

## **Guidelines de Genética para Reprodução Humana**

**Este é o primeiro Guia de Normas Técnicas elaborado pelo Comitê de Genética da SBRH e que visa o que deve ser realizado ou aplicado no dia a dia de um serviço de reprodução assistida a fim de que a prática médica seja a mais adequada a nossos pacientes.**

**Os itens de indicação foram criados para que não esqueçamos de fazer uma abordagem mais completa de anamnese e exames subsidiários e , assim, criar um consenso de condutas, de logística e de equipamentos. Por exemplo , todos os serviços tem e citam aos pacientes a correlação da idade com o índice de sucesso do procedimento de reprodução assistida, mas poucos se aprofundam nas explicações e implicações futuras dos riscos consideráveis do aumento da idade materna . Pouco se fala da tremenda seleção natural dos embriões que estão fadados a não se desenvolver, mas sua explicação ameniza e consola bastante nossos pacientes.**

**Se o colega leitor prestar bastante atenção ao documento basicamente traduzido do “Guideline” Europeu , perceberá que a ética de uma conduta pode depender do seu grau de compreensão da Genética .Por exemplo , nas translocações equilibradas é sobejamente conhecido o fato de levar a mais de 50% de abortos nos casais portadores, o que em outras palavras, significaria que o limite de transferência de embriões nesses casais deveria ser dobrado, se o casal não fizer um PGD. Nesse mesmo guia, nota-se também que todo e qualquer casal deve ter ciência de todas as possíveis implicações de um insucesso de um PGD e de suas explicações, prévias ao início do processo reprodutivo, para que o médico e a paciente entenda das nossas limitações diagnósticas e prognósticas.**

**Felizmente, a rigidez de trabalho e de conduta da maioria dos serviços de reprodução assistida facilitará,sem dúvidas, o acoplamento dessas recomendações aos nossos serviços . E com o espírito de equipe nessa delicada área de Reprodução assistida, o presente comitê se coloca á disposição para sanar quaisquer dúvidas remanescentes, bem como acatar todas as sugestões no aprimoramento deste documento.**

Contribuíram para a elaboração deste documento os seguintes geneticistas :

Lygia da Veiga Pereira  
Rua Jacupiranga, 114  
01440-050 São Paulo - SP  
Tel. (011) 3091-7476 cons. 9185-2440 cel.  
e-mail: [lpereira@usp.br](mailto:lpereira@usp.br)

Rui Fernando Pilotto  
Rua Dr. Roberto Barroso, 1346 Conj. 1360  
80520-070 Curitiba – PR  
Tel. (41) 3338-6625 cons. 9972-0321 cel.  
E-mail: [ruipilotto@uol.com.br](mailto:ruipilotto@uol.com.br)

Thomaz Rafael Gollop  
Rua Felix de Souza 321  
04612-080 São Paulo – SP  
Tel. (011) 5093-0809 cons. 5096-7694  
e-mail: [trgollop@usp.br](mailto:trgollop@usp.br)

Walter Pinto Junior  
Rua Tenente Haraldo Egidio de Souza  
Santos, 672, CEP 13070-600 Campinas - SP  
TEL.: (019) 3243-2544  
e-mail: [walter@geneticamedica.com.br](mailto:walter@geneticamedica.com.br)

## ITENS ABORDADOS

- 1) Indicações de aconselhamento genético Indicações do cariótipo: marido, esposa ou casal
- 3) Pesquisa em determinados grupos étnicos
- 4) Indicações de PGD e Indicações de PGS INDICAÇÕES DE ACONSELHAMENTO GENÉTICO

- 1) Filho ou parente com cromossomopatia , malformações, retardo mental ou doença genética
- 2) Casal em que , pelo menos um dos cônjuges é portador de doença genética ou gene deletério ou de um gene que pode causar uma doença genética
- 3) Casal em que um dos cônjuges é portador de uma cromossomopatia incluindo as translocações equilibradas
- 4) Casal com parentes com doenças parecidas, mas tem dúvida se é herdada ou não ou que tem certeza que é uma doença genética
- 5) Idade materna maior que 34 anos ; Paterna maior que 55 anos
- 6) Esterilidade conjugal sem causa aparente
- 7) Abortamento de repetição , no casal ou em seus genitores
- 8) Casal com algum grau de consangüinidade
- 9) Casal de um mesmo grupo racial de risco
- 10) Casal em que , pelo menos um dos genitores está exposto a radiação , ou produtos químicos, álcool ou uso de drogas para doenças crônicas
- 11) Casal com grande ansiedade de gerar uma criança malformada , ou com retardo mental ou com cromossomopatia

## INDICAÇÕES RECOMENDÁVEIS DO CARIÓTIPO NOS CASAS DE REPRODUÇÃO ASSISTIDA

- 1) Dois ou mais abortos espontâneos
  - 2) Filho com aberração cromossômica
  - 3) Filho com malformação não diagnosticada
  - 4) Familiar com aberração cromossômica
  - 5) Familiar ou familiares com retardo mental
  - 6) Duas FIV com baixa taxa de embriões ou > granulação
  - 7) Três FIV com embriões, mas sem sucesso
  - 8) Aumento de embriões com parada de divisão
  - 9) ESCA há vários anos
  - 10) Cinco inseminações sem sucesso
  - 11) Menopausa precoce
  - 12) Oligospermia ou azoospermia
  - 13) Doador ou doadora de gametas
  - 14) Desejo de casal
- INDICAÇÃO ACEITÁVEL DE CARIOTIPAGEM**

## DOENÇAS GÊNICAS QUE *DEVEM* SER PESQUISADAS DE ACORDO COM O GRUPO ÉTNICO

### GRUPO ÉTNICO

### ALTERAÇÃO GÊNICA

AFRICANOS (NEGRÓIDES) ..... HEMOGLOBINA S, CAUCASÓIDES EM GERAL ..... FIBROSE CÍSTICA, FENILCETONÚRIA  
 CHINESES ..... TALASSEMIA ALFA INGLESES, IRLANDESES, EGÍPCIOS..... DEFEITOS DE FUSÃO DO TUBO NEURAL  
 ITALIANOS, GREGOS, ÁRABES..... TALASSEMIA BETA  
 JUDEUS ASHKENAZI ..... D.TAY-SACHS  
 CASAMENTOS CONSANGUÍNEOS..... FIBROSE CÍSTICA E HEMOGLOBINOPATIAS

## PGD e PGS

### Introdução

#### Por que ter normas?

Diagnóstico pré-implantação (PGD, do inglês *preimplantation genetic diagnosis*) e triagem pré-implantação (PGS, do inglês, *preimplantation genetic screening*) são opções de tratamento relativamente não regulamentadas e pouco padronizadas quando comparadas com outras formas de testes diagnósticos. Considerando-se as

dificuldades envolvidas em se obter o máximo de sensibilidade e confiabilidade na análise de células únicas, inerente do PGD/PGS, vários países estabeleceram normas de boa prática nesses tipos de diagnóstico (Thornhill et al., 2004).

Existem duas categorias de PGD. O PGD de alto risco (aqui denominado PGD) é realizado para pacientes que possuam alto risco de transmitir uma anomalia genética ou cromossômica para seus filhos, incluindo defeitos em um único gene (doenças autossômico recessivas ou dominantes e ligadas ao X) e aberrações cromossômicas (translocações, aberrações estruturais, etc). O PGD de baixo risco (aqui denominado PGS) é realizado para pacientes com problemas de fertilidade que se submetem à fertilização in vitro (FIV), com o objetivo de aumentar a taxa de gravidez por FIV. Exemplos de indicação de PGS incluem idade materna avançada, casais com insucesso em ciclos de FIV e casais com cariótipo normal que tenham tido múltiplos abortos espontâneos.

Neste documento pretendemos estabelecer normas de boa prática de PGD/PGS no Brasil, levando em conta a legislação local referente à manipulação de embriões humanos. Essas normas foram adaptadas de normas estabelecidas pela *European Society of Human Reproduction and Embryology* (ESHRE), baseadas na vasta experiência de diferentes grupos de países europeus em PGD/PGS. Acreditamos que o mínimo de padronização deve ser estabelecido entre diferentes centros diagnósticos de PGD/PDS de forma que os pacientes recebam o melhor serviço possível independente do centro em que sejam atendidos.

Essas normas não pretendem ser protocolos fixos e nem têm valor legal. Características particulares de cada caso podem justificar desvios dessas normas, que devem ser aplicados de acordo com a necessidade individual do paciente e com avaliação profissional. No entanto, essas normas poderão ser incorporadas a legislações e regulamentações.

### ***Como as normas funcionam na prática?***

Essas normas serão divididas em diferentes categorias:

**RECOMENDADA** (existe suficiente experiência e dados publicados para sugerir que a prática em questão é segura e efetiva);

ou **NÃO-RECOMENDADA** (existe suficiente experiência e dados publicados para sugerir que a prática em questão pode não ser segura e/ou efetiva).

Por exemplo, essas normas **recomendam** ICSI como método de fertilização quando se for fazer um teste baseado em PCR de célula-única, uma vez que o risco de contaminação por células exógenas ou DNA tem maiores conseqüências para a acuidade do teste por PCR do que por FISH (do inglês, *fluorescent in situ hybridization*). Por outro lado, para testes por PCR, fertilização convencional seria classificada como **não recomendada**.

Quando existirem discrepâncias na literatura, pode ser difícil estabelecer um consenso e as normas podem ser mais ambíguas, como por exemplo, na escolha de tampões de lise para uso em PCR de célula-única. Nesse caso, o uso de tampão de lise alcalino ou com proteinase K seriam considerados **ACEITÁVEIS**.

O restante deste documento fornece uma base de identificação e classificação de procedimentos fundamentais para a prática de PGD/PGS.

## **Organização do Centro de PGD/PGS**

Um programa de PGD requer o envolvimento de uma clínica de genética, uma unidade de fertilização e um laboratório para os diagnósticos. A comunicação clara, acessível e oportuna entre as diferentes unidades é imperativa e deve ser realizada sob um rigoroso controle de qualidade (Geraedts et al., 2001). Todos os pacientes envolvidos no programa de PGD/PGS precisam ser aconselhados apropriadamente em todas as circunstâncias (ver abaixo). É **recomendado** o uso de um consentimento informado para o tratamento. O aconselhamento, consentimentos e procedimentos de diagnóstico diferem entre PGD e PGS.

No PGD, os seguintes passos são **recomendados** para todos os casais com alto risco de alterações cromossômicas estruturais ou doenças monogênicas: Um geneticista que através do aconselhamento genético deve inicialmente orientar os futuros pais quanto a indicação do PGD e depois discutir seu uso. Depois, o especialista em infertilidade, dentro da rotina de FIV irá avaliar o casal.

Em procedimentos de PGS, a entrada de pacientes é predominantemente via a unidade de FIV. O aconselhamento por um especialista em infertilidade ou geneticista é **recomendado**, proporcionando atenção redobrada no histórico reprodutivo do casal.

O laboratório de FIV deve ser organizado de acordo com o guia de boas práticas em FIV preparado pelo ESHRE e Embryology Special Group (SIG). (Giannaroli et al,2000). Todos os procedimentos laboratoriais devem estar em um manual atualizado pelo responsável ou diretor do laboratório Os procedimentos adotados devem ser avaliados e discutidos por todos os membros para obter-se uma uniformidade de todo o tratamento. Os procedimentos de cultivo de embrião único, biópsia celular e transferência seletiva de embriões que devem ser baseados nos resultados genéticos, são aspectos adicionais do programa de PGD (ver tópicos relevantes abaixo).

## **Orientação, consentimento informado e “aprovação”**

- É **recomendado** que todos as orientações sejam realizados sob responsabilidade de um médico qualificado.
- Orientação de problemas comuns por técnico em saúde cuidadosamente treinado ou médico não especializado em genética é **aceitável**.
- É **recomendável** que os centros concedam informações suficientes e apropriadas que permitam aos pacientes optar pelo tratamento de PGD. Esta opção deve ser documentada através de consentimento informado.
- É **recomendado** que os pacientes sem diretrizes sejam orientados adequadamente por um profissional qualificado e sejam incluídos no programa.

## **Aconselhamento genético**

- Avaliação dos riscos genéticos e dos riscos de repetição.
- Explicação da origem e gravidade da doença herdada.
- Opções reprodutivas e alternativa de PGD assim como, diagnóstico pré-natal, doação de gametas, esterilidade, aceitação dos riscos sem realizar exames mais detalhados, adoção, benefícios e limitações do PGD comparados a outras alternativas de obter uma prole saudável.
- Discutir sobre os riscos de concepção espontânea de uma criança afetada por uma doença genética e o uso de contracepção.
- Examinar somente a doença genética previamente caracterizada no casal e qual exame deve ser realizado.
- Intenção do teste , pe. rejeição de homens normais e afetados após a sexagem para desordens associadas ao cromossomo X.
- Expectativa do número de embriões afetados de acordo com a proporção Mendeliana.
- Informações sobre o laboratório que realizará os testes e suas limitações.
- Uma seqüência real de tempo para disponibilidade do exame para PGD.
- Confiabilidade do diagnóstico de PGD, possibilidade de diagnósticos equivocados ou resultados adversos.
- Decisão sobre a forma de disposição dos embriões afetados ou não diagnosticados
- Decisão sobre a transferência de embriões portadores (para doenças recessivas autossômicas ou ligadas ao cromossomo X).
- Decisão sobre a detecção da mutação ou sexagem por FISH (para desordens associadas ao cromossomo X).
- Decisão sobre o diagnóstico pré-natal em mulheres grávidas.
- Discussão sobre o risco de nascimento prematuro, baixo peso, mortalidade perinatal, anomalias congênitas e /ou atraso no desenvolvimento em crianças obtidas através do tratamento de FIV/ICSI/PGD (Lamber, 2003),
- Discussão das incertezas sobre os efeitos adversos a longo prazo em crianças nascidas após a fertilização assistida com ou sem PGD, e a importância do acompanhamento de crianças nascidas após o PGD.

## **Orientação relacionada ao tratamento**

- Descrição detalhada sobre o procedimento de FIV /ICSI
- Riscos de complicações médicas durante a estimulação ovariana e a coleta de oócitos.
- Riscos adicionais a curto e longo prazo em procedimentos e gravidez em mulheres afetadas com doenças autossômicas dominantes e recessivas ligadas ao cromossomo X (pe. risco de hemorragia durante a coleta de oócitos e parto de portadoras de doenças hemorrágicas (pe Von Willebrand, hemofilia), trombose em mulheres com doenças de coagulação como a mutação do fator V de Leiden, Gene da Protrombina e redutase da metilenotetrahidrofolato).
- Incertezas sobre a futura fertilidade e saúde da mulher após o tratamento de PGD (Winston and Hardy, 2002).

- Especificações do tratamento de PGD comparado com o tratamento regular de FIV/ICSI:
  - o O número de oócitos colhidos precisa ser maximizado com os cuidados considerados pela prática médica.
  - o Probabilidade de transferência de embriões não afetados.
  - o Possibilidade de todos os embriões serem afetados.
  - o Alguns embriões talvez sejam impróprios para a biópsia,
  - o Alguns embriões talvez não sobrevivam a biópsia,
  - o O diagnóstico talvez não seja possível em todos os embriões biopsiados.
- Número de embriões a ser transferidos
- O destino de embriões não diagnosticados e não transferidos (ver transferência de embriões)
- Probabilidade de gravidez/nascimento por ciclos iniciados e por transferência
- Riscos de gravidez múltipla
- Risco de aborto
- Número máximo de tratamentos de PGD propostos e aplicáveis.
- Seqüência de tempo limite para iniciar o tratamento
- Custos
- Política de cancelamento de ciclo se houver problemas pré-existentes de fertilidade ou condições necessárias para realizar a fertilização in vitro, independente da necessidade do PGD .

### **Em associação com o exame de HLA**

- Para somente tipagem de HLA, a média de 25% de embriões é própria para a transferência;
- Para tipagem de HLA combinado com o diagnóstico específico de PGD para desordem autossômicas recessivas, a média de somente 3 entre 16 (18,8%) de embriões é própria para a transferência.
- Em tipagem de HLA combinada com sexagem e desarranjos ligados ao cromossomo X, a média de somente 03 entre 8 (12,5%) de embriões é própria para a transferência;
- Aos casais que recorrem ao centro para obter informações sobre o transplante de células tronco, deve ser oferecido informações completas da probabilidade de sucesso em transplantes de células tronco e células de sangue de cordão, tratamentos alternativos acessíveis, possíveis complicações de transplante de células tronco/medula óssea e determinação do tempo certo para realizar o transplante de células tronco.
- deverão ser discutidos destino dos embriões normais , não compatíveis no sistema HLA .
- Os pacientes devem receber todas as informações em folheto explicativo sobre FIV/ICSI/PGD, possivelmente suplementado com informações escritas sobre exames especiais adequados a cada situação e ainda que contenha a indicação de uma pessoa para futuros esclarecimentos necessários.

## **Avaliação psicológica**

É **recomendado** a avaliação psicológica para:

- Pacientes com histórico de falência reprodutiva;
- Pacientes com histórico de experiências traumáticas;
- Casais em que algum membro do grupo de FIV/PGD (geneticista, ginecologista, ou outros) tenha dúvidas sobre o bem-estar psicológico, ou capacidade mental para serem pais futuramente.
- Casais que efetivamente questionam sobre a intervenção psicológica
- Casais em que um dos futuros pais seja portador de uma doença autossômica dominante e que talvez apresente os sintomas determinados pelo médico especialista (e.g. desordens neurodegenerativas/psiquiátricas, determinadas pelo médico especialista, como a doença de Huntington diagnosticada por um neurologista).

## **Aprovação**

Fazem-se as seguintes **recomendações**:

Os centros onde os testes em laboratório são realizados deveriam ser autorizados pelo Estado ou por uma autoridade competente no Estado que existe para este fim.

O laboratório de IVF e diagnóstico deveria obter aprovação ética para realizar os procedimentos PGD (inclusive as biopsias em embriões e diagnósticos únicos em blastômero).

É **aceitável** fazer uso dos chamados laboratórios de “PGD transportado” ou “satélites PGD” (definidos como o processo pelo qual amostras de biopsias de um centro de IVF são transportadas até uma facilidade diagnóstica administrativamente separado; veja os parágrafos Controle de qualidade e garantias de qualidade).

## **Critérios para a inclusão ou exclusão do paciente**

Os critérios de inclusão ou exclusão do paciente para tratamento PGD/PGS varia de uma clínica para a outra (como é o caso dos critérios para a rotineira inclusão IVF) mas existem as seguintes **recomendações**.

## **Critérios gerais de inclusão para PGD/PGS**

### **Genética**

O diagnóstico é tecnicamente possível na teoria.  
A confiabilidade do diagnóstico é alta (acima de 90%)

## **Fertilidade**

Os pacientes têm um problema de fertilidade que provavelmente poderá ser superado por IVF/ICSI.

## **Critérios Gerais para a Exclusão do paciente para PGD/PGS Genética**

O diagnóstico não é possível com as atuais técnicas

## **Fertilidade**

A idade da mãe é acima de 40 a 45 anos (a idade exata deverá ser determinada por cada centro)

FSH Basal >15IU/1 (valor exato a ser determinado por cada centro)

É contra-indicado para IVF/ICSI

A massa corpórea é acima de 30kg por metro quadrado (valor exato a ser determinado por cada centro)

## **Critérios específicos para a inclusão de PGD**

### **Genética**

O diagnóstico genético é certo ou quase certo

Há um alto risco de recorrência na concepção de uma desordem genética específica (por exemplo acima de 10% para rearranjo cromossômico, 25% a 30% para desordens monogênicas) ou aborto espontâneo recorrente ligado a uma anormalidade cromossômica estrutural dos pais.

Como consequência desta desordem genética espera-se problemas de saúde

### **Também, para tipagem HLA**

Um filho nascido anteriormente destes pais é afetado e sofre de uma desordem maligna ou genética e a criança provavelmente será curada ou ter a expectativa de vida prolongada devido ao transplante de células de tronco com o sangue do cordão umbilical de um irmão idêntico em termos de HLA (após o esgotamento de todas as outras opções clínicas).

É tecnicamente possível combinar a tipagem HLA com a detecção de mutações no caso de risco de recorrência de recessivo autossomo ou uma desordem recessiva ligado ao cromossomo X ou com hibridização FISH no caso de uma desordem ligada ao cromossomo X.

## **Critérios específicos para exclusão de PGD**

### **Genética**

O diagnóstico genético é incerto, por exemplo, devido a uma heterogeneidade genética/ molecular ou um modo incerto de hereditariedade.

Baixo risco de recorrência (por exemplo, menos de 10%).

Talvez o PGD não seja recomendável porque o parceiro afetado tem um sério problema mental/ psicológico/ psiquiátrico devido à desordem neurológica/ neurodegenerativa/ psiquiátrica para a qual o PGD é requerido.

### ***Também para a tipagem HLA:***

Para os casos nos quais a criança afetada tem uma condição médica aguda que impede o transplante seguro das células tronco ou tem uma expectativa de vida extremamente baixa, deveria considerar o tempo necessário para o desenvolvimento do teste de PGD, a aplicação e o tempo que um irmão com o mesmo HLA levaria para nascer.

### **Fertilidade**

A mulher tem sinais e sintomas severos de uma desordem dominante do autossomo ou uma desordem ligada ao cromossomo X (para a qual o PGD é requisitado), que poderia introduzir complicações médicas durante a estimulação dos ovários, recuperação de óvulos ou a gravidez.

## **Critérios de inclusão para PGS**

### **Genética**

Repetidos abortos espontâneos (acima de 2 abortos; número exato a ser determinado por cada centro). Nota-se que as pacientes com um histórico de múltiplos abortos espontâneos têm uma boa chance de conceber um filho naturalmente (Brigham et al., 1999; Carp et al., 2001).

### **Fertilidade**

Repetidos fracassos com implantações (acima de três transferências de embriões com embriões de alta qualidade ou a transferência de 10 ou mais embriões em transferências múltiplas; os números exatos deveriam ser determinados individualmente por cada centro). O fracasso na implantação se define como a

ausência de um saco gestacional no ultra-som às cinco semanas após a transferência do embrião.

Idade materna avançada (36 anos completos ou mais; idade exata a ser determinada por cada centro).

### **Critérios para exclusão de PGS**

#### **Fertilidade**

Baixa contagem total de folículos antrais, por exemplo, abaixo de 7 (limites a serem determinados por cada centro)

Baixa qualidade dos embriões.

### ***INDICAÇÕES DOS CENTROS***

#### **Documentação pertinente**

Recomenda-se que os seguintes documentos (quando necessários) deveriam ser entregues ao centro de IVF?PGD para evitar a duplicação de consultas e a consistência do tratamento.

Relatório ou laudo do aconselhamento genético

Resultados originais dos testes de DNA ou outros testes específicos da criança afetada, os futuros pais ou outros familiares (quando for o caso).

Dados do pedigree completo e o histórico completo (pelo menos três gerações)

Dados sobre os problemas de saúde dos parceiros masculinos e femininos e consultas com especialistas que possam afetar o diagnóstico genético ou o sucesso do processo de IVF ou gravidez (quando for necessário)

O histórico reprodutivo da mulher e seu estado ginecológico e da sua fertilidade

O histórico reprodutivo do homem, seu histórico andrológico, o estado de sua fertilidade, resultados de análises de esperma (principalmente se a desordem genética para a qual o PGD é requerido afeta os parâmetros do esperma, por exemplo, translocações dos cromossomos ou desordens de gen único como a distrofia miotônica e fibrose cística/ ausência congênita bilateral dos vasos deferentes).

#### ***Também para a tipagem HLA,***

Um relatório médico sobre a criança afetada, situação atual, prognóstico, opções para tratamento que não sejam o PGD, se o transplante de células tronco é

apropriado neste caso, resultados antigos de tipagem HLA (serológico ou marcadores de DNA), na criança afetada, seus pais e seus irmãos.

## **Preparação pré-cíclica em casais individuais**

### **Testes baseados em FISH**

Determinação de Sexo: se for usar um conjunto de sondas que já resultaram em uma taxa de polimorfismo muito baixa (por exemplo, a *aneuvysion XY, 18*) é **aceitável** abrir mão que qualquer preparação pré-cíclica. Se for usar DYZ1 (Yq12), os testes pré-cíclicos dos núcleos de interfase do parceiro masculino é **recomendado** devido à ocorrência relativamente baixa de polimorfismo nesta região do cromossomo Y (Hsu et al., 1987).

Anormalidades estruturais do cromossomo: é **recomendado** que os linfócitos de cada casal sejam testados com o conjunto específico de sondas para uso clínico. É aceitável fazer os testes em blastômeros dos embriões doados para pesquisa antes do teste clínico de PGD. É aceitável realizar os testes FISH em espermatozoides dos portadores da translocação masculina para prever a eficácia do PGD para estes casos. (Escudero et al, 2003).

Teste de prevenção de aneuploidia (PGS): recomenda-se que o teste com a sonda D15Z1 seja feito nos linfócitos de ambos os parceiros reprodutivos antes do tratamento já que se hibridiza para o cromossomo 14 em cerca de 15% dos casos (Shim et al, 2003). Esta recomendação pode ser generalizada para qualquer sonda que se hibridiza a uma frequência apreciável.

### **Testes baseados em PCR**

As seguintes medidas são recomendadas:

Testes para confirmar a mutação no DNA (usando testes padrões) ou rever os testes documentados numa outra instituição por um profissional qualificado.  
Testes para confirmar as tentativas clínicas de PGD no DNA do sangue paterno e do paciente já que a tentativa PGD poderia ser não informativa devido a uma falha de PCR resultante dos polimorfismos ou variações de DNA presentes na população (Thornhill et al, 2002).

### **O protocolo clínico para IVF**

Instruções para a IVF rotineira podem ser adquiridas no guia ESHRE SIG Embriology (Gianroli et al, 2000).

### **Considerações especiais para pacientes PGD**

Fazem-se as seguintes recomendações:

O uso oral da pílula anticoncepcional para reduzir muito o risco de conceber um

filho espontaneamente afetada pela desordem genética em pacientes PGD que estão aguardando tratamento.

Instruir os pacientes a não praticar sexo sem proteção durante o ciclo PGD para evitar que os óvulos não coletados se fertilizem *in vivo*.

Procure aumentar o aproveitamento dos óvulos de alta qualidade (Vandervorst et al, 1998).

Tome precauções com pacientes com específicas desordens genéticas que possam afetar a segurança do procedimento IVF (por exemplo, durante a coleta dos óvulos: administração de desmopressina para prevenir o sangramento em portadores de hemofilia e monitoramento cardíaco para mulheres com distrofia miotônica).

As seguintes medidas são **aceitáveis**:

Considerar a contagem pré-cíclica dos folículos antrais para prever o aproveitamento dos óvulos maduros (Dumesic et al, 2001) ou a resposta fraca dos ovários ao estímulo (Bancsi et al, 2004).

Devido a uma falta de consenso e políticas de cancelamento específicas para cada clínica, os centros individuais deveriam determinar seus números limites para os folículos, os óvulos e embriões para o cancelamento do ciclo.

No caso de fracasso nos testes genéticos antes de um ciclo clínico, as seguintes opções são aceitáveis (de acordo com a política de cada centro e as circunstâncias individuais:

Cancelamento do ciclo antes da estimulação com gonadotrofinas

Manter o paciente em GnRH agonista por um tempo limitado (Ulug et al, 2004) até o laboratório de diagnóstico se declarar pronto para receber as amostras.

Congelar todos os embriões na etapa pronuclear ou divisão para descongelar mais tarde, realizar a biópsia e a transferência.

### ***A Cultura de embriões e a biópsia***

Até o tempo da biópsia, as condições rotineiras para a cultura IVF se aplicam (Gianroli et al, 2000). A biópsia dos embriões pode ser realizada em três etapas, o corpo polar, a etapa de divisão e o blastocisto. Porém, numa pesquisa recente das práticas entre cinquenta centros realizando os testes PGD, a maioria realiza apenas a etapa de divisão no dia 3 do desenvolvimento (A. R. Thornhill, dados não publicados).

Existem vários métodos da etapa de divisão da biópsia, mas a maioria das clínicas utilizam a perfuração de zona com o ácido Tyrode ou um laser e a aspiração dos blastômeros em meio livre  $Ca^{2+}=Mg^{2+}$  (Dumoulin et al, 1998) para biópsia de embriões (ESHRE PGD Consortium, 1999, 2000, 2002; Harper e Thornhill, 2001; De Vos e Sterteghem, 2001; Harper e Doshi, 2003). Alguns centros realizam apenas a biópsia em corpos polares como um meio de evitar a remoção de células embriônicas (Verlinsky et al, 1990, 1997) enquanto outros utilizam esta estratégia exclusivamente devido as normas que proíbem a biópsia de embriões em sua região

ou país, por exemplo, Alemanha; Kupker et al, 2001).

**Recomenda-se** que o embrião e o blastômero sejam verificados durante o procedimento para que os resultados diagnósticos possam ser ligados a certos embriões sem equívoco.

**Recomenda-se** muito que todas as células do cumulus sejam removidas antes da biópsia pois estas células podem contaminar os diagnósticos FISH e PCR.

### ***Inseminação***

O ICSI é recomendado para todos os casos de PCR para reduzir as chances da contaminação paterna do esperma ligado a zona pelúcida ou esperma não descondensado dentro dos blastômeros (ESHRE PGD Consortium, 1999, 2000, 2002). A ICSI ou inseminação convencional é **aceitável** para os casos FISH.

### ***A cultura dos embriões***

As condições padrão da cultura IVF são aceitáveis até o dia da biópsia mas, após a biópsia, as seguintes recomendações se aplicam:

Os meios de cultura apropriados deveriam ser usados a partir do dia 3

Os embriões deveriam ser preparados individualmente em gotas ou pratos individuais com um sistema de identificação claro para garantir o rastreamento dos blastômeros removidos e a fácil identificação dos embriões após o diagnóstico.

Os embriões são lavados após a biópsia para remover os traços de ácido ou meio para biópsias.

### ***Cronometragem da biópsia***

Corpo polar. **Aceitável:** O primeiro corpo polar pode ser removido do óvulo no dia da coleta do óvulo entre 36 e 42 horas após a injeção HGC. (Verlinsky et al, 1990). O segundo corpo polar pode ser removido do embrião zigoto entre 18 e 22 horas após a inseminação. O primeiro e segundo corpos polares podem ser removidos simultaneamente (Verlinsky et al, 1997) mas o primeiro pode ter degenerado até o dia 1. A remoção seqüencial dos corpos polares onde o primeiro é removido no dia 0 e o segundo no dia 1 também é aceitável (Strom et al, 1998). Nota-se que a biópsia simultânea dos dois corpos polares é aceitável para as análises FISH pois podem fornecer resultados distintos (Verlinsky et al, 1998). Porém, a biópsia seqüencial dos corpos polares é recomendada para a análise PCR para determinar os eventos de recombinação entre o primeiro e segundo corpo polar. Em alguns casos, a biópsia da etapa de divisão pode ser requerida para confirmar o diagnóstico dos corpos polares. As limitações da biópsia do corpo polar já foram documentadas (Harper e Thornhill, 2001; De Vos e Van Steirteghem, 2001; Harper e Doshi, 2003).

A biópsia da etapa de divisão. A biópsia de manhã do dia 3 após a inseminação é

recomendada mas a determinação exata desta cronometragem varia de acordo com o agendamento e cronometragem de procedimentos em laboratórios diferentes. É aceitável excluir embriões de baixíssima qualidade do procedimento de biópsia do embrião, mas nenhum critério específico é recomendado neste caso. Porém, é recomendado fixar os critérios antes da execução do PGD clínico e respeitá-los.

A biópsia do blastocisto: A biópsia do blastocisto na manhã do dia 5 ou 6 após a inseminação é aceitável. Entretanto, a experiência é limitada e a aplicação clínica foi publicada após uma revisão por colegas em apenas um centro (de Boer et al., 2002). As limitações e as vantagens desta abordagem já foram descritas em outras publicações (De Vos e Van Sterteghem, 2001; Harper e Thornhill, 2001; Harper e Doshi, 2003).

### ***Procedimento da biópsia***

As seguintes **recomendações** valem para a preparação antes de qualquer procedimento de biópsia em embriões humanos:

Verificar que todos os equipamentos para micro-manipulação estejam instalados corretamente, calibrados e mantidos seguindo as instruções dos manuais.

Verificar que os reagentes apropriados e ferramentas para micro-manipulação estejam disponíveis, esterilizados e dentro do prazo de expiração.

Verificar que a biópsia seja realizada por uma pessoa qualificada que foi treinada usando um procedimento escrito e que adere a este procedimento (Autoridade da Embriologia e Fertilização Humana, 2003).

Os utensílios para a biópsia do embrião deveriam ser preparados antes do procedimento e claramente etiquetados e identificados com o nome do paciente e os números de embriões.

As Placas utilizadas deveriam conter uma gota de meio para biópsias em uma quantidade suficiente para manter o pH, a osmolalidade e a temperatura durante o procedimento.

Gotas suficientes para lavar com um meio de cultura deveriam estar disponíveis para lavar o embrião.

Uma solução de *Tyrode Acidificado* deveria estar disponível para permitir pipetagem em certa ordem entre os embriões.

### **Retirada Celular (cell removal)**

- Os seguintes métodos de retirada celular são **recomendados**:
  - Retirada do corpúsculo polar por aspiração (Verlinsky *et al.*, 1990).
  - Retirada de blastômeros em pré-embriões clivados por aspiração (Hardy et al., 1990).
  - Retirada de células da trofoderme em pré-embriões no estágio de blastocisto através do processo de herniação seguido de laser (De Boer et al., 2002) ou abertura mecânica (Dokras et al., 1990)

- Os seguintes métodos de retirada celular são **aceitáveis** (São necessários mais dados clínicos para demonstrar a eficácia de cada método)
  - Retirada de células de pré-embriões em estágio de clivagem por extrusão (Fallon et al., 1999) ou por “técnica de deslocamento” (Pierce et al., 1997).
  - Realizar a retirada celular da trofoderme em pré-embriões no estágio de blastocisto durante a biópsia pelo método mecânico de sutura e compressão (Muggleton-Harris et al., 1993)

#### ***Número de células a ser biopsiado (mínimo e máximo):***

Não existe um consenso sobre o número de blastômeros que devem ser biopsiados de pré-embriões em estágio de clivagem. A decisão de retirar 01 ou 02 blastômeros é baseada em diversos fatores, entre eles o n° de células que o embrião possui no horário da biópsia, a acuracidade e confiança no teste utilizado para o diagnóstico.

A biópsia de 02 células é recomendada somente quando o embrião possuir 06 ou mais células (Van de Velde et al., 2000).

#### ***Rebiópsia de pré-embriões:***

Esta prática é aceitável em caso de perda de blastômeros, ou biópsia de blastômeros anucleados onde não se obtém o diagnóstico, porém o n° de células do embrião e o tempo em que a rebiópsia será realizada deve ser considerado.

Nos casos de rebiópsia, a aspiração de nova célula deve ser realizada pela abertura da zona pelúcida original.

#### ***Seleção de células a serem biopsiadas:***

Quando possível, é **recomendável** a retirada somente de células mononucleadas.

#### **Meio para biópsia**

**É aceitável** o uso de meios de cultivo embrionário durante a biópsia, porém sua eficácia está diretamente associada ao estágio de desenvolvimento do pré-embrião a ser biopsiado. **É recomendável** o uso de meio para biópsia de embriões sem cálcio e sem magnésio (Dumoulin et al., 1998).

#### **Tempo fora da incubadora**

Não existem dados específicos para o tempo máximo em que o pré-embrião deve ser mantido fora da incubadora, porém devem ser criteriosamente observados, a alteração de temperatura, pH e osmolaridade do meio utilizado durante a biópsia, de modo a preservar a qualidade dos pré-embriões.

**É recomendado** que os dados obtidos entre o tempo da biópsia e as características físico-químicas do meio utilizado durante a biópsia devam ser documentados como um controle de qualidade dos resultados obtidos.

## **Diagnósticos através da análise de FISH**

### ***Doenças associadas aos cromossomos sexuais (sexagem)***

**É recomendado** que o mix de probes utilizados contenha no mínimo um probe específico para cada região centromérica dos cromossomos X e Y, e um probe específico para um cromossomo autossômico (Staessen et al.,1999 ; Harper and Wilton, 2001). **É aceitável** o diagnóstico de apenas uma célula mononucleada para sexagem (Kuo et al.,1998)

### ***Rearranjos cromossômicos***

**É recomendado** que os probes utilizados para esta análise detectem o máximo de rearranjos cromossômicos desequilibrados possíveis. Entretanto, quando não se conhece os cromossomos a serem estudados, **é aceitável** que se utilize um mix de probes que possam identificar algumas formas de rearranjos cromossômicos desequilibrados, desde que tenham sido avaliados o baixo risco de obtenção de uma gravidez com predominância de alteração cromossômica (Scriven et al.,1998; Delhany and Conn, 2001;Munné, 2002;Ogur et al.,2002;Scriven, 2003; Simopoulou et al., 2004). Em último caso os pacientes devem ser informados sobre estes riscos.

**É aceitável** que sejam realizados diagnósticos baseados em célula única mononucleada para rearranjos cromossômicos, desde que se utilizem dois probes envolvendo os cromossomos em desequilíbrio. Para aqueles diagnósticos onde se dispõe de apenas um probe **é recomendado** o uso de duas células mononucleadas.

### ***PGS (screening para aneuploidias)***

Para a investigação de aneuploidias, **é recomendado** um set de probes que contenha no mínimo 05 pares de cromossomos autossômicos , que podem ser os cromossomos 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22 ; e os cromossomos sexuais X e Y (Munné et al.,1999; Magli et al., 2001; Wilton, 2002). **É aceitável** que este diagnóstico seja realizado em apenas uma célula mononucleada (Munné et al.,1993)

**É aceitável** que seja realizado o processo de reibridização em célula única, desde que o protocolo utilizado seja validado (Munné et al.1998; Harrison et al.,2000; Magli et al.,2001)

### ***Probes comerciais e probes produzidos em “casa”***

Recomenda-se os uso de Kits comerciais desde que contenham controle de qualidade rigoroso e sejam validados.

**Aceita-se** o uso de kits “caseiros” desde que contenham garantia e controle de qualidade apropriado e ainda, validação do produto.

### ***Garantia de Qualidade e validação dos probes***

**É recomendado** que todos os probes sejam testados em metáfases antes de serem aplicados em diagnósticos definitivos, para certificar-se que conferem com o cromossomo a ser estudado e se possuem o fluorocromo ou o haptén correto, e ainda, se o brilho do sinal indicativo do cromossomo ou região cromossômica estudada está bem visível (discreto ou intenso) ou dentro dos parâmetros aceitáveis

para ao laboratório que irá utiliza-lo. Convém ressaltar que todos os procedimentos devem ser escritos.

### ***Seleção de Probes***

Para cada teste **é recomendável** que somente um profissional qualificado selecione os probes e os identifique corretamente.

### **Procedimentos de validação**

**É recomendado** que se realize preliminarmente ao diagnóstico em célula única, a investigação em linfócitos ou fibroblastos, do casal, para estabelecer qual é o probe ideal a ser utilizado no diagnóstico.

**É recomendado** que o probe seja aplicado e analisado em metáfases e núcleos interfásicos concomitantemente.

**É recomendado** que sejam observados no mínimo em 10 metáfases analisadas :

- 1) Que os probes específicos utilizados identifiquem o cromossomo ou a região cromossômica correta a ser investigada;
- 2) Que sejam avaliados os sinais nos polimorfismos cromossômicos e na hibridização em cromossomos alternados na translocação.
- 3) Assegurar que os probes hibridizem corretamente os diferentes segmentos do rearranjo cromossômico.

**É recomendado** a análise de 100 núcleos interfásicos; utilizando o critério de análise apropriado que inclua o tipo de marcação se discreta ou intenso.

**É recomendado** um estudo preliminar utilizando probes subteloméricos e probe locus-específico para estabelecer o polimorfismo e característica de cada um dos envolvidos. A análise dos blastômeros se aproxima daquela encontrada em linfócitos.

**É aceitável** que em cada lote de probes sejam realizados testes de controle de qualidade em série limitada de blastômeros.

**É recomendado** que o critério de análise utilizado seja estabelecido antes do diagnóstico (por publicações ou por padronização do serviço) e mantenha-se fiel ao procedimento escrito. Nenhum probe pode ser aprovado para uso clínico sem antes atingir os mínimos critérios específicos pré determinados no laboratório para intensidade, especificidade e a mínima interferência do fundo corado.

### ***Uso de Controles internos no exame***

O uso de controles positivo e negativo para PGD é um problema muito delicado, pois os controles positivos não estão prontamente disponíveis para os rearranjos cromossômicos, e os controles negativos servem somente para confirmar a mistura correta dos probes. Portanto **é aceitável** o uso do controle apenas quando possível, porém sua limitação é compreensível.

### ***Protocolos de Fixação em FISH***

**É recomendado** a remoção completa das células de cumulus antes de realizar-se a biópsia, pois elas podem contaminar a lâmina com células maternas dando resultados incorretos.

Foram descritos três processos de espalhamento e fixação de blastômeros; todos aceitáveis: Metanol/ácido acético (Tarkowsky,1966;Munné et al.,1993); Tween/HCL (Coonen et al.,1994; Harper et al.,1994), e a combinação entre Tween/HCL e metanol/ácido acético (Dozortsev and McGinnis, 2001;Baart et al.,2004). O tratamento hipotônico dos núcleos antes da retirada de citoplasma (spreading) e fixação é **aceitável**.

### ***Procedimentos em FISH***

Muitas variações na técnica de FISH foram publicadas e todos os métodos apropriadamente validados são aceitos (Delhanty and Conn,2001; Farper and Wilton, 2001). Na etapa de pré-hibridização é utilizado pepsina e formaldeído, sendo **recomendado** o rigoroso controle das soluções (prazo de validade, contaminação por células, etc.)

**É recomendado** o uso de antifade para facilitar a visualização e manter os sinais fluorescentes.

**É recomendado** antes de iniciar a técnica de FISH que se verifique a temperatura do banho e das soluções de desnaturação, hibridização e soluções de lavagem. Essas temperaturas devem ser aferidas por instrumentos calibrados periodicamente que garantam sua acuracidade.

### ***Valorização clínica dos resultados de FISH***

#### **Recomenda-se que**

- Seja estabelecido um critério para contagem e conseqüente análise dos sinais. Este critério deve ser escrito e criteriosamente seguido para não haver alteração de interpretação nos diagnósticos.
- O microscópio de fluorescência deve ser equipado com filtros apropriados para a visualização dos probes.
- Os sinais devem ser analisados por 02 pessoas diferentes e quando houver discrepância de interpretação, solicitar a análise de uma terceira pessoa (quando possível). Quando o resultado gerar dúvidas ou a análise for inconclusiva, o pré-embrião correspondente a célula analisada não deverá ser transferido.
- Os núcleos únicos analisados devem ter sua imagem “capturada” e gravada.
- Após a análise, as lâminas devem ser mantidas e estocadas a 4°C.
- Todos os resultados devem ser conferidos por um profissional qualificado (incluindo sexagem e estudo de aneuploidias)
- O resultado escrito deve ser enviado a clínica de reprodução para que haja a transferência dos embriões corretos.

**É aceitável** a análise realizada através do sistema de captura de imagem, para probes com fluorocromos não detectáveis ao olho humano.

### **Diagnóstico por PCR**

#### **Comentários Gerais**

O PCR pode ser utilizado para diagnóstico de defeitos gênicos a nível de DNA (Circum,2002;Thornhill and Snow,2002). Isto Inclui o diagnóstico específico para doenças associadas ao cromossomo X. Devido ao risco de

contaminação com *não amplificação de um alelo* (ADO), é recomendado que seja incluído marcadores ligados e marcadores não ligados ao locus da doença investigada (Verlinsky and Kuliev,2000;Sermon,2002;Thornhill and Snow,2002).

Quando apenas a sexagem for informativa para as doenças ligadas ao cromossomo X, é recomendado o uso da técnica de FISH, pois nela pode-se identificar anomalias cromossômicas ou o sexo do embrião, não sendo influenciado por contaminação (ESHRE PGD Consortium Steering Committee 1999,2000,2002).

### ***Validação usando amostras de DNA***

#### **Recomenda-se:**

- Assegurar-se que o lote de experimentos atinjam a expectativa dos resultados em diferentes genótipos com mesmo locus investigado. A Validação do teste deve ser realizada com amostras de DNA apropriadas [ incluindo afetados (autossômicos dominantes), portadores (autossômicos recessivos, doenças associadas ao cromossomo X) e amostras não afetadas por mutações e/ou amostras heterozigotas, somente com os marcadores necessários] antes de ser aplicado a células únicas. Essa forma de avaliação assegura os resultados em células únicas de indivíduos afetados, portadores (autossômicos recessivos, doenças relacionadas ao cromossomo X) e não afetados (Sermon, 2002; Thornhill and Snow 2002)
- Deve ser notado que, devido a probabilidade de variação na pipetagem, pode não ser possível trabalhar com 6 pg de DNA equivalente a uma célula. Cem picogramas (o equivalente a ~10-15 células ) é uma alternativa **aceitável** para células únicas (com exceção determinando os graus de alelos que não se amplificam).

### ***Escolha de tipos de células aceitáveis***

Para validar o teste de célula única, **é recomendado** o uso de um único linfócito, linfoblasto, células de linhagem, fibroblastos, células da mucosa (ou qualquer célula somática com a validação apropriada). Testar em blastômeros pode ser benéfico uma vez que são as células alvo, mas isso dependerá de sua viabilidade . Note que o tipo de célula poderá influenciar a eficiência de amplificação e o grau de alelos que não se amplificam (Rechitsky et al.,1998)

### ***Nº mínimo de células para validação***

**É recomendado** um mínimo 10 a 20 corridas de 50 células heterozigotas para testar a eficiência de amplificação e a porcentagem de ADO. O mesmo nº de controles brancos de lavado de células deve ser incluído para avaliar o nível de contaminação. Quanto a blastômeros, **é recomendado** o mínimo de 10 e ,quando possível, vários blastômeros do mesmo embrião devem ser testados para determinar o genótipo esperado, principalmente se forem utilizados marcadores.

### ***Uso de controles internos durante o diagnóstico de PGD***

Casos em que um único gene é defeituoso é recomendado incluir um controle positivo (100 pg de DNA e/ou controle de célula única). Esses controles incluem doenças recessivas, heterozigotos ou homozigotos afetados, doenças autossômicas dominantes, um heterozigoto afetado e um normal; e para marcadores de ligação os dois genitores e se possível um controle da criança afetada. Para cada blastômero analisado, deve ser incluído um controle branco do lavado de célula. **É recomendado** o uso de pelo menos três brancos do lavado livre de células e um controle de reação (sem DNA, sem lavado). **É recomendado** o uso de marcadores moleculares presentes em cada amostra positiva para analisador automático do DNA

### ***Avaliação da eficiência de amplificação***

**É recomendado** que a eficiência de amplificação seja de no mínimo 90%.

### ***Avaliação da não amplificação de um alelo (ADO (allelic drop-out))***

**É recomendado** que a porcentagem de ADO seja determinada usando outros tipos de células portadoras da mutação de interesse, ou células heterozigotas do tipo selvagem, com marcadores de polimorfismos conhecidos. A porcentagem de ADO deve ser baixa preferivelmente < 10%.

Devemos notar que a alta porcentagem de ADO pode ser tolerada quando o procedimento envolve doenças autossômicas recessivas, doenças autossômicas dominantes ou doenças heterozigóticas.

### ***Métodos para reduzir o ADO***

**É recomendável** a avaliação e definição das etapas do PCR para minimizar o ADO. As seguintes medidas são aceitas: aumento de temperatura de desnaturação (Ray and Handyside, 1996; Piyamongkol et al., 2003), escolha do tampão de lise (Gitlin et al., 1996; El-Hashemite and Delhanty, 1997; Thornhill et al., 2001), escolha e uso do DNA polimerase, e modificação da seqüência de primers and tamanho do produto resultante (Piyamongkol et al., 2003).

### ***Métodos para melhor identificar o ADO***

**É recomendável** a incorporação de marcador em ligação quando incorporar um novo teste, particularmente para identificar ADO (Verlinsky and Kuliev, 2000). O ideal é que o marcador seja intragênico podendo ser um microsatélite ou polimorfismo nucleotídeo simples (SNP) single nucleotide polymorphism (SNP). Quando não existem prováveis marcadores em ligação, ou o casal não é informativo para provável marcador, ou o kit escolhido para realizar uma PCR duplex apresentou dificuldades, a biópsia de duas células é uma alternativa aceitável. Suas independentes análises subsequentes irão ajudar na identificação do alelo não amplificado, o qual, irá ser visto como uma discrepância no genótipo entre as células.

### *Avaliação de contaminação*

#### **É recomendável** que:

- Para cada célula avaliada (seja durante a fase de validação ou durante a fase definitiva das análises de PGD), o controle branco também deve ser usado.
- A porcentagem de contaminação deverá ser <5% (preferivelmente zero).
- O marcador de polimorfismo (ligado ou não ligado) devem ser incluídos em todos os exames para permitir a identificação de contaminação (Pickering et al.,1994)

É **Aceitável** que se corra uma grande série de brancos periodicamente para avaliar o nível basal de contaminação .

#### ***Requerimentos mínimos por família/gametas quando se usam marcadores em ligação.***

O mesmo padrão mínimo que existe para testar PGD é semelhante aquele para diagnóstico pré natal. Um biólogo molecular com experiência em análises de ligação em genealogias deverá determinar quais amostras são necessárias para um diagnóstico realizável com segurança

### *Reagentes*

#### **Recomenda-se:**

- Todos os lotes de reagentes devem ser anotados de modo que eles possam ser ligados de volta a um teste específico .
- Todos os lotes de reagentes novos e velhos devem ser submetidos a restrito controle de qualidade.
- Sempre que possível todas as soluções devem ser preparadas por um biólogo molecular especializado ou equivalente.
- Todas as soluções utilizadas no PCR devem ser fracionadas em alíquotas de uso único.
- Todos os artigos plásticos usados em PCR devem ser certificados quanto a ausência de DNA.

#### **Aceita-se**

- Todas as soluções “feitas em casa” devem ser autoclavadas (uso de autoclaves dedicada especificamente para isso) ou quando não for possível, filtradas em poro 0,2 µm.
- *PCR master mix* deve ser pré tratado tanto por irradiação de UV ou por digestão enzimática através de enzimas de restrição com a finalidade de descontaminação

Continua a tradução do trabalho por Dra Lygia

***“Work practice controls”***

São feitas as seguintes **recomendações** (Sermon, 2002; Thornhill, 2002):

- Todos os funcionários que realizam diagnóstico baseado em PCR devem ser treinados adequadamente e seguir os procedimentos operacionais padrão escritos;
- Quando existir acreditação, funcionários devem possuir ou estar em processo de acreditação;
- O treinamento para testes em célula única deve ser pelo menos do padrão necessário para testes de rotina em um laboratório de diagnóstico clínico;
- A vestimenta protetora para trabalho com PCR de célula única deve incluir toca cirúrgica (limpa, não estéril, e trocada após cada caso), cobertura para o cabelo e máscara (cobrindo o nariz e a boca) e pró-pé. Luvas devem ser usadas o tempo todo e trocadas com frequência. Estas devem ser justas, por exemplo, de látex, mas não luvas de exame.
- O desenho do fluxo de trabalho deve incluir:
  1. Separação física de laboratórios pré-PCR e pós-PCR e laboratório de biópsia;
  2. Realização do PCR em sala com pressão positiva ou em capela classe II para proteger amostra de contaminações externas;
  3. Quando forem realizadas duas rodadas de PCR, separação física da área de preparação do segundo PCR e das áreas de preparação do primeiro PCR e de análise de produtos de PCR;
  4. Restrição do uso de reagentes e material de consumo em áreas específicas de trabalho;
  5. Tentativa de se realizar fluxo unidirecional pelos funcionários para evitar contaminação;
- Todas as estantes de PCR devem ser descartáveis após um uso ou, para serem reutilizadas, autoclavadas/limpas com 20% água sanitária após cada uso;
- Somente ponteiras certificadas como “DNA, DNase free” devem ser utilizadas para etapas de pré-PCR e PCR;
- Superfícies de trabalho, equipamentos, etc, devem ser limpos com soluções para descontaminação de DNA ou 20% água sanitária antes de cada caso;
- São preferidos equipamento de PCR e material de consumo exclusivos para esses diagnósticos;

## ***Protocolos***

*Lavagem e transferência de células para tubos.* É **recomendado** que os blastômeros sejam lavados pelo menos duas vezes usando uma pipeta de transferência estéril antes de serem transferidos para o tubo de PCR. É **aceitável** transferir blastômeros para tubo com ou sem visualização no microscópio.

*Protocolos de PCR.* Existe uma gama de diferentes técnicas disponíveis para a amplificação por PCR e a análise dos produtos.

- PCR “*nested*” é **aceitável** desde que seja confiável e preciso (Stern et al., 2002);
- PCR fluorescente é **recomendado** ao invés do PCR convencional por seu nível de sensibilidade ser várias ordens de grandeza maior, e uma rodada de PCR fluorescente pode reduzir as chances de contaminação e erro-diagnóstico causados por falhas na transferência entre tubos;
- PCR multiplex é **recomendado** por permitir a amplificação simultânea da mutação e de um marcador ligado ou não, permitindo melhor detecção de ADO e revelando a presença de contaminação. PCR multiplex pode ser feito usando tanto *primers* marcados com fluorescência ou não. Quando forem usados marcadores extragênicos ligados, o risco de recombinação deve ser considerado.

### **Análise do resultado do PCR**

As seguintes **recomendações** são feitas:

- Cada laboratório de diagnóstico deve determinar limites de contaminação, amplificação e ADO antes de realizar o teste em um caso clínico;
- Antes de começar a análise, cada amostra de PCR deve ser claramente identificada e colocada em uma ordem predeterminada e escrita, com controles de DNA e marcadores moleculares sempre presentes na mesma ordem;
- Os resultados da análise do PCR devem estar disponíveis na forma dos dados originais (fotos de géis, cromatogramas, etc) para revisão e controle de qualidade;
- Os resultados devem ser analisados por dois investigadores independentes e discrepâncias devem ser resolvidas por um terceiro investigador (quando possível). Se não se chegar a uma conclusão, o embrião não deve ser transferido, i.e., deve ser dado o diagnóstico de não-interpretável ou inconclusivo.
- Os resultados devem ser revistos e assinados por uma pessoa devidamente qualificada.
- Os resultados devem ser enviados por escritos para a equipe de FIV para garantir a transferência dos embriões corretos.

### **Transferência de embrião**

#### **Método de transferência de embrião**

O meio e o cateter de transferência **aceitáveis** são aqueles utilizados na prática local. **Recomenda-se** que o médico tenha experiência com diferentes tipos de cateteres. Existem varias evidencias de que o uso de ultra-som como guia durante a transferência de embriões aumenta a taxa de gravidez e possivelmente reduz o numero de dificuldades na transferência de embriões (Coroleu et al., 2000; Matorras et al., 2002). O uso de ultra-som como guia na transferência de embriões

é **recomendado** em casos difíceis ou quando se prevê um problema na transferência.

### **Dia da transferência**

**Recomenda-se** transferência de embrião em um dia apropriado de acordo com o tempo necessário para o diagnóstico. Transferência de embriões nos dias 3, 4 (Grifo et al., 1998), 5 ou 6 (Gardner e Lane, 2003) é **aceitável** como em ciclos de FIV de rotina. Atraso da transferência para dias 4, 5 ou 6 também permite mais tempo para a realização do diagnóstico, diminuindo a pressão na equipe científica e facilitando a transferência em períodos normais de funcionamento da clínica de FIV. Como a cultura prolongada de embriões é necessária para o PGD/PGS, é **recomendado** que o laboratório de FIV esteja familiarizado com os procedimentos de cultivo e transferência.

### **Numero de embriões transferidos**

É **recomendado** que o médico e o paciente concordem com o número de embriões a serem transferidos, e que isso seja documentado na forma de consentimento informado antes do procedimento de transferência. O número deve ser decidido baseado na qualidade dos embriões, na idade da mulher, riscos médicos para a mulher associados com possível gestação múltipla, e o número de transferências anteriores. No Brasil, o Conselho Federal de Medicina sugere que, para se evitar múltiplas gestações em FIV de rotina, o máximo de quatro embriões sejam transferidos em casos com prognóstico favorável. De toda forma, a autonomia reprodutiva e liberdade do casal devem ser balanceadas com cuidado pelo bem estar de qualquer criança gerada a partir do tratamento.

### **Seleção de embriões**

Os seguintes critérios pós-biopsia são **recomendados** para facilitar a seleção de embriões: diagnóstico de não-afetado; número de células pré e pós-biopsia; evidência de atividade de divisão celular pós-biopsia; e morfologia do embrião pré e pós-biopsia. É **recomendado** que os critérios de seleção sejam baseados primariamente no diagnóstico de não afetado, e de forma secundaria na morfologia favorável do embrião.

A transferência de embriões portadores/ heterozigotos (de uma doença autossômica recessiva) ou embrião feminino possivelmente portador (de doença ligada ao X) é **aceitável** uma vez que não se espera que a doença se manifeste nesses indivíduos (apesar de que, em alguns testes, pode existir uma maior probabilidade empírica que o embrião seja afetado como resultado de artefatos técnicos). Além disso, em alguns casos pacientes portadores de condições genéticas (especialmente doenças ligadas ao X) podem manifestar formas leves da doença. Cada situação deve ser avaliada com cuidado e discutida extensamente com o casal.

### **Nenhum embrião para transferência**

Após o PGD/PGS, pode não haver nenhum embrião não afetado disponível para transferência. Nesse caso, a transferência de embriões afetados não é **recomendada**. Pacientes que optam pelo PGD/PGS o fazem para evitar a

gravidez de um afetado e a realização de diagnóstico pré-natal, um procedimento invasivo. Porém, quando confrontados com o fato de não terem nenhum embrião não afetado para transferência, casais podem mudar de idéia nesse aspecto.

Ocasionalmente o laboratório de diagnóstico não conseguirá fechar o diagnóstico genético de todos os embriões e pode não haver nenhum embrião não afetado para transferência. A transferência de embriões não diagnosticados não é **recomendada** para PGD de doenças monogênicas. Por outro lado, a transferência de embriões não diagnosticados é **recomendada** para PGS e PGD para aberrações cromossômicas que dêem origem a embriões não viáveis. Se o casal optar pela transferência de embriões não diagnosticados, deve ser oferecida a opção de diagnóstico pré-natal caso a gravidez ocorra. É **aceitável** a equipe médica ser contra a transferência de embriões que possam resultar no nascimento de uma criança afetada. Nesses casos, a equipe deve considerar encaminhar o casal para colegas que estejam preparados para oferecer a transferência desses embriões.

### ***Destino de embriões “normais” não afetados transferíveis***

*Criopreservação de embriões clivados biopsiados.* É **aceitável** criopreservar embriões biopsiados não afetados excedentes já que a possibilidade de criopreservar esses embriões é uma boa opção para maximizar as taxas de gravidez a partir de uma mesma coleta de óvulos. A maior parte das experiências publicadas foram negativas, com baixa sobrevivência pós-descongelamento (Joris et al., 1999; Magli et al., 1999; Ciotti et al., 2000), apesar de modificações recentes no protocolo pós-clivagem parecem melhorar a sobrevivência do embrião pós-descongelamento (Lee e Munné, 2000; Voullaire et al., 2002; Jericho et al., 2003).

*Cultivo estendido até o estágio de blastocisto antes da criopreservação.* Apesar de existir pouca ou nenhuma experiência publicada com a criopreservação de embriões biopsiados cultivados até o estágio de blastocisto, esta prática é **aceitável**.

### ***Destino de embriões afetados***

**Recomenda-se** que um diagnóstico confirmatório seja realizado em embriões afetados não transferidos como parte de procedimentos de controle e certificação de qualidade. Isto é normalmente realizado no embrião total por FISH e no embrião total ou células únicas por PCR.

### ***Destino de embriões não diagnosticados***

**Recomenda-se** que um diagnóstico confirmatório seja realizado em embriões não diagnosticados não transferidos como parte de procedimentos de controle de qualidade, a não ser que o casal opte por transferir estes embriões.

## **Controle de qualidade e certificação de qualidade (CoQ e CeQ)**

### ***Teste de proficiência/ Avaliação externa de qualidade***

Enquanto não existir nenhum mecanismo formal de teste interno/externo de proficiência ou avaliação externa de qualidade para laboratórios de PGD/PGS, **recomenda-se** que um sistema voluntário que possa resolver esse problema seja

implementado, com testes/avaliações de proficiência realizados pelo menos anualmente. CoQ e CeQ internos devem ser procedimentos contínuos.

### ***Avaliação da competência da equipe***

As seguintes **recomendações** são feitas:

- Todos da equipe envolvida nos testes clínicos devem seguir um regime de treinamento documentado que inclui trabalho teórico e treinamento prático em todos os aspectos do trabalho com células únicas;
- A equipe deve ser treinada nos procedimentos por um técnico sênior e deve demonstrar competência antes de poder realizar trabalho clínico sem supervisão;
- Avaliação de competência antes, durante testes clínicos e periodicamente depois disso necessitará avaliação de proficiência em cada tarefa laboratorial utilizando-se critérios desenvolvidos dentro do laboratório.

### ***Protocolos***

*Existência e cumprimento de protocolos de testes clínicos.* São feitas as seguintes **recomendações**:

- O protocolo de teste clínico deve conter instruções explícitas em relação a quais embriões são **aceitáveis** para biópsia, quantas células serão retiradas de cada embrião, resultados resumidos do teste validado, critério de pontuação e procedimentos de relatório, assim como uma base para o aconselhamento dos pacientes de acordo com o resultado do diagnóstico;
- Qualquer desvio dos procedimentos deve ser documentado;
- Se esses desvios ocorrerem com frequência, o laboratório deve considerar modificar o procedimento de acordo com os desvios.

### ***Confirmação do diagnóstico***

As seguintes **recomendações** são feitas:

- A confirmação do diagnóstico deve ser feita em todos os embriões não transferidos ou criopreservados após o diagnóstico para fornecer para os pacientes avaliação de qualidade e taxas atualizadas de erros-diagnóstico;
- As clínicas devem fazer um esforço especial para acompanhar os pais após teste pré-natal e nascimento, especialmente se a realização de teste confirmatório não for possível;
- Deve-se tentar acompanhar gravidezes (incluindo taxas e resultados de gravidezes múltiplas), partos, saúde das crianças no nascimento e após, e manter estes dados junto aos dados do ciclo. Estes dados devem ser utilizados para fins de CoQ/CeQ internos e enviados para centros de coleta de dados, para uso em comparações de clínicas e de métodos de diagnóstico.

### ***Taxas mínimas de gravidez dos centros de FIV para PGD***

A determinação de taxas mínimas de gravidez deve ser responsabilidade de cada clínica. No entanto, é **recomendado** que cada laboratório de FIV compare as taxas de gravidez com PGD/PGS com as taxas de gravidez sem PGD/PGS (FIV de rotina) dentro do centro de FIV.

### ***PGD/PGS satélite***

PGD/PGS satélite é o termo utilizado para representar serviços de FIV realizados em um centro e serviços de diagnóstico específicos para PGD/PGS realizados em outro local e por entidades não-relacionadas. PGD satélite é **aceitável** para triagem de aneuploidias e testes de translocações. Isto requer o transporte de lâminas contendo células fixadas do centro de FIV para o centro de diagnóstico por algum tipo de portador ou serviço de entrega expressa. PGD satélite para testes por PCR de doenças monogênicas é **aceitável** contanto que marcadores adicionais (para detectar contaminações) sejam incluídos para cada gene testado. Isso requer transporte de tubos de PCR contendo células lisadas ou não do centro de FIV para o centro de diagnóstico por algum tipo de portador ou serviço de entrega expressa.

As seguintes **recomendações** são feitas:

- Os centros de FIV e de diagnóstico devem concordar em um conjunto de protocolos clínicos/laboratoriais antes de qualquer amostra clínica ser enviada;
- O centro satélite de diagnóstico deve validar os protocolos de envio de amostras utilizados para assegurar que o transporte das células não compromete a eficiência de amplificação ou hibridização por FISH;
- PGD/PGS satélites devem ter CoQ/CeQ mais rígidos do que aqueles realizados no centro de FIV, com documentação apropriada incluindo procedimentos por escrito de transporte de amostras, envio de resultados, etc;
- Centros que enviem tubos de PCR e/ou lâminas com células fixadas devem ser treinados em biópsia, transferência de células únicas para tubos ou procedimentos de fixação de células de acordo com os procedimentos do centro diagnóstico. Se isto não for possível, o centro satélite deve organizar um embriologista qualificado e treinado para realizar a biópsia e a preparação das células.

### ***Identificação apropriada para testes específicos***

Indicações específicas para PGD/PGS devem ficar a critério de cada clínica.

### ***Taxas de erro-diagnóstico***

É **recomendado** que taxas de erros de diagnóstico sejam calculadas para cada tipo de teste (PCR ou FISH) e para todos os testes de cada clínica. Essas taxas incluem aqueles casos clínicos nos quais aconteceram gravidezes de afetados, e confirmações pós-transferência discordantes do resultado da biópsia. É **recomendado** que essas taxas de erros-diagnósticos fiquem disponíveis para todos os possíveis pacientes quando solicitadas.

### ***Considerações finais***

PGD e PGS são opções de tratamento ainda não regulamentadas e sem padronização quando comparadas com outras formas de testes diagnósticos. As normas acima refletem os usos atuais de PGD/PGS e representam um guia baseado em consensos sobre como melhor realizar PGD/PGS clínico de acordo com a

experiência e dados clínicos. Espera-se que essas normas, se revisadas periodicamente, ajudem a assegurar que pacientes recebam o melhor cuidado possível independentemente do centro no qual forem tratados.