vitro* fertilization, associated with preimplantation genetic diagnosis, and with subsequent selection of healthy embryos

for uterine transfer. The result was an uneventful pregnancy and delivery of a healthy male baby.

Keywords: Cystic fibrosis; Fertilization *in vitro*; Preimplantation genetic diagnosis; Case reports

INTRODUÇÃO

As técnicas de reprodução assistida evoluem a cada dia, graças à melhoria nos equipamentos laboratoriais e dos meios para cultivo de gametas e embriões. A introdução de novas drogas utilizadas na indução da ovulação, e o aperfeiçoamento de técnicas de criopreservação de gametas e embriões são parte desse desenvolvimento.

Com esses avanços, casais portadores ou com antecedente de doenças genéticas podem ser beneficiados com a fertilização *in vitro* (FIV) associada ao diagnóstico genético pré-implantacional (PGD, *preimplantation genetic diagnosis*), permitindo a seleção de embriões saudáveis previamente à transferência intrauterina.⁽¹⁾

Diagnóstico genético pré-implantacional

O PGD foi desenvolvido com o intuito de fornecer alternativas para o diagnóstico pré-natal em casais com risco de transmissão de doenças genéticas à prole. Esse procedimento pode ser útil nos casos de doenças ligadas ao sexo, anomalias cromossômicas e defeitos envolvendo um único gene.⁽¹⁾

¹ Hospital Israelita Albert Einstein, São Paulo, SP, Brasil.

² Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, Brasil.

³ Centro Cochrane do Brasil, São Paulo, SP, Brasil.

⁴ Centro de Reprodução Humana Fertilvivo, São Paulo, SP, Brasil.

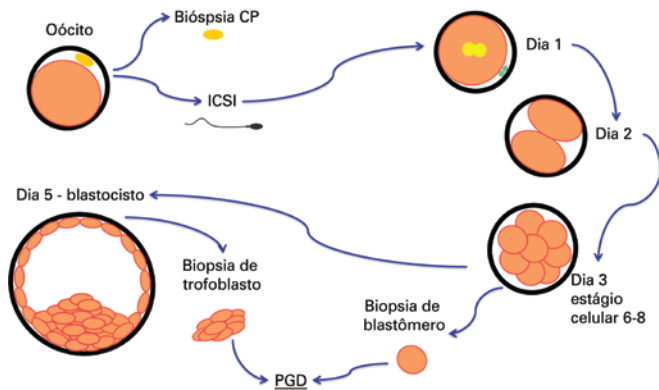
⁵ Sêmion, Centro de Medicina Reprodutiva, Campinas, SP, Brasil.

Autor correspondente: Maria Cristina Santoro Biazotti – Avenida Albert Einstein, 627/701 – Morumbi – CEP: 05652-900 – São Paulo, SP, Brasil – Tel.: (11) 2151-9205 – E-mail: biazotti@biazotti.com

Data de submissão: 21/3/2013 – Data de aceite: 25/2/2014

DOI: 10.1590/S1679-45082015RC2738

Na realização do PGD, os casais devem ser submetidos à FIV, mesmo na ausência da indicação dessa técnica (Figura 1). Para minimizar os riscos de contaminação por células parentais, durante a FIV, recomenda-se o uso da técnica de injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI, *intra-citoplasmic sperm injection*).⁽²⁾ Havendo fertilização, os embriões permanecem em cultivo, até que uma ou mais células possam ser retiradas e submetidas ao diagnóstico genético.⁽¹⁾



ICSI: *intra-citoplasmic sperm injection*; PGD: *preimplantation genetic diagnosis*.
Figura 1. Diagnóstico genético pré-implantacional

Para o PGD, utilizam-se técnicas baseadas na reação em cadeia da polimerase (PCR) e na citogenética molecular. Por muito tempo utilizada, a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (FISH) vem sendo substituída pela hibridização comparativa do genoma em *arrays* (aCGH, *Array-Comparative Genomic Hybridization*),^(3,4) que analisa ampliações e deleções específicas do genoma, permitindo detectar ganhos e perdas de material genético em regiões específicas do genoma com alta resolução (dez a cem vezes maior que as técnicas tradicionais),⁽⁵⁾ dependendo da plataforma de análise utilizada. Além disso, aCGH permite um estudo mais acurado das anomalias cromossômicas e deleções ou rearranjos genéticos do que o FISH.

Biópsia de embrião

A biópsia de embrião consiste na remoção de uma ou mais células do embrião pré-implantação para subsequente estudo genético. O primeiro caso de PGD em humanos foi relatado por Handyside et al.⁽⁶⁾

Após técnica de ICSI, os embriões são cultivados até o 3º dia de clivagem, podendo o cultivo se prolongar até a fase de blastocisto (5º/6º dia de cultivo) para, então, serem submetidos à biópsia, sem que haja prejuízo à implantação ou ao desenvolvimento gestacional.⁽⁶⁾ A biópsia é mais frequentemente realizada no 3º dia de

desenvolvimento embrionário (estágio de seis a oito células), sendo que um ou dois blastômeros é retirado de cada embrião⁽⁷⁾ (Figura 2). Uma das vantagens ao postergar a biópsia de embriões até o estágio de blastocisto é a possibilidade de obtenção de maior número de células (trofoderma) para a realização da análise genética, aumentando o número de cópias de DNA e a acurácia no diagnóstico.⁽⁸⁾



Figura 2. Biópsia

Fibrose cística

A fibrose cística (FC) é uma doença autossômica recessiva causada por mutações no gene regulador de condutância transmembrana na fibrose cística (CFTR, *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator*) e afeta 1 a cada 2.500 recém-nascidos.⁽⁹⁾ Esse gene codifica uma proteína expressa na membrana apical das células epiteliais exócrinas.⁽¹⁰⁾ Mutações no gene CFTR produzem um fenótipo variável, incluindo doença pulmonar, insuficiência pancreática, íleo mecônio⁽¹¹⁾ e também estão envolvidas na agenesia bilateral dos ductos deferentes, causando azoospermia obstrutiva e infertilidade masculina⁽¹²⁾ (Figura 3).

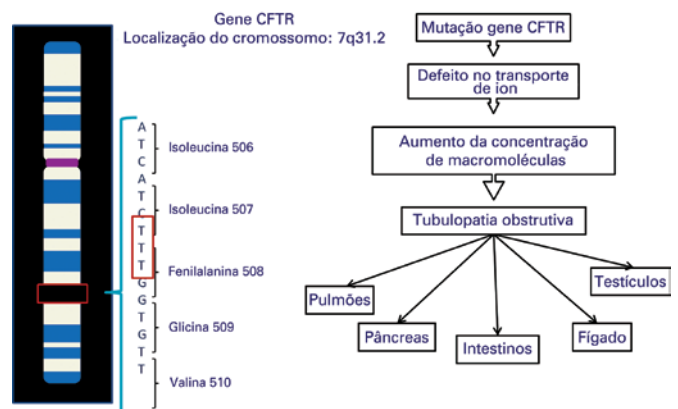


Figura 3. Fibrose cística

RELATO DE CASO

Relatamos aqui o caso de paciente do gênero feminino, 33 anos, sem filhos, inicialmente avaliada em 25 de março de 2004, com dificuldade para engravidar havia 2 anos. Referia menarca aos 11 anos, ciclo menstrual regular e antecedente materno de neoplasia maligna de mama. Apresentava, à ultrassonografia transvaginal, cisto simples paratubário à esquerda e imagem sugestiva de cisto dermoide à direita (16,0 x 12,0mm de diâmetro), estáveis havia 12 meses. Os exames laboratoriais e as pesquisas para fungo e bactérias, na secreção vaginal, foram normais. A paciente era sabidamente portadora da mutação I148 T para FC.

A paciente era casada há 12 anos. Seu parceiro de 33 anos apresentava acentuada oligospermia e diagnóstico de varicocele. Após correção cirúrgica, evoluiu com melhora dos parâmetros seminais, cuja concentração aumentou de 0,75 milhões/mL para 5,48 milhões/mL. O paciente era portador da mutação gênica Delta F508 para FC.

A paciente foi submetida à FIV/ICSI em setembro de 2004, com obtenção de sete embriões, dos quais três foram transferidos para o útero da paciente e quatro congelados. O teste de gravidez foi positivo em 22 de outubro de 2004, e a ultrassonografia transvaginal evidenciou um saco gestacional compatível com gestação de 5 semanas. Em 10 de dezembro, com 11ª semanas de gestação, foi submetida à biópsia de vilos coriais confirmando sexo masculino. Para avaliação da mutação Delta F508, foi realizada PCR e eletroforese em gel de poliacrilamida a 12%. Para pesquisa da mutação I148 T, foi realizada PCR com *primers* envolvendo o éxon 4. Em seguida, procedeu-se à digestão enzimática com enzima BsrI. Dessa forma, ficou comprovado tratar-se de embrião portador de FC.

A paciente evoluiu para abortamento e foi submetida à curetagem uterina em maio de 2005. Logo após, perdeu seguimento por 5 meses.

Observou-se que o casal apresentava os polimorfismos TUB18 e KM19, os quais possibilitariam a identificação de alelos mutantes em gestações futuras, aumentando, assim, o poder de detecção do embrião afetado.

Em abril de 2006, a paciente foi submetida à histeroscopia para ressecção de septo uterino secundário à curetagem prévia. Reiniciou o uso de análogo do GnRH em maio de 2006, além de antibiótico e polivitamínico. Entretanto, teve má resposta ao bloqueio do eixo hipotálamo-hipofisário.

Na etapa seguinte, optou-se por ciclo natural, com obtenção de folículo de 19,0mm de diâmetro em ovário direito e endométrio trilaminar, com 10,0mm de espes-

sura à ultrassonografia transvaginal, realizada em 31 de agosto de 2006.

Os quatro embriões previamente congelados foram biopsiados, utilizando-se a técnica de laser para perfuração da zona pelúcida, e, então, os blastômeros foram submetidos à avaliação genética. Não houve amplificação de *primers* no primeiro embrião, não sendo possível a pesquisa das mutações. O segundo blastômero era portador de ambas as mutações e, desse modo, portador de FC. O terceiro apresentou apenas a mutação I148 T e o quarto blastômero não apresentou nenhuma das mutações estudadas. O terceiro e o quarto embriões foram, então, transferidos no dia 5 de setembro de 2006. Ecografia realizada em 6 de novembro de 2006 evidenciou gestação compatível com 11 semanas e 5 dias pela biometria e feto com translucência nucal dentro da normalidade. Em 10 de maio de 2007, a paciente foi submetida à cesariana, dando à luz um recém-nascido do sexo masculino, com 3.320g e Apgar 8/10, sem intercorrências. Amamentou durante 2 meses e retornou à clínica 11 meses após o parto. À ocasião, a criança apresentava poliglobulia e eosinofilia aos exames laboratoriais, sem quaisquer outras alterações ou queixas.

DISCUSSÃO

Nas doenças autossômicas recessivas, cada um dos pais da criança afetada é portador de uma única cópia do alelo mutado. Em cada concepção, a possibilidade da criança nascer com a doença é 25%. Os portadores são assintomáticos e os casais somente têm consciência do problema quando já tiverem filhos afetados, algum parente acometido pela doença ou se houve investigação prévia do casal.⁽¹³⁾ Por essa razão, o PGD, associado à FIV/ICSI, parece ser a única maneira de evitar a recorrência.⁽¹⁴⁾

Taylor et al. concluíram que o laser não influenciou o procedimento de biópsia e nem afetou o desenvolvimento embrionário.⁽¹⁵⁾ Keymolen et al., em estudo realizado ao longo de 11 anos no Centro de Genética Médica, na Bélgica, relataram PGD em embriões de 47 casais, sendo a FC a indicação mais frequente desses procedimentos (55% dos casos). No total, 461 embriões foram submetidos à biópsia e, ao final do estudo, dentre os 25 recém-nascidos, não houve nenhum diagnóstico de FC.⁽¹⁶⁾

Neste relato, descrevemos o caso de PGD com nascimento de bebê saudável cujo casal apresentava risco de transmissão hereditária de FC. A esposa era portadora da mutação I148 T para FC e seu marido era portador da mutação gênica Delta F508 para a mesma doença. O casal foi submetido a procedimento de FVI/

ICSI, vitrificação e desvitrificação de embriões, PGD e transferência embrionária. Houve confirmação de gravidez, que ocorreu sem intercorrências, com nascimento de um menino por parto cesárea.

Em conclusão, o uso do PGD foi eficiente para a detecção de FC nos embriões avaliados. Essa experiência positiva serve de incentivo para o uso mais frequente dessa técnica e, também, estimula o desenvolvimento de protocolos de PGD para muitas outras doenças genéticas.

REFERÊNCIAS

1. Harper J. Preimplantation Genetic Diagnosis. 2a ed. Cambridge: Cambridge University Press; 2009.
2. ESHRE Capri Workshop Group. Intracytoplasmic sperm injection (ICSI) in 2006: evidence and evolution. *Hum Reprod Update*. 2007;13(6):515-26.
3. Simpson JL, Rechtsky S, Kuliev A. Next-generation sequencing for preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril*. 2013;99(5):1203-4.
4. Martín J, Cervero A, Mir P, Martínez-Conejero JA, Pellicer A, Simón C. The impact of next-generation sequencing technology on preimplantation genetic diagnosis and screening. *Fertil Steril*. 2013;99(4):1054-61. Review. Erratum in: *Fertil Steril*. 2013;99(6):1798. Conejero Martinez, Jose Antonio [corrected to Martínez-Conejero, Jose Antonio].
5. Theisen A. Microarray-based comparative genomic hybridization (aCGH). *Nature Educ*. 2008;1(1):45.
6. Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*. 1990;344(6268):768-70.
7. Harper JC, Boelaert K, Geraedts J, Harton G, Kearns WG, Moutou C, et al. ESHRE PGD Consortium data collection V: cycles from January to December 2002 with pregnancy follow-up to October 2003. *Hum Reprod*. 2006;21(1):3-21.
8. Kokkali G, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, Stavrou D, Jones GM, Cram DS, et al. Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassaemia: a pilot study. *Hum Reprod*. 2007;22(5):1443-9.
9. Sánchez-García JF, Benet J, Gutiérrez-Mateo C, Luís Sécúli J, Monrós E, Navarro J. Multiple mutation analysis of the cystic fibrosis gene in single cells. *Mol Hum Reprod*. 2005;11(6):463-8.
10. Zielenski J. Genotype and phenotype in cystic fibrosis. *Respiration*. 2000;67(2):117-33. Review.
11. Field PD, Martin NJ. CFTR mutation screening in an assisted reproductive clinic. *Aust N Z J Obstet Gynaecol*. 2011;51(6):536-9.
12. Ghorbel M, Baklouti-Gargouri S, Keskes R, Sellami-Ben Hamida A, Feki-Chakroun N, Bahloul A, et al. Screening of $\Delta F508$ mutation and IVS8-poly T polymorphism in CFTR gene in Tunisian infertile men without CBAVD. *Andrologia*. 2012;44 Suppl 1:376-82.
13. Alberola TM, Bautista-Llácer R, Vendrell X, García-Mengual E, Pardo M, Vila M, et al. Case report: birth of healthy twins after preimplantation genetic diagnosis of propionic acidemia. *J Assist Reprod Genet*. 2011;28(3):211-6.
14. Ozge A, Safak H, Ebru H, Evrim U, Bilge SE, Leyla O, et al. First successful preimplantation genetic diagnosis of epidermolysis bullosa with pyloric atresia: case study of a novel c.4505-4508insACTC mutation. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29(4):347-52.
15. Taylor TH, Gilchrist JW, Hallowell SV, Hanshew KK, Orris JJ, Glassner MJ, et al. The effects of different laser pulse lengths on the embryo biopsy procedure and embryo development to the blastocyst stage. *J Assist Reprod Genet*. 2010;27(11):663-7.
16. Keymolen K, Goossens V, De Rycke M, Sermon K, Boelaert K, Bonduelle M, et al. Clinical outcome of preimplantation genetic diagnosis for cystic fibrosis: the Brussels' experience. *Eur J Hum Genet*. 2007;15(7):752-8.