

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

JULIANA POLISSENI

**ESTUDO DA VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PÓS-
BIÓPSIA E DA AMPLIFICAÇÃO DE TODO O GENOMA:
MODELO EXPERIMENTAL PARA REALIZAÇÃO DO
DIAGNÓSTICO PRÉ-IMPLANTAÇÃO (PGD)**

JUIZ DE FORA

2008

UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA

Juliana Polisseni

ESTUDO DA VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PÓS-BIÓPSIA E DA AMPLIFICAÇÃO DE TODO O GENOMA: MODELO EXPERIMENTAL PARA REALIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO PRÉ-IMPLANTAÇÃO (PGD)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Saúde: área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Saúde.

ORIENTADOR: Profa. Dra. Vera Maria Peters

CO-ORIENTADOR: Dr. Wanderlei Ferreira de Sá

JUIZ DE FORA

2008

Polisseni,Juliana

Estudo da viabilidade de embriões bovinos pós-biópsia e da amplificação de todo o genoma: modelo experimental para a realização do diagnóstico pré-implantação (PGD)./ Juliana Polisseni – 2008.
50 f. : il .

Dissertação (Mestrado em Saúde) – Universidade Federal de Juiz de Fora, 2008

I. Embriologia. II. Título

CDU: 611-013

FOLHA DE APROVAÇÃO

JULIANA POLISSENI

ESTUDO DA VIABILIDADE DE EMBRIÕES BOVINOS PÓS-BIÓPSIA E DA AMPLIFICAÇÃO DE TODO O GENOMA: MODELO EXPERIMENTAL PARA REALIZAÇÃO DO DIAGNÓSTICO PRÉ-IMPLANTAÇÃO (PGD)

Dissertação de Mestrado apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Saúde: área de concentração em Saúde Brasileira da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Saúde.

Aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Vera Maria Peters (Orientador)

Universidade Federal de Juiz de Fora

Dr. Wanderlei Ferreira de Sá (Co-orientador)

Embrapa Gado de Leite

Profa. Dra. Martha de Oliveira Guerra

Universidade Federal de Juiz de Fora

Aos meus queridos pais Álvaro e Márcia, que são os principais responsáveis
por esta realização,

Às minhas irmãs Fernanda e Renata, que sempre me incentivaram,

Ao Guilherme, companheiro de todas as horas, pelo incentivo, cumplicidade
e paciência em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todas as pessoas que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho e em especial a:

Centro de Biologia da Reprodução – Universidade Federal de Juiz de Fora e Embrapa Gado de Leite, por propiciar a estrutura para o desenvolvimento do trabalho.

Profa. Dra. Vera Maria Peters, diretora do Centro de Biologia da Reprodução, minha orientadora, pela dedicação, paciência e confiança que depositou em mim, propiciando a oportunidade de atingir meu objetivo.

Dr. Wanderlei Ferreira de Sá, pesquisador da Embrapa Gado de Leite, meu co-orientador, pelo acolhimento desde o primeiro dia de trabalho, confiança e a quem devo grande parte da minha formação.

Profa. Dra. Martha de Oliveira Guerra, pelo carinho, paciência e disponibilidade em todos os momentos da realização do trabalho.

Dr. Marco Antônio Machado, pesquisador responsável pelo Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, pela disponibilidade e competência com que foi conduzida à parte da genética molecular deste trabalho, os quais foram imprescindíveis para prosseguir.

Aos pesquisadores do Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite, nas pessoas do Dr. Luis Sérgio de Almeida Camargo, Dr. João Henrique Moreira Viana e Dr. Bruno Campos pela contribuição neste trabalho.

Laboratório de Genética Molecular da Embrapa Gado de Leite, nas pessoas Dra. Ana Lúcia Campos, e dos bolsistas Robert e Ana Luísa pelo auxílio no desenvolvimento prático, pela paciência e gentileza com que sempre me receberam.

Laboratório de Reprodução Animal da Embrapa Gado de Leite, nas pessoas dos técnicos Myro Rodrigues e Joel Vianello, pelo auxílio no desenvolvimento do trabalho e as incontáveis idas, de madrugada, ao matadouro de Juiz de Fora e aos bolsistas Michele, Ríbrio e Paulo pela amizade e auxílio no desenvolvimento prático.

Aos pesquisadores e todos os funcionários do Centro de Biologia da Reprodução pelo apoio e enriquecedor convívio do dia-a-dia.

Às queridas amigas Raquel Varella Serapião, Izabella de Moura Folhadella, Alessandra de Almeida Ramos pela amizade e cumplicidade presente em todas as horas e que tornaram mais suaves os momentos difíceis desta caminhada.

Ao meu pai, Juliana, Lêda, Sônia, Natália, Roberto, Rafael, Eduardo e Hussen, colegas do curso de Pós-Graduação, pelo companheirismo e apoio indispensável.

Ao Programa de Pós-Graduação da Universidade Federal de Juiz de Fora, em nome da Profa. Dra. Darcília Maria Nagen da Costa, coordenadora adjunta e de ensino do Programa de Pós-Graduação em Saúde, pela disponibilidade e apoio.

A Embrapa Gado de Leite e Centro de Biologia da Reprodução, Fapemig (rede mineira de biotersimo 2824/05; 172/08 e toxicologia 2827/05; 173/08) e CNPq, que financiaram o trabalho, permitindo a realização do mesmo.

A Clínica Pró-Criar/Monte Sinai, em nome dos médicos Dra. Fernanda Polisseni, Josélio Vitoi Rosa, João Pedro Junqueira Caetano, pelo apoio no desenvolvimento do trabalho.

A Teca, Terezinha Resende, pela correção ortográfica da dissertação.

A Vânia, pela correção da formatação e referências bibliográficas.

A todos os meus familiares que sempre torceram por esta conquista.

RESUMO

O impacto da técnica de biópsia sobre o desenvolvimento embrionário posterior ainda foi pouco estudado e também não foi estabelecido um protocolo único e universal para o PGD. Outro ponto a considerar é a pequena quantidade de DNA genômico disponível para se realizar os estudos genéticos, pelo número reduzido de células obtidas pela técnica de biópsia. Metodologias que utilizam *whole genome amplification* (WGA) vêm sendo desenvolvidas. Utilizando este método é possível gerar microgramas de DNA partindo de pequenas quantidades de DNA. Então, o objetivo deste estudo foi avaliar o desenvolvimento de embriões bovinos submetidos à biópsia nos estádios de 8-16 células e o uso da técnica de amplificação de todo o genoma nos blastômeros retirados, para posterior identificação do sexo através do PCR. Um grupo de 706 complexos *cumulus*-ovócitos (CCOs) de bovinos foram maturados e fertilizados *in vitro*, em estufa incubadora a 38,8 °C, 95% de umidade e 5% de CO₂. Os prováveis zigotos foram semi-desnudados e cultivados no meio CR2aa sob as mesmas condições da fertilização. No quarto dia após a fertilização, embriões bovinos com 8-16 células foram aleatoriamente distribuídos entre dois grupos: controle (n=103) e biópsia (n=92). O número de células removidas correspondeu à quarta parte do embrião. Os blastômeros retirados foram submetidos à amplificação de todo o genoma seguido por PCR. Os embriões retornaram ao meio de cultivo para avaliação do desenvolvimento embrionário. Avaliou-se pelo teste do qui-quadrado a produção de blastocisto no oitavo dia de cultivo, a taxa de eclosão no décimo dia de cultivo, a eficiência da amplificação de todo o genoma e da identificação do sexo nos blastômeros removidos. O número de células embrionárias foi analisado por análise de variância ANOVA (Instituto SAS, Inc., Cary, NC, USA). A proporção de blastocisto no oitavo dia de cultivo foi avaliada pelo teste de Wilcoxon. Diferenças foram consideradas significantes se $P < 0,05$. Um total de 92 embriões bovinos foi utilizado para realização da técnica de biópsia e apresentaram produção de blastocisto de 53,3%, com 44,9% de taxa de eclosão. Essas taxas foram semelhantes ($P > 0,05$) às dos 103 embriões do grupo controle (66,0% e 42,6%, respectivamente). Não houve variação no número de células embrionárias entre os grupos e também não ocorreu diferença na proporção de blastocisto entre os grupos controle e biópsia no oitavo dia de cultivo ($P > 0,05$). Os blastômeros retirados foram submetidos à amplificação de todo o genoma, com 98,2% de eficiência. Entretanto, só foi possível identificar o sexo em 59% das amostras. Conclui-se que a técnica de biópsia realizada em embriões bovinos de 8-16 células não afetou o desenvolvimento embrionário subsequente nem a qualidade embrionária dos embriões. A utilização do kit de amplificação de todo o genoma mostrou-se eficiente nos blastômeros retirados, sendo possível identificar o sexo em mais da metade dos embriões.

Palavras-chaves: PGD. Sexagem. Qualidade embrionária. Taxa de eclosão.

ABSTRACT

The impact of biopsy technique on posterior embryo development is still poorly studied and there is no single universally practiced protocol for implementing PGD. Another thing to consider is the small amount of genomic DNA available to perform the genetic study, due to the reduced number of cells obtained from the biopsy. Alternatively, methodologies using whole genome amplification (WGA) have been developed. Using these methods, it is possible to generate microgram quantities of DNA starting with a little genomic DNA. The aim of this study was to evaluate the effect of biopsy at 8-to 16-cell bovine embryos on subsequent development and WGA on removed blastomeres. A group of 706 complexes cumulus oocytes (CCOs) obtained from local slaughterhouse ovaries were matured and fertilized in vitro, in incubator at 38.8°C with 95% humidified air and 5% of CO₂. The zygotes were semi-denuded and cultured in CR2aa medium under the same conditions as with in vitro fertilization. On the fourth day after fertilization the 8-to 16-cell embryos were distributed randomly across two groups: control (n=103) and biopsy (n=92). The amount of cells removed cells was one-fourth the embryo of blastomeres. The removed blastomeres were submitted to whole genome amplification (WGA) followed by PCR. The embryos were returned to culture for development evaluation. The chi-square test was used for statistic evaluation of the results of blastocyst rate on the eight day after fertilization and hatching rate on tenth day between biopsy and control group, to test the WGA efficiency and to determine the sex proportion of biopsied samples submitted to PCR. The number of cell per embryo was analyzed by ANOVA with SAS (SAS Institute, Inc., Cary, NC, USA). The blastocyst proportion was evaluated with Wilcoxon test. Differences were considered significant if $P < 0.05$. A total of 92 embryos were submitted to biopsy technique. The blastocyst production was 53.3%, with 44.9% of hatching rate. This rate was similar to control group (66.0% and 42.6%) found on 103 embryos. Overall, no impact was detected on embryo quality in blastocyst cell number between the two groups. The proportion of blastocyst in different stages of development on the 8th day did not differ among groups ($P > 0.05$). Removed blastomeres were submitted to WGA, resulting in 98.2% of efficiency. However, only 59% of samples were sexed by PCR. In conclusion biopsy of 8-to 16-cell bovine embryos did not affect subsequent development. WGA was successful in removed blastomeres and was possible to determinate the sex in the samples.

Keywords: PGD. Sexing. Embryo quality. Hatching rate.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Biópsia de embriões bovinos no terceiro dia após a fecundação. Legenda - A: fixação do embrião; B: introdução da micropipeta de biópsia; C: embrião pós-biópsia e blastômeros retirados com a realização da técnica (seta).....34
- Figura 2. Micrografia de blastocisto expandido, do grupo biópsia, corado por coloração de Giemsa para realização de contagem de células.....35

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DA LITERATURA	13
2.1 Infertilidade	13
2.1.1 <i>Infertilidade Masculina</i>	13
2.1.2 <i>Infertilidade Feminina</i>	16
2.2 Reprodução Assistida	18
2.2.1 <i>Inseminação Intra-Uterina (IIU)</i>	19
2.2.2 <i>Fertilização in vitro (FIV)</i>	20
2.2.3 <i>Injeção Intracitoplasmática do Espermatozóide (ICSI)</i>	20
2.3 Procedimentos corretivos em Reprodução Assistida	22
2.3.1 <i>Eclosão Assistida ou Assisted Hatching</i>	23
2.3.2 <i>Diagnóstico Pré-Implantação (PGD)</i>	24
2.3.2.1 <i>Técnica de Fluorescência e Hibridização in situ (FISH)</i>	24
2.3.2.2 <i>Técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)</i>	25
2.3.2.3 <i>Amplificação de todo o genoma ou Whole Genome Amplification (WGA)</i>	25
2.3.2.4 <i>Indicação do PGD</i>	26
3 MODELO EXPERIMENTAL	29
4 HIPÓTESES	30
5 OBJETIVOS	31
6 MATERIAL E MÉTODOS	32
6.1 Técnicas de Reprodução Assistida	32
6.1.1 <i>Coleta de ovários e seleção de ovócitos</i>	32
6.1.2 <i>Maturação in vitro dos ovócitos</i>	32
6.1.3 <i>Fertilização in vitro dos ovócitos</i>	33
6.1.4 <i>Cultivo in vitro dos embriões</i>	33
6.1.5 <i>Divisão dos embriões nos grupos experimentais</i>	33
6.1.6 <i>Biópsia dos embriões</i>	34
6.1.7 <i>Avaliação do desenvolvimento embrionário</i>	34
6.1.8 <i>Contagem de células</i>	35
6.2 Diagnóstico Pré-Implantação - Identificação do sexo	36
6.2.1 <i>Amostras de DNA</i>	36

<i>6.2.2 Amplificação de todo o genoma</i>	36
<i>6.2.3 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)</i>	37
6.3 Análise estatística	38
6.4 Termo de Aprovação e compromisso da agência financiadora	38
7 RESULTADOS	39
8 CONCLUSÃO	41
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42
APÊNDICE	51
Aceite de publicação do artigo	51

INTRODUÇÃO

A infertilidade humana afeta um em cada sete casais, atingindo 15 a 25% da população mundial. Estima-se que 35% das causas estejam ligadas ao fator feminino, 30% ao fator masculino, 20% relacionadas a ambos os parceiros e 15% dos casos permanecem sem um diagnóstico etiológico (EDWARDS; BRODY, 1995). Trata-se de problemas médico e social para o qual o tratamento alopático e cirúrgico é eficaz, mas quando se trata de casos de infertilidade severa o único recurso é a Fertilização Assistida.

O termo Fertilização Assistida refere-se aos procedimentos que, por meio de tecnologia avançada, facilita-se o encontro do ovócito com o espermatozóide. De uma maneira mais ampla, a Fertilização Assistida engloba a Inseminação Intra-Uterina (IIU), a Fertilização *in vitro* (FIV) e Injeção Intracitoplasmática do Espermatozóide (ICSI) (PASSOS, 2004).

O nascimento de Louise Brown, em 1978, na Inglaterra, foi o marco inicial do sucesso das Técnicas de Reprodução Assistida (TRA). Nas duas décadas que se seguiram houve um rápido avanço científico com o desenvolvimento de técnicas laboratoriais complexas. Em 1991, ocorreu uma revolução no tratamento dos casais inférteis com o surgimento da ICSI (EDWARDS; BRODY, 1995). O congelamento dos espermatozoides e, depois, do embrião tornou o tratamento mais flexível. Métodos para congelar tecido gonadal e ovócitos ainda estão sendo investigados (KAARIAINEN; EVERS-KIEBOOMS; COVIELLO, 2005).

Apesar do grande progresso científico das Técnicas de Reprodução Assistida, ainda ocorre alta incidência de falhas na fertilização e implantação embrionária (PETERSON, 2004; COHEN; WELLS; MUNNÉ, 2007), o que torna a seleção dos embriões, antes da transferência, um dos pontos mais importantes das TRA's. Entretanto, a seleção dos embriões, na maioria dos serviços de reprodução humana, ainda baseia-se em características morfológicas como parâmetros de qualidade embrionária, não levando em consideração o genótipo/genoma embrionário.

Técnicas que permitem a análise do constituinte cromossomal dos embriões desenvolvidos *in vitro*, denominadas Diagnóstico Pré-Implantacional (PGD), tornam-se importantes por possibilitar a identificação de embriões anormais (DELHANTY; HANDYSIDE, 1995; HILL, 2004; VERLINSKY et al., 2004). Tais técnicas podem ser

aplicadas em situações onde ocorram doenças monogenéticas, relacionadas ao sexo ou maior produção de embriões com desequilíbrio cromossômico numérico ou estrutural. Essas técnicas identificam até 80% das anormalidades cromossômicas, o que poderá reduzir a incidência de aborto espontâneo e nascimento de crianças com doenças ligadas ao sexo (MUNNÉ, 2003; SERMON; STEIRTEGHEN; LIEBAERS, 2004).

A técnica de biópsia, passo principal para a realização do PGD, também tem grande impacto no mundo científico atual e vem sendo utilizada para se obter células-tronco em modelos experimentais (JIMENEZ-MACEDO et al., 2007). Desta forma, as pesquisas estão avançando, já que a técnica respeitaria os limites éticos por não destruir o embrião para produção de uma nova linhagem celular.

Em contrapartida, a biópsia é um método invasivo que pode causar danos ao embrião. As técnicas e subsequente cultivo dos embriões biopsiados também são outras variáveis que afetam a realização do diagnóstico genético, uma vez que não existe protocolo-padrão para realizar o PGD (COHEN; WELLS; MUNNÉ, 2007).

Outro problema para a realização do PGD é a pequena quantidade de DNA genômico disponível para se realizar o estudo genético. Portanto, o número de células retirado para se realizar o PGD (um ou dois blastômeros) torna-se insuficiente para análises extensivas. Para solucionar esse problema, metodologias utilizando kits que têm a capacidade de amplificar todo genoma (WGA) vêm sendo desenvolvidas, tornando possível gerar microgramas de DNA a partir de uma única célula (HUGHES et al., 2005).

Sabendo-se que a técnica de biópsia ainda não tem sido bem estudada quanto à sobrevivência e qualidade embrionária dos embriões biopsiados (JIMENEZ-MACEDO et al., 2007), e da dificuldade de se analisar a pequena quantidade de material genômico oriundo da biópsia dos embriões, o presente estudo teve como objetivo avaliar o desenvolvimento e qualidade embrionária posterior à realização da técnica de biópsia, utilizando embriões bovinos como modelo experimental. Além disso, será avaliado o uso da técnica de amplificação de todo o genoma nos blastômeros retirados, os quais serão submetidos ao PCR para diagnóstico do sexo.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Infertilidade

A infertilidade é reconhecida como a incapacidade de conceber após um ano de intercurso sexual, sem uso de qualquer tipo de contraceptivo (EDWARDS; BRODY, 1995); ou dois anos, quando se trata de casais jovens, na ausência de outros fatores de risco; ou ainda, pode ser antecipada para apenas seis meses, em mulheres acima de 35 anos (CAMARGOS; MELO, 2001).

É classificada como primária se presente em um casal cuja mulher nunca engravidou e secundária ou subfertilidade se a mulher já engravidou, mesmo que a gravidez não tenha chegado a termo (SPEROFF; GLASS; KASE, 1989).

A infertilidade afeta um em cada sete casais, atingindo 15 a 25% da população mundial. Estima-se que 35% das causas estejam ligadas ao fator feminino, 30% ao fator masculino, 20% relacionadas a ambos os parceiros e 15% dos casos permanecem sem um diagnóstico etiológico (EDWARDS; BRODY, 1995).

A fecundidade tem sido prejudicada pela tendência progressiva da mulher em retardar a maternidade em favor do sucesso na vida socioeconômica, pelo envelhecimento da população, por mudanças no perfil social e sexual, pela maior exposição a fatores ambientais (tabagismo, álcool, drogas), por incidência de doenças sexualmente transmissíveis e pelo aumento do uso de contraceptivo (CAMARGOS; MELO, 2001; SKULL, 2004).

2.1.1 Infertilidade Masculina

Infertilidade masculina é a situação na qual a inabilidade de conceber uma criança está associada com alteração identificada no homem (SPEROFF; GLASS; KASE, 1989). A chance de um homem apresentar problemas de fertilidade é da ordem de 7%. O homem participa como fator causal, isolado ou conjugal, em metade dos casos de infertilidade (EDWARDS; BRODY, 1995).

Geralmente as causas de infertilidade no homem podem estar associadas à baixa concentração de espermatozóides (oligozoospermia – 9%), pequena motilidade dos espermatozóides (astenozoospermia – 17%), morfologia espermática anormal (teratozoospermia – 10%), ou oligoastenoteratozoospermia (21%), mas a maioria das causas de subfertilidade masculina é de causa desconhecida (CAMARGOS; MELO, 2001; ISIDORI; LATINI; ROMANELLI, 2005).

Alterações na espermatogênese podem estar relacionadas com mudanças nos hábitos de vida, os quais provocam, ao longo do tempo, doenças sistêmicas e desordens endócrinas (HIRSH, 2003). Agentes poluentes industriais e do meio ambiente têm sido relacionados a alterações de fertilidade, por ação direta do agente, ou de forma indireta, por meio de seus metabólitos e aumento da incidência do câncer testicular (OLIVA; SPIRA; MULTIGNER, 2001).

Os principais fatores de risco para a infertilidade masculina são:

- **medicamentos** (imunossupressores, anabolizantes, antiandrógenos): drogas e toxinas podem alterar a espermatogênese por mecanismos diversos, já que parecem apresentar efeitos gonadotóxicos. A quimioterapia é mutagênica, afetando a espermatogônia e espermátócitos de acordo com a dose. Já a ingestão de anabolizantes ou andrógenos suprime a secreção de gonadotrofinas hipofisárias e também afetam a espermatogênese (CAMARGOS; MELO, 2001);

- **drogas** (maconha, cocaína, álcool, heroína): produzem decréscimo crônico da secreção da testosterona (LACKNER et al., 2005);

- **doenças infecciosas** (tuberculose, doenças sexualmente transmissíveis): causam obstruções parciais ou totais da via seminal e/ou alterações histológicas gonadais. Infecções bacterianas geniturinárias, por exemplo, quando não tratadas precocemente, podem causar orquiepididimite que, por sua vez, poderá provocar um processo obstrutivo do sistema ductal (LACKNER et al., 2005);

- **estrógenos**: endógenos (hepatopatias, obesidade), ou exógenos (alimentação, pesticida). O estrógeno do meio ambiente e da dieta têm causado maior incidência de malformações do trato genital e suspeita-se causar diminuição na contagem de espermatozóides (HIRSH, 2003);

- **doenças crônicas**: a Diabetes *Mellitus* pode determinar lesões neuropáticas, conduzindo à ejaculação retrógrada e alteração de outros órgãos relacionados à reprodução (CAMARGOS; MELO, 2001);

- **fatores ocupacionais e ambientais** (calor, radiação, metais pesados): exposições freqüentes a radiações ou a temperaturas elevadas podem alterar a função testicular, levando a uma diminuição na qualidade e quantidade de espermatozóides e disfunção epididimária. O efeito do contato prolongado com metais pesados pode, também, determinar alterações na espermatogênese, causando fibrose testicular e alterações no eixo hormonal (OLIVA; SPIRA; MULTIGNER, 2001);

- **estresse**: pode induzir um quadro de infertilidade por atuar em todas as etapas fisiológicas da espermatogênese, causando uma parada no hormônio gonadotrófico, levando ao hipogonadismo (CWIKEL; GIDRON; SHEINER, 2004);

- **fatores imunológicos** (biópsia testicular, trauma, vasectomia): traumas, infecções e alguns procedimentos cirúrgicos, envolvendo gônadas e via seminal, podem gerar a presença de anticorpos antiespermatozóides por quebra da barreira hematotesticular (SPEROFF; GLASS; KASE, 1989);

- **tabagismo**: pode levar à diminuição da produção de espermatozóides e a alteração da sua morfologia e motilidade, já que o tabaco decresce a libido (SAID; RANGA; AGARWAL, 2005);

- **idade avançada**: as comorbidades que acompanham o avanço da idade podem reduzir significativamente as taxas de gravidez, predispondo a infertilidade. A relação da idade com a fertilidade ainda não foi completamente estabelecida (LACKNER et al., 2005). Com o aumento da idade, os níveis de testosterona no homem diminuem, enquanto os índices de estradiol e estrona aumentam, ocorrendo um decréscimo na densidade do líquido seminal, motilidade e morfologia dos espermatozóides (SKULL, 2004). Homens jovens possuem 90% de presença de espermátide nos túbulos seminíferos, a qual decresce para 50% aos 50 a 70 anos e 10% aos oitenta anos. Cerca de 50% das células de *Sertoli* serão perdidas até os 50 anos de idade, enquanto as células de *Leydig* reduzem-se em torno dos 60 anos (ESKENAZI et al., 2003; ROCHEBROCHARD et al., 2006);

- **alterações hormonais**: o hipo ou hipertireoidismo, hiperprolactinemia e hipogonadismo podem afetar o eixo hipotálamo-hipofisário gonadal, levando à infertilidade (EDWARDS; BRODY, 1995; CAMARGOS; MELO, 2001);

- **alterações genéticas**: 10% a 15% dos pacientes com azoospermia não obstrutiva apresentam deleções no cromossoma Y. Em 90% dos pacientes com ausência congênita bilateral dos ductos deferentes pelo menos uma mutação

genética é detectada. Os pacientes inférteis apresentam risco aumentado de dissomias nos cromossomos 1, 13, 21 e Y, resultando em um grande número de espermatozóides aneuplóides (SKULL, 2004).

Setenta por cento da infertilidade pode ser diagnosticada pela história familiar, exame físico, volume testicular e hormonal, além da análise do sêmen do paciente. A motilidade espermática e a concentração de espermatozóides, entretanto, mostraram ser informações de maior acurácia, já que a avaliação da infertilidade está completamente associada ao decréscimo na qualidade do movimento flagelar e na quantidade de espermatozóide (ÁLVAREZ et al., 2003; NALLELA et al., 2006).

2.1.2 Infertilidade Feminina

O declínio da fertilidade na mulher é de aproximadamente 3% ao ano, mas torna-se mais evidente em mulheres com mais de trinta anos (9%), reduzindo as taxas de gravidez (10% a 0% por ciclo) entre as idades de 40 a 45 anos (EDUARDES; BRODY, 1995).

A aceleração na perda dos folículos residuais, após os 37 anos de idade, acarretará uma discreta desproporção nos níveis hormonais, com aumento do Hormônio Folículo Estimulante (FSH) e diminuição da inibina (CAMARGOS; MELO, 2001). A qualidade dos ovócitos também será reduzida, já que, teoricamente, os melhores folículos correspondem àqueles dos primeiros ciclos, ficando os piores para ciclos tardios, demonstrando a depleção da reserva ovariana (SKULL, 2004). Ovulações tardias, disfunção endócrina, patologias uterinas e desordens na fertilização, também aumentam (10% para 33%) em mulheres grávidas, com idade entre de 30 a 40 anos de idade. Todo o processo acelera-se consideravelmente a partir dos 40 anos de vida da mulher, com aumento das taxas de abortos e anomalias ao nascimento, causadas por erros meióticos (PORTER; SCOTT, 2005).

As principais causas de infertilidade primária e secundária incluem desordens ovulatórias (32%) e tubárias (26%), as quais podem ser detectadas por ultra-som, a saber:

- **fator ovariano**: os distúrbios da ovulação correspondem, aproximadamente, a 15% das causas de infertilidade. Pode-se alcançar até 40% de incidência

analisando-se apenas o fator feminino (SPEROFF; GLASS; KASE, 1989). A disfunção ovulatória pode corresponder à anovulação, à oligovulação, ou até estar presente em ciclos menstruais normais. É suspeitada em relatos de menarca tardia, duração anormal dos ciclos e pacientes que se submetem aos exercícios físicos excessivos ou mudanças agressivas na massa corporal (CAMARGOS; MELO, 2001; BARBIERI et al., 2005). Podem ainda estar relacionada às portadoras de Diabetes *Mellitus*, tireoidopatias, a sintomas sugestivos de hiperprolactinemia ou a mulheres que se submeteram a quimioterapia ou radioterapia (EDUARDES; BRODY, 1995). A síndrome do ovário policístico, caracterizada por ausência de folículo dominante e presença de múltiplos folículos, também é um distúrbio resultante da foliculogênese anormal e esteirodogênese. Mulheres com disfunção reprodutiva e desordem metabólica têm maior ocorrência de abortos, doença na maioria das vezes, causada por hipersecreção do Hormônio Luteinizante (LH), hiperandrogenia e hiperinsulímia (SPUY; VAN DER, 2004);

- **fator cervical:** apresenta uma prevalência de 5% das causas de infertilidade, juntamente com outros fatores etiológicos. Compreende as malformações, lesões neoplásicas ou benignas (pólipos, miomas) e infecções diversas (SKULL, 2004);

- **fator uterino corporal:** muitas vezes o diagnóstico de anormalidade uterina é feito por exclusão. As malformações congênitas variam desde agenesia de qualquer porção do trato genital inferior associado ou não a malformações *Mullerianas*, como o útero septado (associado mais freqüentemente a perdas gestacionais precoces), o unicorno e o bicorno. Essas anormalidades prejudicam a fertilidade tanto ao interferir no transporte do ovócito ou zigoto, por obstrução do óstio tubário, quanto no processo de implantação (SPEROFF; GLASS; KASE, 1989; BARBIERI et al., 2005);

- **fator tubo peritonia:** sua incidência tem crescido progressivamente nas últimas décadas devido à alta prevalência de doenças sexualmente transmissíveis, sendo a *Neisseria gonorrhoea* e *Chlamydia trachomatis* as causas mais prevalentes de contaminação entre as mulheres. Representa 35% dos fatores que afetam a vida reprodutiva da mulher (GARCIA-ULLOA; ARRIETA, 2005);

- **infertilidade sem causa aparente (ESCA):** depois de concluída a investigação do casal e não encontrada qualquer causa que poderia afetar a sua fertilidade, a esterilidade é denominada ESCA. Está presente em cerca de 10% das

causas de infertilidade. As alterações imunológicas representam incidência de 40% com essa esterilidade (EDWARDS; BRODY, 1995);

- **endometriose**: patologia reconhecidamente associada à infertilidade, a endometriose não tem fisiopatologia determinada. Entretanto, tem-se associado à endometriose e anormalidades, como anovulação, síndrome do ovário policístico, prevalência de câncer ovariano, possivelmente por alterações em hormônios endógenos (BRINTON et al., 2004).

A indução da ovulação em mulheres anovulatória mostra-se, na maioria das vezes, eficaz, podendo estas serem submetidas às Técnicas de Reprodução Assistida (TRA) (CAMARGOS; MELO, 2001).

2.2 Reprodução Assistida

A possibilidade de cultura do ovócito foi reconhecida no final do século dezenove, mas somente no início de 1930 utilizaram-se modelos animais (camundongos e ratos) para realização de cultura de ovócitos e capacitação espermática. Resultados positivos obtidos com fertilização e formação de zigotos permitiram a transferência de embriões para o útero, contribuindo para o estabelecimento da técnica (FRANCO JUNIOR; BARUFI; MAURI, 2004). Mais tarde, métodos de coleta ovular foram propostos, enfatizando a vantagem do acompanhamento ultrassonográfico.

Ao longo da evolução da Reprodução Assistida, o conhecimento da dinâmica folicular e o uso de gonadotrofinas permitiram o estabelecimento de diversos protocolos de estimulação ovariana e multiovulação. A supressão do LH se tornou necessária nos protocolos de indução. Esquemas envolvendo longo tempo de supressão de LH, iniciando-se no estágio folicular do ciclo anterior foram denominados protocolos longos e, outros, que seriam iniciados no mesmo ciclo, foram denominados *Flare up* (CAMARGOS; MELO, 2001; PASSOS, 2004).

O nascimento de Louise Brown, em 1978, na Inglaterra foi o marco inicial do sucesso das Técnicas de Reprodução Assistida (TRA). Nas duas décadas que se seguiram houve acelerado progresso científico com o desenvolvimento de técnicas laboratoriais complexas (EDWARDS; BRODY, 1995).

Em 1991, a Injeção Intracitoplasmática do Espermatozóide (ICSI) começou a ser utilizada e revolucionou o tratamento dos casais inférteis. O congelamento dos espermatozóides e, depois, do embrião tornou o tratamento mais flexível. Métodos para congelar tecido gonadal e ovócitos ainda estão sendo investigados (KAARIAINEN; EVERS-KIEBOOMS; COVIELLO, 2005).

O termo Fertilização Assistida refere-se aos procedimentos que facilitam o encontro do ovócito com o espermatozóide, através de alta tecnologia. A Fertilização Assistida engloba técnicas menos complexas, como a Inseminação Intra-Uterina (IIU) e, técnicas mais complexas, como a Fertilização *in vitro* (FIV) e ICSI (PASSOS, 2004).

2.2.1 Inseminação Intra-Uterina (IIU)

A Inseminação teve como finalidade facilitar a chegada dos espermatozóides nas trompas num período adequado para a fertilização dos ovócitos. Desta forma, alguns problemas de infertilidade poderiam ser corrigidos: muco cervical de baixa qualidade, presença de anticorpos antiespermatozóides no muco cervical, oligoastenozoospermia, defeitos nos mecanismos do ejaculado e até mesmo os casos de infertilidade sem causa aparente (CAMARGOS; MELO, 2001). A aplicação da IIU aprimorou-se através das técnicas de capacitação espermática, as quais promovem a separação do espermatozóide das prostaglandinas, agentes infecciosos, proteínas antigênicas, além de leucócitos, células germinativas imaturas e espermatozóides imóveis, reduzindo a formação dos radicais oxidantes e melhorando a capacidade de fertilização (FRANCO JUNIOR; BARUFI; MAURI, 2004).

A IIU com estimulação do ovário é um tratamento simples e barato para subfertilidade, entretanto, a taxa de gravidez por ciclo varia entre 8% a 22%. A grande variabilidade nas taxas é explicada pela diversidade nas características dos protocolos de estimulação e técnicas de preparo do sêmen utilizado para inseminação (NUOJUA-HUTTUNEN et al., 1999).

2.2.2 Fertilização *in vitro* (FIV)

A FIV é basicamente utilizada de modo a se recriar, artificialmente, a função das tubas uterinas. Para isso utilizam-se técnicas de estimulação ovariana, capacitação dos espermatozóides, aspiração folicular para coleta dos ovócitos, inseminação com os espermatozóides capacitados, cultivo e transferência dos embriões.

As indicações da FIV incluem variadas condições como obstrução tubária, infertilidade inexplicável, anormalidades na ovulação, endometriose e aborto de repetição (CHAN, 2006).

Um dos problemas da técnica é a indisponibilidade do efeito filtrante do muco cervical e junção útero tubária como acontece *in vivo*, provocando um aumento do risco de penetração de mais de um espermatozóide por ovócito, ou a penetração por espermatozóides anormais, já que o mecanismo do bloqueio da zona pelúcida pode não ser eficiente (SPEROFF; GLASS; KASE, 1989).

Depois de 25 anos de desenvolvimento, a técnica de FIV mostra-se uma forma relativamente ineficiente de tratamento. A técnica requer uma concentração ideal de espermatozóides, sendo, em alguns casos como em pacientes azoospérmicos, oligoastenozoospérmicos graves, ou que tenham realizado procedimentos cirúrgicos, como a vasectomia, impossível de atingir a porcentagem ideal de espermatozóides móveis, não sendo viável a realização da técnica (LENTON; MOHAMED, 2005).

2.2.3 Injeção Intracitoplasmática do Espermatozóide (ICSI)

A micromanipulação de gametas e embriões não é um conceito novo. Há quase um século tem sido empregada em invertebrados e em outros animais. Em 1914, Kite realizou a primeira tentativa de injeção de espermatozóides em ovócitos de peixe estrela (KITE, 1914 apud FRANCO JUNIOR; BARUFI; MAURI, 2004). Em 1962, microinjetou-se espermatozóides de ouriço do mar em ovócitos homólogos (HIRAMOTO, 1962 apud FRANCO JUNIOR; BARUFI; MAURI, 2004). Desde então

vários processos de micromanipulação têm sido praticados com gametas e embriões, através de dissecções da zona pelúcida (ZP) e inserção subzonal do espermatozóide (SUZI) em compartimentos de ovócito (PATRAT et al., 1999).

A introdução da ICSI, em 1990, como uma nova técnica de reprodução assistida proporcionou aos casais, nos quais a infertilidade estava relacionada com fator severo masculino de infertilidade, a possibilidade de conceber uma criança, anteriormente descartada com a FIV convencional. A taxa de sucesso de bebês nascidos pela técnica de ICSI é similar a FIV (WEN et al., 2004).

A indicação da ICSI não se limita apenas aos casos de fator masculino severo de infertilidade (azoospermia obstrutiva e não obstrutiva), onde pode ser utilizado espermatozóide oriundo de punção do epidídimo ou biópsia testicular, mas atinge também casos de falhas repetidas na fertilização, após a FIV convencional, na presença de altas concentrações de anticorpos antiespermatozoides, em pacientes com alterações ejaculatórias, como, por exemplo, ejaculação retrógrada (CHAN, 2006).

A técnica segue as etapas de hiperestimulação ovariana, punção folicular, remoção mecânico-enzimática das células do *cumulus*, identificação dos ovócitos em metáfase da segunda divisão meiótica, através da presença do corpúsculo polar e injeção dos ovócitos. O ovócito é imobilizado utilizando a pipeta de fixação (*holding*), que o prenderá com o corpúsculo polar na posição de seis horas, e a pipeta de injeção com diâmetro de 6 μ m (*injection*) é utilizada para injetar um único espermatozóide com morfologia aparentemente normal. A taxa de fertilização, com espermatozóide oriundo de azoospermia não obstrutiva, é em torno de 50%. Porém, mais de 80% dos ovócitos fertilizados normalmente evoluem para embriões (DEVROEY; STEIRTEGHEM, 2004).

Entretanto, a ICSI vem sendo associada ao aumento nos riscos de defeitos genéticos em recém-nascidos. Isso porque a fertilização natural e a FIV requerem que o espermatozóide realize a fertilização através de passagens por camadas de células, interação com a zona pelúcida e glicoprotéinas acelulares, além do processo de reação acrossômica, resultando na liberação de enzimas, tornando possível a digestão da zona e fusão dos gametas. A ICSI descarta a seleção natural do processo, podendo transmitir material com defeito genético de pai para filho, sendo 24% da infertilidade masculina associada à anormalidade no cromossoma Y (GRECO et al., 2004; LEWIS; COHEN-KLONOFF, 2005). É verdade que a porção

final de maturação do ovócito ocorre depois de sua ativação e a perturbação causada pela técnica pode alterar a maturação e produzir conseqüências, como as anormalidades cromossômicas (WEN et al., 2004).

2.3 Procedimentos corretivos em Reprodução Assistida

A grande incidência nas falhas da fertilização e baixas taxas de implantação (5 a 30%) parecem estar associadas, em parte, à diminuição da eclosão nos blastocistos transferidos para o útero e às anormalidades gaméticas ou erros cromossômicos durante a embriogênese (PETERSON, 2004).

O processo de congelamento e tempo extensivo em cultura *in vitro* promove alteração na matriz glicoprotéica da zona pelúcida, provocando sua solidificação, dificultando o processo de implantação (GABRIELSON et al., 2004).

Erros cromossômicos, durante a gametogênese e transmitidos para a fertilização até a concepção, são as principais causas de mortalidade embrionária (ZENZES; CASPER, 1992). A relação da anormalidade cromossômica com a morfologia embrionária também tem sido estudada, onde embriões com maior porcentagem de fragmentação apresentam maior incidência de alterações cromossômicas e bloqueio no desenvolvimento *in vitro* (MUNNÉ et al, 1994; WILTON et al., 2003). Munné e colaboradores (1995) mostraram que a poliploidia é a principal anormalidade cromossômica em embriões com parada no desenvolvimento (44,5%). O extenso mosaicismo diplóide também foi observado (39,6%).

Estudos demonstraram que a aneuploidia é a anormalidade mais comum em embriões com desenvolvimento aparentemente normal até a fase de oito células, mas como o genoma embrionário não pode ser ativado antes deste estágio, nenhum efeito causado por aneuploidia pode ser detectado (ARTLEY; BRAUDE; JOHNSON, 1992; MUNNÉ, 2001; PEHLIVAN et al., 2003). Portanto, apesar de o desenvolvimento e a aparência dos embriões no laboratório serem correlacionadas com a qualidade do embrião, somente a combinação das Técnicas de Reprodução Assistida com Diagnóstico Pré-Implantação poderá permitir a identificação dos embriões anormais (DELHANTY; HANDYSIDE, 1995), já que a seleção baseada

somente em parâmetros morfológicos não é eficaz no que diz respeito à anormalidade cromossômica (HILL, 2004; VERLINSKY et al., 2004).

2.3.1 Eclosão Assistida ou Assisted Hatching

Os embriões eclodem da zona pelúcida no estágio de blastocisto, dias depois da fertilização e iniciam o processo de implantação. A eclosão é ativada por progressiva expansão mecânica e contração do blastocisto, que permite a zona pelúcida se dissolver e romper.

A inabilidade dos blastocistos eclodirem é uma das maiores causas de falhas repetidas de implantação em pacientes com idade avançada. Embriões criopreservados também apresentam uma taxa mais baixa de implantação do que embriões frescos. Então, há mais de uma década, aberturas na zona pelúcida usando métodos enzimáticos, mecânicos ou a laser vêm sendo utilizadas em favor da implantação, favorecendo o processo de eclosão (PETERSON, 2004).

Processos microcirúrgicos, invasivos, incluindo um rasgo mecânico na zona pelúcida, utilizando agulhas, foram realizados, entretanto, essas técnicas têm sido abandonadas por estarem associadas ao bloqueio do desenvolvimento do embrião. Outra técnica realizada é um procedimento de digestão química da zona pelúcida, utilizando uma solução ácida, a qual parece ser segura e eficaz e se tornou o método mais utilizado para produzir uma perfuração na zona dos embriões, auxiliando na posterior eclosão (MANSOUR et al., 2000). O terceiro método de dissecação envolve o uso de energia a laser para perfurar a zona pelúcida, incluindo infravermelho e ultravioleta, realizando um furo por aquecimento. Utilizando esse método cria-se uma abertura na zona pelúcida de tamanho uniforme, porém a eficácia clínica, as preocupações com a segurança dos embriões e os custos elevados do equipamento ainda são problemas da técnica (MALTER, 2001).

2.3.2 Diagnóstico Pré-Implantação (PGD)

A idéia de se realizar o PGD é desde 1960, onde Edwards e Gardner esforçaram-se para identificar o sexo de embriões de coelhos no estágio de blastocisto (VERLINSKY; KULIEV, 2000). Em 1989 reportou-se o primeiro emprego do PGD, permitindo evitar o nascimento de uma criança afetada por uma desordem genética (HANDYSIDE et al., 1990).

A aplicação do PGD é de interesse particular das práticas de Reprodução Assistida, já que problemas genéticos contribuem consideravelmente para a infertilidade (1 a 3%). A taxa de aneuploidia no espermatozóide é de 1 a 2%, nos ovócitos é de aproximadamente 20% e a aneuploidia em embriões pré-implantados varia de 20 a 70% (PEHLIVAN et al., 2003).

O PGD é uma técnica na qual o constituinte cromossomal de embriões humanos desenvolvidos *in vitro* pode ser analisado e selecionado (WILDING et al., 2004). As técnicas mais utilizadas para análise do complemento cromossômico dos blastômeros são Fluorescência e Hibridização *in situ* (FISH) e Reação de Polimerase em Cadeia (PCR) (SERMON; STEIRTEGHEN; LIEBAERS, 2004).

2.3.2.1 Técnica de Fluorescência e Hibridização *in situ* (FISH)

A técnica de FISH permite quantificar as cópias de cada cromossomo presente na célula, utilizando uma seqüência de bases complementar à seqüência de bases do DNA que se deseja avaliar. A molécula de DNA tem forma de dupla hélice, portanto, para permitir que a sonda marcada com fluorocromo se una ao DNA embrionário, procede-se à separação de duas fitas (desnaturação). Logo, durante o processo de hibridização, a sonda de DNA irá se unir à seqüência complementar ao DNA do blastômero, marcando os cromossomos em estudo (SERMON; STEIRTEGHEN; LIEBAERS, 2004).

2.3.2.2 Técnica de Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

A técnica de PCR consiste na replicação do DNA *in vitro*, catalisada por uma DNA polimerase, com o objetivo de amplificar seqüências específicas dentro do DNA. A reação requer a presença dos quatro tipos de desoxinucleotídeos e de oligonucleotídeos sintéticos “primers” complementares às extremidades da região do DNA que se deseja amplificar. Estes “primers” funcionam como ponto de partida para a síntese de uma fita de DNA complementar à fita molde. Cada ciclo de PCR envolve: (i) a desnaturação da molécula de DNA alvo a uma temperatura de 94°C; (ii) o anelamento dos “primers” a uma temperatura que pode variar de 35 °C a 60 °C; e (iii) a síntese da nova fita de DNA a 72 °C. Ao final de vários ciclos obtém-se um acúmulo exponencial de cópias da região delimitada pelos “primers” (COUTINHO et al., 2001). A técnica molecular PCR é utilizada para defeitos monogênicos, doenças dominantes e ligadas ao sexo. Estão sendo testados novos métodos para melhorar a eficiência da análise de célula única, tais como a PCR multiplex e a amplificação de todo o genoma (*Whole Genome Amplification*) (HUGHES et al., 2005).

2.3.2.3 Amplificação de todo o genoma ou *Whole Genome Amplification* (WGA)

A quantidade de DNA genômico tem grande impacto nos ensaios moleculares biológicos utilizados para análise das doenças genéticas humanas. Entretanto, o material disponível é sempre limitado, sendo, na maioria das vezes, insuficiente para análises extensivas. Com a finalidade de aumentar a eficiência da técnica de PCR, um método capaz de amplificar todo o genoma surgiu na tentativa de se criar um estoque do material a ser estudado (HUGES et al., 2005).

Através de um método simples e isotérmico, denominado *GenomiPhiTM DNA Amplification Kit* (Amersham Biosciences®), utiliza-se uma única polimerase bioquímica (enzima bacteriófago 29Phi DNA polimerase) para amplificar linearmente microgramas de DNA a partir de amostras com nanogramas ou picogramas de DNA. Resumidamente, a amplificação do DNA genômico é iniciada pela introdução de primers de hexâmeros. A 29Phi DNA polimerase utiliza o final da fita 3' livre como

ponto de início. Entretanto, a replicação não para quando a final 5' da dupla fita de DNA é encontrado. A 29Phi irá deslocar a vertente 5' final e continuar o processo de replicação. Novos hexâmeros irão se ligar à vertente deslocada e iniciar a replicação, produzindo reação com amplificação exponencial (SCHNEIDER et al., 2004). Geralmente, este processo de pre-amplificação é seguido pela amplificação do PCR e em torno de 300ng/μl são obtidos (BALLANTYNE; VAN OORSCHOT; MITCHELL, 2007).

2.3.2.4 Indicação do PGD

O PGD é indicado em casos onde ocorra maior probabilidade de produção de embriões com anormalidades genéticas. Através do diagnóstico e posterior transferência dos embriões que se mostram não-afetados, essa tecnologia tem permitido o nascimento de um maior número de crianças saudáveis. Dentre as indicações do PGD, as principais são:

- **doenças com padrão de herança ligada ao sexo:** possibilita identificar o sexo do embrião nos casos em que haja um risco elevado do mesmo ser portador de uma doença genética ligada aos cromossomos X, Y (TEPPERBERG et al., 2001);

- **situações com maior produção de embriões com desequilíbrio cromossômico numérico ou estrutural:** portadores de alterações cromossômicas numéricas ou estruturais e idade materna avançada (MUNNÉ, 2003; SERMAN; STEIRTEGHEN; LIEBAERS, 2004);

Recentemente, outras situações, nas quais produções elevadas de embriões com alterações cromossômicas numéricas, foram observadas (SIMPSON, 2001), quais sejam:

- **aborto de repetição (duas ou mais perdas consecutivas):** alterações cromossômicas numéricas parecem ser responsáveis por uma elevada porcentagem dos abortos no primeiro trimestre de gravidez (41%), com maior freqüência de trissomias nos cromossomos 16, 21, 22 (78,5%) (VIDAL et al., 1998);

- **falhas repetidas de implantação:** define-se como ausência de gravidez depois de três ou mais ciclos de Reprodução Assistida, com transferência de embriões de boa qualidade (DELHANTY; HARPER, 2000). Estudos recentes têm

demonstrado que casais inférteis produzem alta freqüência de embriões com alterações cromossômicas numéricas (40 a 50% em dois ciclos frustrados e 67% em mais de cinco ciclos sem gravidez, com predomínio de monossomias sobre trissomias) (PEHLIVAN et al., 2003);

- **congelamento de ovócitos:** a necessidade de se criar bancos de ovócitos para promover auxílio a pacientes que desejam preservar a fertilidade, após o tratamento quimioterápico ou para mulheres que desejam adiar a maternidade (COBO et al., 2001), está promovendo a utilização do PGD em um novo campo da Reprodução Assistida. Entretanto, as taxas de sobrevivência desses gametas, após o descongelamento, são muito baixas, sugerindo danos causados no momento da criopreservação, incluindo no fuso mitótico, quebra na zona pelúcida e microtúbulos da segunda meiose. Esses problemas parecem aumentar o risco de uma gravidez com aneuploidia ovocitária (MILLER et al., 2004). Então, o PGD vem sendo aplicado para analisar embriões humanos depois da vitrificação de ovócitos e subseqüentes descongelamento e fertilização.

É notável que a introdução de métodos que selecionam embriões para a transferência pode, consideravelmente, aumentar a eficiência da FIV (VERLINSK; KULIEV, 2000), reduzir a incidência de aborto espontâneo e nascimento de crianças com doenças ligadas ao sexo ou outra desordem genética, eliminando 80% das anormalidades cromossômicas (MUNNÉ, 2001). A técnica também favorece a redução de nascimentos múltiplos, além da criopreservação de diversos embriões, já que embriões serão identificados como anormais, não sendo necessário o congelamento (DELHANTY; HARPER, 2000; MUNNÉ, 2003).

Entretanto, o PGD é um método invasivo podendo causar danos ao embrião. A técnica de biópsia aplicada para realização da técnica e subseqüente cultivo dos embriões biopsiados são variáveis que afetam a realização do diagnóstico genético, uma vez que não existe protocolo-padrão para realizá-lo (COHEN; WELLS; MUNNÉ, 2007).

Outro problema para a realização do PGD é a pequena quantidade de DNA genômico disponível para se realizar o estudo genético. Portanto, o número de células retirado (um ou dois blastômeros) torna-se insuficiente para análises extensivas. Além disso, existe a possibilidade de se retirar um blastômero anucleado para o estudo genético, o qual não condiz com as características dos outros

blastômeros e este promover falha na amplificação do alelo específico no momento do estudo genético, indicando anomalia genética (VERLINSKY; DELHANTY, 2000).

Portanto, a técnica de diagnóstico pré-impantação ainda necessita de estudo no que se refere à biópsia de blastômeros, à avaliação do desenvolvimento de embriões biopsiados, além da análise de pequena quantidade de DNA genômico oriundo da biópsia (JIMENEZ-MACEDO et al., 2007). A técnica também não está bem difundida entre os Centros de Reprodução Humana (HILL, 2004).

3 MODELO EXPERIMENTAL

A utilização de embriões bovinos como modelo experimental tem grande impacto nas pesquisas científicas. Permite em um curto espaço de tempo, baixo custo e permissão ética, por se tratar de ovários oriundos de matadouro, realizar-se, com grande repetibilidade, o estudo de técnicas, utilizando os mesmos equipamentos dos protocolos humanos.

É importante ressaltar que a realização da técnica de biópsia em embriões bovinos apresenta maior grau de dificuldade quando comparada com embriões humanos. Isso porque há uma maior fragilidade da membrana celular dos embriões bovinos, além de serem mais escuros e compactos. Assim, parece se tratar de um modelo experimental ideal, pois se acredita que técnicos estejam prontos para manipular embriões humanos pela dificuldade extra, apresentada para manipulação do modelo experimental (ALMODIM et al., 2005).

4 HIPÓTESES

- A técnica de biópsia em embriões bovinos com 8-16 células não prejudica o desenvolvimento e a qualidade dos embriões;
- Através do kit de amplificação do genoma o DNA genômico dos blastômeros será amplificado;
- O uso do PCR em DNA genômico amplificado dos blastômeros possibilita a identificação do sexo para o diagnóstico genético pré-implantação, com aumento de eficiência.

5 OBJETIVOS

- Avaliar o desenvolvimento e a qualidade embrionária de embriões bovinos posterior à realização da técnica de biópsia.
- Avaliar a eficiência do kit de amplificação de todo o genoma nos blastômeros retirados.
- Identificar o sexo, através de PCR, dos blastômeros removidos.

6 MATERIAL E MÉTODOS

6.1 Técnicas de Reprodução Assistida

6.1.1 Coleta de ovários e seleção dos ovócitos

O experimento foi realizado no Laboratório de Reprodução Animal da EMBRAPA Gado de Leite de Juiz de Fora – MG, entre os meses de fevereiro de 2007 a abril de 2008. Ovários de vacas mestiças obtidos no Matadouro Municipal de Juiz de Fora (n=264) foram transportados em garrafa térmica, a 37°C, em solução fisiológica de NaCl a 0,9% acrescida de 0,005% de estreptomicina. No laboratório, eles foram lavados na mesma solução e mantidos em banho-maria a 37°C até o momento da aspiração. Os complexos *cumulus*-ovócitos (CCO's) foram recuperados de folículos com diâmetro entre 2-8 mm, com auxílio de agulha com calibre de 21 G acoplada à seringa de 10 ml. O período entre o abate e o início da aspiração não foi superior a 4 horas. Os CCO's foram mantidos em meio *Talp-Hepes* (BAVISTER; LEIBFRIED; LIEBERMAN, 1983), sendo selecionados aqueles com três ou mais camadas de células e citoplasma homogêneo (HAWK; WALL, 1994).

6.1.2 Maturação *in vitro* dos ovócitos

Os CCO's (n=706) foram maturados *in vitro* em grupos de 40 estruturas, em placas de quatro poços, com 400 µl de meio TCM-199 (Gibco®), acrescido de 10% de soro de vaca em cio e 20 µg/ml de FSH, por 24 horas, em incubadora a 38,8 °C, com 95% de umidade e 5% de CO₂ (RAMOS et al., 2006).

6.1.3 Fertilização *in vitro* dos ovócitos

Após a maturação, os ovócitos foram fertilizados *in vitro* com sêmen de fertilidade conhecida. Para a separação dos espermatozóides foi utilizado o método de *swim up* (PARRISH et al., 1986). A fertilização *in vitro* foi realizada em gotas de 100 µl de meio *Fert-Talp*, sob óleo mineral, utilizando-se 15 ovócitos por gota e dose fecundante de $2,0 \times 10^6$ espermatozóides/ml, por 22 horas, nas mesmas condições atmosféricas da maturação (RAMOS et al., 2006).

6.1.4 Cultivo *in vitro* dos embriões

Após a fertilização, os prováveis zigotos (n=706) foram semi-desnudados em meio *Talp-Hepes* e, em seguida, transferidos para meio de cultivo CR2aa, acrescido de 10% de soro fetal bovino (MOORE; BONDIOLI, 1996), em gotas de 50 µl, sob óleo mineral, onde foram co-cultivados com as células da granulosa. O cultivo foi realizado nas mesmas condições da fecundação. No quarto dia após a fertilização, avaliou-se a taxa de clivagem e renovou-se 50% do meio.

6.1.5 Divisão dos embriões nos grupos experimentais

Previamente à realização da técnica de biópsia, todas as estruturas foram retiradas das gotas de cultivo e lavadas em meio *Talp-Hepes* acrescido de 0,003% de álcool polivinílico (PVA). Embriões de 8-16 células foram divididos aleatoriamente em dois grupos: controle (n=103) e biópsia (n=92). Retornou-se os embriões do grupo controle às gotas de co-cultivo, enquanto os embriões do outro grupo foram submetidos à biópsia.

6.1.6 Biópsia dos embriões

Os embriões do grupo biópsia foram, então, transferidos para placa de petri em microgotas de 5 μ l de meio *Talp-Hepes*, sob óleo mineral e levados ao micromanipulador. Após imobilização dos embriões pela pipeta de fixação, procedeu-se à biópsia, pela inserção de micropipeta (30 μ m - Transfix[®]) na posição de três horas (Figura 1). Foram aspirados blastômeros correspondentes à quarta parte da massa embrionária (COHEN; WELLS; MUNNE, 2007). Os blastômeros foram expelidos na microgota na posição de seis horas e levados para meio de tamponamento para posterior realização da sexagem embrionária.

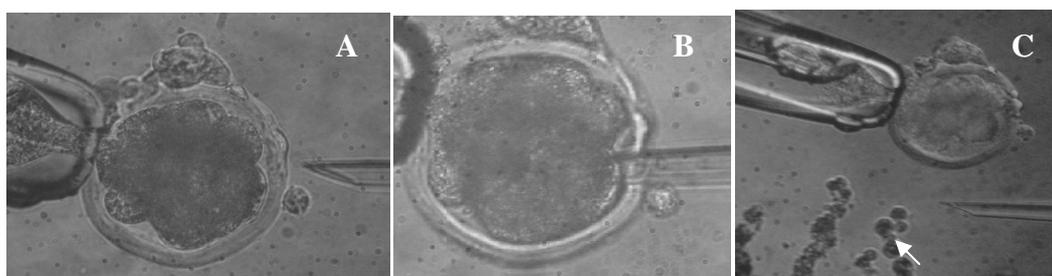


Figura 1 – Biópsia de embriões bovinos no terceiro dia após a fecundação.

Legenda – A: fixação do embrião; B: introdução da micropipeta de biópsia; C: embrião pós-biópsia e blastômeros retirados com a realização da técnica (seta).

Fonte: Acervo pessoal

Após a biópsia os embriões retornaram as gotas de co-cultivo (CR2aa) em incubadora com 5% CO₂, 95% de umidade à 38,5°C em ar, onde foram cultivados até o décimo dia de cultivo.

6.1.7 Avaliação do desenvolvimento embrionário

A avaliação da taxa de clivagem foi realizada no quarto dia após a fertilização. As taxas de produção de blastocisto do grupo controle e biópsia e proporção de blastocisto inicial (Bi), blastocisto (BI), blastocisto expandido (Bx) e blastocisto eclodido (Be) foram avaliadas no oitavo (D8) dia do cultivo, e a taxa de eclosão, no

décimo (D10). A avaliação dos embriões foi realizada segundo os parâmetros descritos no Manual da Sociedade Internacional de Transferência de Embriões (STRINGFELLOW; CROWE, 1998).

6.1.8 Contagem de células

No décimo dia de cultivo, os blastocistos dos grupos controle e biópsia foram submetidos à coloração de Giemsa (LIM et al., 1994) para contagem do número total de células (Figura 2). Para realização da coloração, os embriões foram retirados da gota de cultivo, lavados duas vezes em meio tamponado, acrescidos de 10% de soro fetal bovino e transferidos para solução de citrato de sódio a 0,9%, onde permaneceram por 10 minutos. A seguir, os embriões foram transferidos para solução de fixação de metanol, ácido acético e água destilada (3:2:1), onde permaneceram por um minuto, e, a seguir, foram colocados em lâmina. Após secagem, a lâmina foi corada com solução de Giemsa por 15 minutos e lavada, em seguida, com água destilada. As células embrionárias foram contadas em microscópio óptico com aumento de 20X, com auxílio do software AxioVision 3,1 (Carl Zeiss, Feldbach, Switzerland).

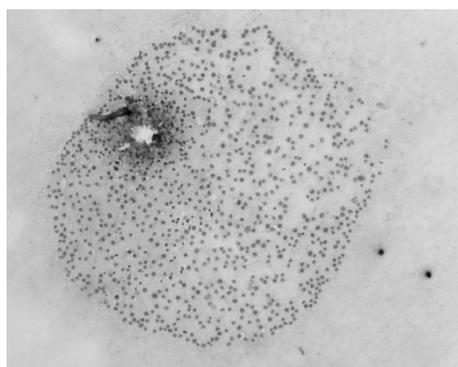


Figura 2 – Micrografia de blastocisto expandido, do grupo biópsia, corado por coloração de Giemsa para realização de contagem de células.
Fonte: Acervo pessoal.

6.2 Diagnóstico Pré-Implantação – Identificação do sexo

6.2.1 Amostras de DNA

Amostras de DNA bovino de macho e fêmea, em seis diferentes concentrações (30 ng/μl, 3,0 ng/μl, 0,3 ng/μl, 0,03 ng/μl, 0,003 ng/μl, 0,0003ng/μl) e embriões em diferentes estádios de desenvolvimento (2 células - n=6, 4-7 células – n=5, >8 células – n=5, blastocisto – n=26) foram utilizados para padronizar protocolos e definir os limites amplificação do PCR. Os embriões foram lavados em D-PBS e transferidos para tubos de PCR de 0,2 ml, contendo 10 μl da solução de extração de DNA (tampão de PCR 5X e 3 mg/ml de proteinase K), onde ficaram congelados a -20°C até a sua utilização. Para a extração do DNA genômico os embriões foram incubados por 2 horas a 50°C, seguido por 10 minutos a 95°C para inativar a proteinase K antes da realização do PCR (POLISSENI et al., 2004).

Os blastômeros removidos foram lavados em água destilada e transferidos para tubos de PCR de 0,2 ml, contendo 1 μl de água destilada. As amostras foram mantidas congeladas a -20°C até a utilização. Para digerir o citoplasma celular e ocorrer a liberação do DNA genômico, 2 μl da solução de extração de DNA (tampão de PCR 5X e 3 mg/ml de proteinase K) foram adicionados às amostras. A extração do DNA dos blastômeros foi realizada utilizando-se o mesmo processo aplicado aos embriões (ALMODIN et al., 2005).

6.2.2 Amplificação de todo o genoma

Os blastômeros foram submetidos ao kit de amplificação GenomiPhi DNA (GE Healthcare®), seguindo as orientações do fabricante. Resumidamente, 9 μl de tampão de amostra do GenomiPhi foi adicionado ao tubo de PCR, com a finalidade de promover a desnaturação da amostra a 95°C por 3 minutos. Depois de resfriar a amostra no gelo, adicionou-se 10 μl do tampão de reação, o qual continha dNTPs, hexâmeros e a polimerase Phi29. Os tubos, então, foram incubados a 30°C, por 18

horas. Depois da amplificação, as amostras foram aquecidas a 65°C, por 10 minutos, para promover a inativação da polimerase Phi29 DNA. O produto da amplificação foi mantido congelado a -20°C até a utilização.

Para avaliar a eficiência da amplificação, foi realizado eletroforese no gel de agarose a 1%, de 1 µl do produto por 2 horas a 120 voltes. O gel foi corado com 3.0 µg/ml brometo de etídio e as bandas foram observadas, utilizando-se transluminador UV (GILARDI et al., 2004).

6.2.3 Reação de Polimerase em Cadeia (PCR)

A amplificação foi realizada no termociclador GeneAmp® PCR Sistem 9700 (Applied Biosystems®). O primeiro passo foi a desnaturação do DNA a 94°C, por 10 minutos. O segundo passo consistiu em 40 ciclos de amplificação nas seguintes temperaturas: 94°C por 60 segundos para desnaturação do DNA, 58°C por 30 segundos para anelamento dos “primers” e 72°C por 60 segundos para a polimerização do DNA. Por fim os tubos foram mantidos a 72°C por 10 minutos para promover a extensão das fitas de DNA (POLISSENI et al., 2004).

A mistura das reações, contendo 2 mM MgCl₂, tampão de PCR 5X (Promega®), 0,2 mM de cada dNTPs (GE Healthcare®), 0,05U/µl de Taq polimerase (Promega®), 0.25µM de cada primer foi adicionado ao DNA genômico a ser amplificado:

- Y_F-5'-AGACCTCGAGAGACCCTCTTCAACACGT-3';
- Y_R-5'-GGTCGCGAGATTGCTCGCTAGGTCATGCA-3';
- Autossômico_F-5'-CCTCCCCTTGTTCAAACGCCCGGAATCATT-3';
- Autossômico_R- 5'-TGCTTGACTGCAGGGACCGAGAGGTTTGGG-3'.

Depois da amplificação os produtos foram submetidos à eletroforese, em gel de polacrilamida a 8%, por 1 hora a 500 voltes. Os géis foram corados com nitrato de prata a 12%. Para identificação do tamanho das bandas foi utilizado um padrão de peso molecular de 25 pares de base (Promega®). A presença de apenas uma banda do produto específico para bovino visível no gel indicou que o DNA da amostra era de fêmea (amplificação da seqüência autossômica - 269 pb) e a

presença de duas bandas indicou o macho (amplificação de uma seqüência específica do cromossoma Y - 213 pb e a seqüência autossômica - 269 bp) (POLISSENI et al., 2004).

6.3 Análise estatística

A taxa de produção de blastocisto, a taxa de eclosão dos grupos controle e biópsia, a eficiência da amplificação de todo o genoma e a proporção do sexo após PCR foram analisadas pelo teste do Qui-quadrado. Já a proporção de blastocisto no oitavo dia de cultivo, nos grupos controle e biópsia, foi analisada pelo teste não paramétrico de Wilcoxon. Os dados da contagem de células dos embriões foram submetidos à análise de variância (ANOVA), utilizando-se o SAS (Instituto SAS, Inc., Cary, NC, USA). Diferenças foram consideradas significantes se $P < 0,05$.

6.4 Termo de aprovação e compromisso da agência financiadora

O projeto foi submetido à análise do Comitê de Ética e Experimentação Animal (CEEA) da UFJF e foi aprovado, recebendo o número do protocolo 002/2007. O projeto também foi aprovado pelo órgão financiador CNPq (CNPq/480.205/2004-3).

7 RESULTADOS

Trabalho submetido à revista Fertility and Sterility.

Pos-biopsy bovine embryo viability and whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis

Juliana Polisseni, M. Sc.,^{a,b} Wanderlei Ferreira de Sá, Ph.D.,^a Martha de Oliveira Guerra, Ph.D.,^b Marco Antônio Machado, Ph.D.,^a Raquel Varella Serapião, Ph.D.,^a Bruno Campos de Carvalho, M. Sc.,^c Luiz Sérgio de Almeida Camargo, Ph.D.,^a Vera Maria Peters, Ph. D.^b

^a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária – Embrapa Gado de Leite, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

^b Centro de Biologia da Reprodução, Universidade Federal de Juiz de Fora, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

^c Empresa de Pesquisa Agropecuária de Minas Gerais – Epamig, Juiz de Fora, Minas Gerais, Brazil

Financial Support:

FAPEMIG- Fundação de Amparo à pesquisa do Estado de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil – (Fapemig – Rede 2827/05)

CNPq – Centro Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, Brasília, Distrito Federal, Brazil - (CNPq/480.205/2004-3).

Objective: To evaluate the effect of biopsy at 8- to 16-cell bovine embryos on subsequent development and whole genome amplification (WGA) on removed blastomeres.

Design: Randomized study.

Setting: Molecular Genetics and Animal Reproduction Laboratories.

Patient(s): Cow ovaries obtained from slaughterhouses.

Interventions: The ovaries were punctured and the oocytes were matured and fertilized in vitro. On the fourth day after fertilization, 8- to 16-cell bovine embryos were biopsied and one-fourth of an embryo was removed. The blastomeres were submitted to WGA followed by PCR. Embryos were returned to culture for development evaluation.

Main Outcome Measure (s): Subsequent blastocyst developmental rate, embryo cell number, WGA efficiency and sex determination.

Results: A total of 92 embryos were submitted to biopsy technique. The blastocyst production was 53.3%, with 44.9% of hatching rate. This rate was similar to control group (66.0% and 42.6%) found on 103 embryos. Overall, no impact was detected on embryo quality in blastocyst cell number between the two groups. Removed blastomeres were submitted to WGA, resulting in 98.2% of efficiency. However, only 59% of samples were sexed by PCR.

Conclusions: Biopsy of 8- to 16-cell bovine embryos did not affect subsequent development. WGA was successful in removed blastomeres.

Key Words: PGD, sexing, embryo quality, hatching rate.

8 CONCLUSÃO

- A realização da técnica de biópsia em embriões bovinos com 8-16 células não afetou o desenvolvimento e qualidade subsequente dos embriões.

- O kit de amplificação de todo o genoma foi capaz de amplificar o DNA genômico dos blastômeros retirados, produzindo em torno de 400 ng de DNA a partir de 14 pgs de DNA.

- O diagnóstico Pré-Implantação, que teve como finalidade identificar o sexo dos blastômeros, foi realizado com eficiência através da técnica de PCR.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALMODIN, C. G.; MORON, A. F.; KULAY-JUNIOR, R. L. et al. A bovine protocol for training professionals in preimplantation genetic diagnosis using polymerase chain reaction. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 84, p. 895-899, 2005.

ÁLVAREZ, C.; CASTILLA, J. A.; MARTÍNEZ, L. et al. Biological variation of seminal parameters in health a subjects. **Human Reproduction**, Oxford, v. 18, n. 10, p. 2082-2088, 2003.

ARTLEY, J. K.; BRAUDE, P. R.; JOHNSON, M. H. Gene activity and cleavage arrest in human pre-embryos. **Human Reproduction**, Oxford, v. 7, p. 1014-1021, 1992.

BALLANTYNE, K. N.; VAN OORSCHOT R. A. H.; MITCHELL, R. J. Comparison of two whole genome amplification methods for STR genotyping of LCN and degraded DNA samples. **Forensic Science International**, Finland, v. 166, p. 35-41, 2007.

BARBIERI, R.; SLUSS, P. M.; POWERS, R. D. et al. Association of body mass index, age, and cigarette smoking with serum testosterone levels in cycling women undergoing in vitro fertilization. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 83, n. 2, p. 302-308, 2005.

BAVISTER, B. D.; LEIBFRIED, M. L.; LIEBERMAN, G. Development of preimplantation embryos of the golden hamster in a defined culture medium. **Biology of Reproduction**, Lawrence, v. 28, p. 235-247, 1983.

BRINTON, L. A.; LOMB, E. J.; MAGHISSI, K. S. et al. Ovarian cancer risk associated with varying causes of infertility. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 28, n. 2, p. 12-16, 2004.

CAMARGOS, A. F.; MELO, V. H. **Ginecologia Ambulatorial**. Belo Horizonte: Coopmed, 2001.

CHAN, C. C. W. Infertility, assisted reproduction and rights. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynecology**, London, v. 20, n. 3, p. 1-12, 2006.

COBO, A.; RUBIO, C.; GERLI, S. et al. Use of fluorescence in situ hybridization to assess the chromosomal status of embryos obtained from cryopreserved oocytes. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 75, n. 2, p. 354-360, 2001.

COHEN, J.; WELLS, D.; MUNNE, S. Removal of 2 cells from cleavage stage embryos is likely to reduce the efficacy of chromosomal tests that are used to enhance implantation rates. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 87, p. 496-503, 2007.

COUTINHO, L. L.; REGITANO, L. C. A. Introdução à análise de marcadores moleculares. In: **Biologia Molecular Aplicada à Produção Animal**. 1 ed. Brasília-DF: Embrapa, 2001. p. 11-24.

CWIKEL, J.; GIDRON, Y.; SHEINER, E. Psychological interactions with fertility among women. **Europe Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdam, v. 117, p. 126-131, 2004.

DELHANTY, J. D. A.; HANDYSIDE, A. H. The origin of genetic defects in the human and their detection in the preimplantation embryo. **Human Reproduction**, Oxford, v. 1, n. 3, p. 201-215, 1995.

DELHANTY, J. D. A, HARPER, J. C.; Pre-implantation genetic diagnosis. **Baillière' s Clinical Obstetrics and Gynecology**, London, v.14, n. 4, p. 691-708, 2000.

DEVROEY, P.; STEIRTEGHEM, A. V. A review of ten years experience of ICSI. **Human Reproduction**, Oxford, v. 10, n. 1, p. 19-28, 2004.

EDWARDS, R. G.; BRODY, S. A. **Assisted Human Reproduction**. Philadelphia: W. B. Saunders, 1995. p.677.

ESKENAZI, B.; WYROBEK, A. J.; KIDD, S. A. et al. The association of age and semen quality in healthy men. **Human Reproduction**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 447-454, 2003.

FRANCO JUNIOR, J. G.; BARUFI, R. L. R.; MAURI, A. L. **Reprodução Assistida**. São Paulo: Zass, 2004.

GABRIELSON, A.; AGERHOLM, L.; TOFT, B. et al. Assisted hatching improves implantation rates on cryopreserved – thawed embryos. A randomized prospective study. **Human Reproduction**, Oxford, v. 19, n. 10, p. 2258-2262, 2004.

GARCÍA-ULLOA, A. C.; ARRIETA, O. Tubal occlusion causing infertility due to an excessive inflammatory response in patients with predisposition for keloid formation **Medical Hypotheses**, Edinburgh, v. 65, n. 5, p. 908-914, 2005.

GILARDI, S. G. T.; SÁ, W. F.; CAMARGO, L. S. A. et al. Efeito de diferentes meios de cultivo no desenvolvimento e proporção do sexo de embriões bovinos produzidos *in vitro*. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, Viçosa, v. 56, n. 5, p. 623-627, 2004.

GRECO, E.; SCARSELLI, F.; IACOBELLI, M. et al. Efficient treatment of infertility due to sperm DNA damage by ICISI with testicular spermatozoa. **Human Reproduction**, Oxford, v. 20, n. 11, p. 226-230, 2005.

HANDYSIDE, A. H.; KONTOGIANNI, E. H.; HARDY, K. et al. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by y-specific DNA amplification. **Nature**, London, v. 344, p. 768-770, 1990.

HAWK, H. W.; WALL, R. J. Improved yields of bovine blastocysts from *in vitro*-produced oocytes. Selection of oocytes and zygotes. **Theriogenology**, Stoneham MA, v. 41, p. 1571-1583, 1994.

HILL, D. L. Ten years of preimplantation genetic diagnosis – aneuploidy screening: review of a multicenter report. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 82, n. 2, p.300-301, 2004.

HIRAMOTO, 1962 apud FRANCO JUNIOR, J. G.; BARUFI, R. L. R.; MAURI, A. L. **Reprodução Assistida**. São Paulo: Zass, 2004.

HIRSH, A. Male subinfertility. **ABC of subinfertility**, London, v. 327, p. 669-327, 2003.

HUGES, S.; ARNESON, N.; DONE, S. et al. The use of whole genome amplification in the study of human disease. **Progress in Biophysics & Molecular Biology**, Oxford, v. 88, p. 173-189, 2005.

ISIDORI, A.; LATINI, M.; ROMANELLI, F. Treatment of male infertility. **Contraception**, Los Altos, v. 72, n. 4, p. 314-318, 2005.

JIMENEZ-MACEDO A. R.; PARAMIO M. T.; ANGUITA B. et al. Effect of ICSI and embryo biopsy on embryo development and apoptosis according to oocyte diameter in prepubertal goats. **Theriogenology**, Stoneham MA, v. 67, p. 1399-408, 2007.

KAARIAINEN, H.; EVERS-KIEBOOMS, G.; COVIELLO, D. Medically assisted reproduction and ethical challenges. **Toxicology and Applied Pharmacology**, New York, v. 207, p. 684-688, 2005.

KITE, 1914 apud FRANCO JUNIOR, J. G.; BARUFI, R. L. R.; MAURI, A. L. **Reprodução Assistida**. São Paulo: Zass, 2004.

LACKNER, J.; SCHALTZL, G.; WALDHOR, T. et al. Constant decline in sperm concentration in infertile males in an urban population: experience over 18 years. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 84, n. 6, p. 1657-1661, 2005.

LENTON, E.; MOHAMED, K. Optimizing assisted reproduction: impact of low-dose gonadotropin-releasing hormone agonist on in vitro fertilization outcome. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 84, n. 6, p. 1783-1785, 2005.

LEWIS, S.; COHEN-KLONOFF, H. What factors affect intracytoplasmic sperm injection outcomes? **Obstetrical and Gynaecological Survey**, Baltimore, v. 60, n. 2, p. 111-123, 2005.

LIM, J. M.; OKITSU, O.; OKUDA, K. et al. Effects of fetal calf serum in culture medium on development of bovine oocytes matured and fertilized *in vitro*. **Theriogenology**, Stoneham MA, v.41, p.1091-1098, 1994.

MALTER, H. Zone dissection by infrared laser: developmental consequences in the mouse, technical considerations, and controlled clinical trial. **Reproductive BioMedicine Online Webpaper**, Cambridge, v. 3, n. 2, p. 117-123, 2001.

MANSOUR, R. T.; RHODES, C. A.; ABOULGHAR, M. A. et al. Transfer of zone-free embryos improves outcome in poor prognosis patients: a prospective randomized controlled study. **Human Reproduction**, Oxford, v. 15, n. 5, p. 1061-1064, 2000.

MILLER, K. A.; ELKIND-HIRSCH, K.; LEVY, B. et al. Pregnancy after cryopreservation of donor oocytes and preimplantation genetic diagnosis of embryos in a patient with ovarian failure. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 82, n. 1, p. 211-214, 2004.

MOORE, K.; BONDIOLI, K. R. Glycine and alanine supplementation of culture medium enhances development in vitro matured and fertilized cattle embryos. **Biology of Reproduction**, Lawrence, v. 45, p. 41-49, 1996.

MUNNÉ, S. Preimplantation genetic diagnosis of structural abnormalities. **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, v. 183, p. 55-58, 2001.

MUNNÉ, S. Preimplantation genetic diagnosis and human implantation – a review. **Placenta**, London, v. 24, p. 70-76, 2003.

MUNNÉ, S.; ALIKANI, M.; TOMKIN, G. et al. Embryo morphology, developmental rates, and maternal age are correlated with chromosome abnormalities. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 64, n. 2, p. 382-391, 1995.

MUNNÉ, S.; GRIFO, J.; COHEN, J. et al. Chromosome abnormalities in human arrested preimplantation embryos: a multiple – probe FISH study. **American Journal Human Genetics**, Chicago, v. 55, p.150-159, 1994.

NALLELLA, K. P.; SHARMA, R. K.; AZIZ, N. et al. A. Significance of sperm characteristics in evaluation of male infertility. **Fertility Sterility**, Birmingham, v. 85, n. 3, p. 629-634, 2006.

NUOJUO-HUTTUNEN, S.; TOMAS, C.; BLOIGU, R. et al. Intrauterine insemination treatment in subinfertility: an analysis of factors affecting outcome. **Human Reproduction**, Oxford, v. 14, n. 3, p. 698-703, 1999.

OLIVA, A.; SPIRA, A.; MULTIGNER, L. Contribution of environmental factors to the risk of male infertility. **Human Reproduction**, Oxford, v. 16, n. 8, p. 1768-1776, 2001.

PARRISH, J. J., SUSKO-PARRISH, J. L.; LEIBFRIED-RUTLEDGE, M. L. et al. Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. **Theriogenology**, Stoneham MA, v. 25, p. 591-600, 1986.

PASSOS, E. P. History of assisted reproduction: lessons learned and future challenges. **Reviews in Gynaecological Practice**, Bristol, v. 4, p. 199-202, 2004.

PATRAT, C.; WOLF, P. J.; EPELBOIN, S.; et al. Pregnancies, growth and development of children conceived by subzonal injection of spermatozoa. **Human Reproduction**, Oxford, v. 14, n. 9, p. 2404-2410, 1999.

PEHLIVAN, T.; RUBIO, C.; RODRIGO, L. et al. Preimplantation genetic diagnosis by fluorescence in situ hybridization: clinical possibilities and pitfalls. **Society Gynecologic Investigation**, New York, v. 10, n. 6, p. 315-322, 2003.

PETERSON, C. Implantation failures: success of assisted hatching with quarter - laser zone thinning. **Reproductive BioMedicine Online Webpaper**, Cambridge, v.10, n. 2, p. 224-229, 2004.

POLISSENI, J.; CAMARGO, L. S. A.; SÁ, W. F. et al. Otimização do Protocolo de Polimerase Chain Reaction (PCR) para sexagem de embriões bovinos em diferentes estágios de Pré-implantação. **Acta Scientiae Veterinariae**, Rio Grande do Sul, v. 32, n. 1, p. 183, 2004.

PORTER, T. F.; SCOTT, G. R. Evidence-based care of recurrent miscarriage. **Best practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, London, v. 19, n. 1, p. 85-100, 2005.

RAMOS, A. A.; POLISSENI, J.; SÁ, W. F. et al. Efeito do transporte no desenvolvimento de embriões bovinos cultivados *in vitro* a fresco ou reaquecidos após vitrificação. **Revista Brasileira de Zootecnia**, Viçosa, v. 35, n. 6, p. 2285-2289, 2006.

ROCHEBROCHARD, E. L.; MOUZAN, J.; THÉPOT, F. et al. Fathers over 40 and increased failure to conceive: the lessons of in vitro fertilization in France. **Fertility Sterility**, Birmingham, v. 85 n. 5, p. 1420-1424, 2006.

SAID, T. M.; RANGA, G.; AGARWAL, A. Relationship between semen quality and tobacco chewing in men undergoing infertility evaluation. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 84, n. 3, p. 694-653, 2005.

SCHNEIDER, P. M.; BALOGH, K.; NAVERAN, N. et al. Whole genome amplification- the solution for a common problem in forensic casework? **International Congress Series**, Finland, v.1261, p.24-26, 2004.

SERMON, K.; STEIRTEGHEN, A. V.; LIEBAERS, I. Preimplantation Genetic Diagnosis. **The Lancet**, London, v. 363, p. 1633-1641, 2004.

SIMPSON, J. L. Changing indications for preimplantation genetic diagnosis (PGD). **Molecular and Cellular Endocrinology**, Limerick, v. 183, p. 69-75, 2001.

SKULL, J. The subfertile couple. **Current Obstetrics & Gynaecology**, Edinburgh, v. 14, n. 2, p. 132-141, 2004.

SPEROFF, L.; GLASS, R. H.; KASE, N. G. Investigation of the infertile couple. Male infertility. In **Clinical Gynecologic endocrinology and infertility**, 4. ed. Williams & Wilkins, 1989, p. 513-547; 565-583.

SPUY, Z. M.; VAN DER, D. S. J. The pathogenesis of infertility and early pregnancy loss in polycystic ovary syndrome. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics and Gynaecology**, London, v. 18, n. 5, p. 775-771, 2004.

STRINGFELLOW, D. A.; CROWE, M. A. **Manual da sociedade internacional de transferência de embriões – IETS**. 3. ed., Illinois 1998. p.180.

TEPPERBERG, J.; PETTENATI, N. J.; RAO, P. N. et al. Prenatal diagnosis using interphase fluorescence in situ hybridization (FISH): 2-year multi-center retrospective study and review of literature. **Prenatal Diagnosis**, Chichester, v. 21, p. 293-301, 2001.

VERLINSKY, Y.; KULIEV, A. **An Atlas of preimplantation genetic diagnosis**. 3. ed.: Parthenon Publishing, 2000. p. 1-174.

VERLINSKY, Y.; COHEN, J.; MUNNÉ, S. et al. A. Over a decade of experience with preimplantation genetic diagnosis. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 82, n. 2, p. 302-303, 2004.

VIDAL, F.; GIMÉNEZ, C.; RUBIO, C. et al. FISH preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, New York, v. 15, n. 5, p. 310-313, 1998.

WEN, S. W.; WALKER, M. C.; LÉVEILLÉ, M. C. et al. **Canadian Medical Association or its licensors**, Ottawa, v. 12, p. 845-846, 2004.

WILDING, M.; FORMAN, R.; HOGEWIND, G. et al. Preimplantation genetic diagnosis for the treatment of failed in vitro fertilization – embryo transfer and habitual abortion. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 81, n. 5, p. 1302-1307, 2004.

WILTON, L.; VOULLAIRE, L.; SARGEANT, P. et al. Preimplantation eueuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. **Fertility and Sterility**, Birmingham, v. 80, n. 4, p. 860-868, 2003.

ZENZES, M. T.; CASPER, R. F. Cytogenetics of human oocytes, zygotes, and embryos after in vitro fertilization. **Human Genetic**, Berlin, v. 88, p. 367-375, 1992.

APÊNDICE:

Aceite de publicação do artigo

Data: 13 Aug 2008 20:56:55 +0100 

[Cabeçalho Completo](#)

De: "Fertil Steril" <Fertstert@asrm.org>   

Para: jupol@powermail.com.br

Assunto: Your submission, F and S5720 

RE: Manuscript F and S5720

Title: Pos-biopsy bovine embryo viability and whole genome amplification in preimplantation genetic diagnosis

Dear Msc Polisseni,

Thank you for submitting a revised version of your manuscript. Your manuscript has now been accepted for publication; however, before we can further process your manuscript, a few editorial changes are required:

1. See reviewer's comments below.
2. On your title page, please indicate a corresponding author for reprints, and give full contact information, including email, fax, and mailing address.
3. Please have a native speaker of English review and edit your manuscript for syntax and grammar.
4. References: List all authors in an article, but if the number exceeds six, give six followed by et al.
5. Please provide conflict of interest disclosure forms for all authors.
6. Only one figure or table is allowed for each 600 words of text (about three pages of manuscript). Cover letter, abstract, and references do not count toward the word total. Please delete excess figures and tables.

For production purposes, we would like you to submit your revised manuscript within 60 days. If additional time is necessary, please contact the editorial office in Birmingham.

Thank you for submitting your revised manuscript to Fertility and Sterility.

Sincerely,

Alan H. DeCherney, M.D.
Editor-in-Chief

Reviewers Comments:

Reviewer #1: In my opinion this is an article of good quality and it is of interest to readers of the journal. The manuscript proved to be relevant and original once, as the authors emphasized, embryo biopsy is an invasive method that can cause embryo damage and the impact of biopsy on embryo quality is still poorly studied and there is no single universally practiced protocol for implementing pre-implantation genetic diagnosis. Besides that, the study showed the importance of a methodology which uses whole genome amplification. The authors proved that it was a feasible option to improve PCR results.