

PRÊMIO NOBEL DE MEDICINA

FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*: MAIS DE 4 MILHÕES DE CRIANÇAS NASCIDAS E UM PRÊMIO NOBEL

IN VITRO FERTILIZATION: MORE THAN 4 MILLION CHILDREN BORN AND A NOBEL PRIZE

Helena von Eye Corleta^{1,2}

RESUMO

Em 1978, nasceu Louise Brown, o primeiro bebê de proveta. Este nascimento histórico foi o resultado de pesquisas do biólogo Robert Edwards e do ginecologista Patrick Steptoe (1). Em 2010, Edwards recebeu o prêmio Nobel de Medicina/Fisiologia, pela importância desta técnica para a humanidade. Este artigo revisa as etapas envolvidas na fertilização *in vitro* (FIV), as dificuldades dos pioneiros, as soluções encontradas e os procedimentos clínicos utilizados atualmente.

Palavras-chave: Fertilização *In vitro*; Prêmio Nobel de Medicina

ABSTRACT

Louise Brown, the first baby conceived by in vitro fertilization (IVF), was born in 1978. This landmark was a result of research conducted by biologist Robert Edwards and gynecologist Patrick Steptoe (1). In 2010, Edwards was awarded the Nobel Prize in Physiology or Medicine in recognition of the importance of IVF to humanity. The objective of the present article is to review the steps involved in IVF, the difficulties faced by pioneers, the solutions found, and the clinical procedures currently employed.

Keywords: In vitro fertilization; Prize in Physiology or Medicine

Rev HCPA 2010;30(4):451-455

Apesar de não ser identificada como uma doença física, a infertilidade tem importante impacto psicológico nos casais afetados. A incidência de infertilidade na população em geral é em torno de 10 a 15% (2,3). Aproximadamente a metade destes casais necessitará alguma forma de reprodução assistida para conceberem. Após trinta anos do nascimento do primeiro bebê de proveta, houve um aumento significativo nas chances de gestação, devido a vários avanços: novos fármacos (indução da ovulação e inibição da hipófise), ultrassonografia transvaginal para monitorização folicular e coleta de óvulos; desenvolvimento na cultura de embriões, doação de óvulos, introdução da injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) para tratamento da infertilidade masculina grave, entre outros. Outras tecnologias desenvolvidas na última década, como o diagnóstico genético pré-implantação e a criopreservação de ovócitos e embriões, aumentaram o escopo de problemas clínicos tratados com procedimentos relacionados à FIV. Apesar de todo este progresso, a maioria dos ciclos de FIV não resulta em bebês em casa, sendo frequente a repetição de ciclos até atingir a gestação.

O QUE É A FERTILIZAÇÃO *IN VITRO*?

O princípio da fertilização *in vitro* (FIV) é simples: coletar um óvulo (ou ovócito) maduro, fertilizá-lo em meio de cultura no laboratório e transferir o embrião resultante para a cavidade uterina, em endométrio receptivo. Após 30 anos de existência da FIV, quase todas as etapas envol-

vidas foram aprimoradas (figura 1).

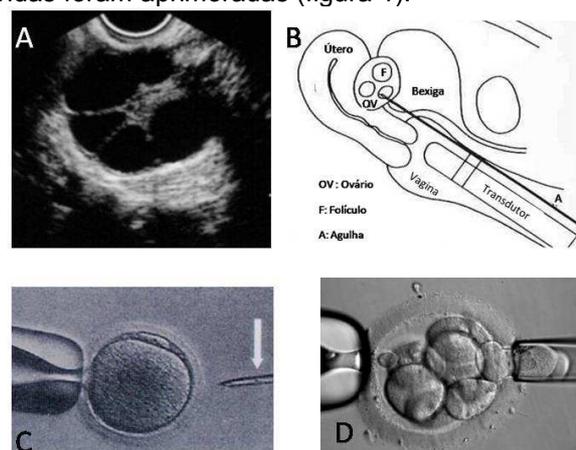


Figura 1 - Progressos da reprodução assistida: A) Imagem ecográfica de múltiplos folículos ovarianos em crescimento devido ao uso de gonadotrofinas, permite o amadurecimento de vários óvulos. B) Coleta de ovócitos por via transvaginal com controle ecográfico, procedimento rápido, de baixo risco e custo substituiu a laparoscopia para coleta de ovócitos. C) Injeção intracitoplasmática de espermatozoides, o espermatozóide (seta branca) é injetado através de uma micropipeta no óvulo. Solucionou quase todos os casos associados a fatores masculinos graves e introduziu a técnica de micromanipulação dos gametas e embriões. D) Biópsia de blastômeros, para diagnóstico genético pré-natal (PGD).

HIPERESTÍMULO OVARIANO

Inicialmente a FIV era realizada no ciclo ovulatório natural, com seleção de apenas um folículo dominante, o óvulo era coletado por punção ovariana laparoscópica. Frequentemente quando a intervenção cirúrgica para coleta do

1. Serviço de Ginecologia e Obstetrícia, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

2. Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS).

Contato: Helena von Eye Corleta. E-mail: hcorleta@gmail.com.br (Porto Alegre, RS, Brasil)

óvulo era realizada, o folículo já havia rompido e o único ovócito era perdido na pelve. O sucesso deste procedimento era limitado. Para aumentar a chance de obtenção de embriões para transferir, o embriologista necessitaria mais óvulos, e o clínico uma maneira de evitar a ovulação prematura (4). Foram surgindo alternativas farmacológicas para a solução deste problema:

Gonadotrofinas: a utilização de gonadotrofinas (FSH e LH) para o recrutamento e seleção de uma coorte de folículos nos ciclos de FIV permite que muitos óvulos amadureçam e sejam coletados (5). No entanto, o aumento dos níveis de estrogênio circulante devido ao crescimento de múltiplos folículos causa pico prematuro de LH (retrocontrole positivo), o que leva a ruptura folicular antes da coleta dos óvulos. Vale ressaltar que o controle do crescimento folicular era realizado por dosagens de estrogênios urinários e não por ecografia transvaginal como é realizado atualmente.

Agonistas/antagonistas do GnRH (GnRH_a): os agonistas do hormônio liberador de gonadotrofinas (GnRH_a) têm papel importante na FIV. Este decapeptídeo foi inicialmente utilizado em dose única, como estimulador potente da secreção de gonadotrofinas. Entretanto, logo ficou evidente que a administração continuada dos agonistas suprime a secreção de LH e FSH. Isto ocorre por inibição e dessensibilização dos receptores hipofisários. Na FIV os agonistas, utilizados de forma continuada, evitam a ocorrência do pico prematuro de LH, prevenindo a ovulação espontânea, o que permite a captação programada de óvulos. Os agonistas do GnRH fazem com que o ovário fique completamente em repouso, sem estímulo de gonadotrofinas endógenas, permitindo a indução da ovulação com gonadotrofinas exógenas de forma planejada. Em outras palavras, o ovário inibido pelo agonista do GnRH reassume a foliculogênese quando se inicia o uso de gonadotrofinas (6).

Nos protocolos de FIV com agonistas do GnRH é imperativo que se utilize gonadotrofina coriônica humana (hCG) ou, mais recentemente, o LH recombinante (LHr), programando a elevação em onda do LH. Este pico programado de LH (hCG ou LHr) é essencial para que o ovócito reinicie a meiose, elimine o primeiro corpo polar e inicie o processo de luteinização folicular, iniciando a preparação do endométrio para implantação. A ruptura folicular e extrusão dos óvulos ocorre exatamente de 34 a 36 horas após a injeção do hCG, permitindo a programação da coleta de óvulos para FIV e evitando que se perca o ciclo por ruptura folicular prematura. Ao final da década de 90 a indústria farmacêutica disponibilizou outra medicação capaz de bloquear o pico de LH prematuro: o antagonista do GnRH. Este fármaco bloqueia o receptor de

GnRH, fazendo com que cesse a secreção de gonadotrofinas, não havendo o efeito de liberação inicial que há com o uso dos agonistas. A duração do tratamento é reduzida, diminui a necessidade de administração de gonadotrofinas e não se verifica os efeitos hipoestrogênicos dos agonistas (6).

Monitorização do crescimento folicular: o crescimento dos folículos durante a indução da ovulação é realizado diariamente ou a cada dois dias por ecografia transvaginal (figura 1). É possível contar o número de folículos em crescimento, medir seus diâmetros e ainda avaliar o crescimento endometrial pela visualização direta. Isto possibilita suspender o ciclo caso estejam crescendo poucos folículos, diminuir ou aumentar a dose de gonadotrofinas e, quando um ou mais folículos atingem aproximadamente 18 mm, programar a administração do hCG para coleta programada de óvulos. Antes da ecografia transvaginal este acompanhamento era feito com dosagem sérica de estradiol ou de seus metabólitos na urina, acarretando punções quase diárias e inúmeras dosagens laboratoriais. Atualmente, na maioria dos serviços, as dosagens hormonais são realizadas apenas quando há risco de hiperestímulo ovariano sendo a monitorização essencialmente ecográfica.

Coleta dos óvulos: no início dos procedimentos de FIV a captação folicular era realizada via laparoscópica (1), com necessidade de anestesia geral. Era um procedimento que consumia tempo e tinha alto custo. No início da década de 1990, a qualidade dos ecógrafos permitiu que a captação dos óvulos fosse realizada por punção transvaginal guiada por ecografia. A punção é realizada em caráter ambulatorial, com a administração de sedação (opioide ou sedativo endovenoso), dura em torno de 15 min. A punção é realizada 34 a 36 h após a injeção do hCG. Coletas mais precoces podem resultar em ovócitos imaturos e, por outro lado, após 36 h pode ter ocorrido a ovulação com perda dos ovócitos (4).

Cada folículo é puncionado sob visualização ecográfica (figura 1), o fluido folicular aspirado em um tubo estéril, aquecido e imediatamente transferido para o laboratório de embriologia, geralmente localizado adjacente à sala de coleta de óvulos. O embriologista identifica o ovócito, remove o complexo ovócito-cúmulos do líquido folicular e o coloca na incubadora em meio de cultura.

No laboratório: no dia da coleta de óvulos o sêmen também precisa ser preparado. Na maioria das vezes, a coleta é feita por masturbação, podem também ser utilizados espermatozoides criopreservados ou ainda retirados diretamente do epidídimo ou do testículo. A amostra

de sêmen é processada no laboratório e os espermatozoides são capacitados *in vitro*. Cada ovócito coletado é separado das células dos cúmulos, por pipetagem, sendo então incubado com o sêmen preparado numa alíquota de aproximadamente 100 mil espermatozoides/óvulo. No caso de ICSI (injeção intracitoplasmática de espermatozoide), um único espermatozoide é injetado em cada óvulo. Após 16 a 19 horas os ovócitos são retirados da estufa e sua fertilização é verificada. Se houve fertilização, dois pró-núcleos (masculino e feminino) são visualizados. Os pré-embriões seguem em cultura por mais 48 a 72 horas. Os embriões no estágio de 4 a 8 células tem sua qualidade avaliada por critérios morfológicos. Os dois “melhores” embriões são selecionados para transferência (4,7). Os embriões excedentes, de boa qualidade, podem ser criopreservados em nitrogênio líquido para futura transferência.

Transferência embriões: dois a três dias após a coleta dos óvulos, mediante um exame especular, a cérvix uterina é exposta, limpa com meio de cultura ou soro fisiológico, o excesso de muco cervical é removido. Um cateter flexível é carregado com os embriões, em aproximadamente 50 µl de meio de cultura, e inserido através do orifício cervical externo, até a metade da cavidade endometrial, onde o meio de cultura contendo os embriões é injetado. Em alguns serviços se realiza a transferência de embriões em fase de blastocisto, isto é possível pelo desenvolvimento de meios de cultura diferenciados que possibilitam o desenvolvimento *in vitro* dos embriões por mais tempo (5 dias) (8). A transferência é um procedimento com impacto no resultado final, deve ser realizada cuidadosamente, evitando o traumatismo da cérvix e do endométrio. O uso da ecografia transvaginal para guiar a transferência pode melhorar as taxas de gestação.

Fase lútea: as medicações utilizadas para evitar a ruptura prematura dos folículos (agonistas/antagonistas) promovem a dessensibilização hipofisária (inibição da secreção de LH) e tem efeito deletério na função do corpo lúteo (produção de progesterona). A função do corpo lúteo pode ser mantida por injeções de hCG, que mimetizam a ação do LH, ou pela administração de progesterona via oral, vaginal ou intramuscular (9).

A implantação embrionária é a etapa com menor avanço nos 30 anos de FIV. Ainda muito pouco se conhece sobre a inter-relação embrião-endométrio e a implantação é o principal determinante do sucesso da FIV/ICSI (4). Após a transferência de dois embriões, a chance de gestação é entre 30 a 40 %.

Doze a quatorze dias após a transferência dos embriões o beta-hCG será positivo em caso

de sucesso, caso contrário a menstruação ocorre.

Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI): a ICSI é uma técnica de micromanipulação que possibilita a inseminação *in vitro* (figura 1), melhorando as taxas de fertilização em casais com fator masculino grave ou com falha de fertilização em tentativa prévia de FIV. A ICSI é indicada para homens com oligoastenoteratospermia grave e para casos de azoospermia com recuperação microcirúrgica ou aspirativa de espermatozoides do epidídimo ou do testículo (10).

A técnica consiste da injeção de um único espermatozóide através de uma micropipeta no citoplasma do óvulo. Foi descrita por Palermo e cols. em Bruxelas no ano de 1992 (11) e foi rapidamente difundida, pois revolucionou o tratamento da infertilidade masculina (10).

QUANDO INDICAR A FIV/ICSI

A FIV foi originalmente utilizada para se obter gestação em pacientes com infertilidade de causa tubária. É lógico que se as trompas não conseguem exercer sua função de captação, nutrição e transporte dos gametas e pré-embriões, este processo deva ser feito fora do corpo (*in vitro*) e os embriões depositados no endométrio através da cérvix, evitando assim o trajeto tubário. As indicações de FIV se ampliaram para causas masculinas graves, principalmente após a ICSI, a infertilidade sem causa aparente e até para anovulação. Atualmente, quando procedimentos mais simples e baratos não resultaram em gestação, a FIV é considerada “a última opção”. Quase todas as causas de infertilidade podem ser tratadas pela FIV, exceto quando não há gametas disponíveis, seja por falência ovariana prematura ou por azoospermia por atrofia testicular (12).

TAXAS DE GESTAÇÃO/RISCOS

A taxa de sucesso da FIV/ICSI deve ser medida pela taxa de bebês em casa após o procedimento. Desfechos intermediários comumente publicados (taxa de implantação (número de sacos gestacionais/número de embriões transferidos), gestações bioquímicas (βhCG positivo) e gestações clínicas (saco gestacional visível em ecografia transvaginal precoce) são importantes para avaliar a qualidade do laboratório e as práticas clínicas da instituição, mas são comumente mal-entendidas pelos usuários.

As taxas de gestação clínica após a FIV/ICSI (saco gestacional à ecografia transvaginal) são de 44 %, e o número de recém-nascidos em casa em torno 27 % dos ciclos com punção de óvulo, segundo dados publicados em 2008 pela Rede Latino-Americana de Reprodu-

ção Assistida (13). Os últimos registros das Sociedades Americana e Européia de Reprodução Assistida relatam dados similares aos da América Latina (30%).

A qualidade do centro de reprodução assistida é importante no resultado da FIV/ICSI, entretanto o fator prognóstico que mais se correlaciona com as taxas de bebê em casa após os tratamentos é a idade da mulher. Nos EUA, em 2008, os nascimentos conforme a idade da mulher/ciclo iniciado são os seguintes: <35 anos = 41,3%, 35-37 anos = 31,1%, 38-40 anos = 22,2%, 41-42 anos = 12,3% e >42 anos = 4,1% (14).

A gestação múltipla é considerada uma complicação da fertilização assistida sendo um importante parâmetro de qualidade de um serviço de reprodução humana. Tendo como base gestações únicas, os gêmeos têm quatro e os trigêmeos oito vezes maior mortalidade perinatal, e significante maior comprometimento neuropsicomotor permanente. A taxa de gemelalidade extrema (≥ 3 embriões) na América Latina ainda está em 8 %, enquanto na América do Norte e Europa é menor do que 2 % dos ciclos de FIV (13,14). Isto se deve ao fato de que na América Latina realiza-se a transferência de mais embriões, na tentativa de aumentar a chance de gestação. A normativa que rege os procedimentos de reprodução assistida no Brasil permite a transferência de até quatro embriões, enquanto na maioria dos países da América do Norte e Europa dois ou apenas um embrião podem ser transferidos.

Outros riscos secundários a FIV/ICSI são bem menos frequentes, entre eles se destacam os acidentes de punção e o hiperestímulo ovariano (4). A forma grave deste último ocorre em 0,5 a 2 % dos ciclos de FIV. É proveniente de uma hiper-resposta ovariana às gonadotrofinas, o que ocasiona aumento importante do ovário acompanhado de ascite, derrame pleural e hemoconcentração. Pode resultar em tromboembolismo arterial e venoso, dificuldade respiratória e infarto do miocárdio. As pacientes mais suscetíveis ao hiperestímulo são jovens e anovuladoras.

PROCEDIMENTOS QUE SE TORNARAM POSSÍVEIS DEVIDO A FIV/ICSI

Diagnóstico genético pré-implantação (PGD)

O desenvolvimento de embriões *in vitro* e a micromanipulação permitiu o acesso às células embrionárias (blastômeros) para análises moleculares por PCR (figura 1). O PGD pode ser usado para impedir a transmissão de doenças genéticas autossômicas dominantes (doença de Huntington, distrofia miotônica), autossômicas recessivas (fibrose cística, talassemia) e desor-

dens ligadas ao cromossoma X (hemofilia, X-frágil) (7,15).

A aneuploidia é a anormalidade no número de cromossomas em células individuais. Mulheres com mais de 35 anos tem altas taxas de embriões com aneuploidia, associada a falhas de implantação na FIV. A hibridização fluorescente *in situ* (FISH) em blastômeros dos pré-embriões antes da transferência pode detectar as aneuploidias, evitando a transferência dos embriões comprometidos. Entretanto, ensaios clínicos randomizados não demonstraram aumento das taxas de gestação após este procedimento em mulheres com mais de 35 anos.

A possibilidade de determinar o antígeno de histocompatibilidade (HLA) em blastômeros permite a seleção e transferência apenas de embriões com o HLA desejado. Isto tem sido indicado, em alguns países, para “gerar” doadores de sangue de cordão ou medula, para irmão ou parente com doença grave. Questões éticas importantes estão envolvidas em quase todos os procedimentos que envolvem seleção embrionária (4).

Congelamento de embriões e óvulos

A indução da ovulação na FIV proporciona a coleta e fertilização de múltiplos óvulos e frequentemente a formação de embriões excedentes. Houve evolução das técnicas de congelamento de embriões para posterior transferência e, atualmente, as taxas de nascimento após transferência de embriões congelados são de 16% na América Latina e de 26% na América do Norte (13,14).

Nos últimos anos o número de embriões congelados em todo o mundo aumentou significativamente. Várias e diferentes questões éticas principalmente quanto ao destino dos embriões congelados existem nos países em que esta técnica é permitida. Acredita-se que no Brasil existam em torno de 25.000 embriões congelados. Pela legislação brasileira, os embriões que não vão ser utilizados pelos genitores, não podem ser descartados, havendo duas destinações possíveis: a doação dos embriões congelados excedentes para pesquisa com células-tronco ou para outro casal infértil, de forma anônima.

O congelamento de óvulos demorou mais tempo para ser uma realidade. Apenas a partir de 2006, estabeleceu-se a vitrificação de óvulos, uma forma de congelamento ultra-rápido, que evita a formação de cristais dentro do citoplasma. Esta técnica consegue ser reproduzida na maioria das clínicas e oferece boas chances de recuperação e fertilização dos óvulos após o descongelamento, com taxas aceitáveis de gestação. Quando o número de óvulos é muito grande ou se o casal, por questões éticas ou religiosas, não deseja congelar embriões, são

fertilizados menos óvulos e os excedentes podem ser congelados (7,16).

CONCLUSÃO

O nascimento de Louise Brown revolucionou o tratamento da infertilidade. Após 30 anos o tratamento está mais eficaz, simples e seguro. O entendimento do processo de implantação embrionária é o desafio para o futuro. A transferência de apenas um embrião com altas taxas de gestação evitaria a gestação múltipla e a morbimortalidade a ela associada.

REFERÊNCIAS

1. Steptoe PC, Edwards RG. Birth after the reimplantation of a human embryo. *Lancet*. 1978;2(8085):366.
2. Boivin J, Bunting L, Collins JA, Nygren KG. International estimates of infertility prevalence and treatment-seeking: potential need and demand for infertility medical care. *Hum Reprod*. 2007;22(6):1506-12.
3. Wilkes S, Chinn DJ, Murdoch A, Rubin G. Epidemiology and management of infertility: a population-based study in UK primary care. *Fam Pract*. 2009;26(4):269-74.
4. Pauli SA, Berga SL, Shang W, Session DR. Current Status of the Approach to Assisted Reproduction. *Pediatric Clinics of North America*. 2009;56(3):467-88.
5. Gonadotropin preparations: past, present, and future perspectives. *Fertil Steril*. 2008;90(5 Suppl):S13-20.
6. Tarlatzis BC, Kolibianakis EM. GnRH agonists vs antagonists. *Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology*. 2007;21(1):57-65.
7. El-Toukhy T, Khalaf Y, Braude P. IVF results: optimize not maximize. *Am J Obstet Gynecol*. 2006;194(2):322-31.
8. Blastocyst culture and transfer in clinical-assisted reproduction. *Fertil Steril*. 2008;90(5 Suppl):S174-7.
9. Hubayter ZR, Muasher SJ. Luteal supplementation in in vitro fertilization: more questions than answers. *Fertility and Sterility*. 2008;89(4):749-58.
10. Devroey P, Van Steirteghem A. A review of ten years experience of ICSI. *Hum Reprod Update*. 2004;10(1):19-28.
11. Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem AC. Pregnancies after intracytoplasmic injection of single spermatozoon into an oocyte. *Lancet*. 1992;340(8810):17-8.
12. Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems. National Collaborating Centre for Women's and Children's Health. *Fertility: assessment and treatment for people with fertility problems*. London: RCOG Press; 2004 Feb. 216 p. [1151 references] http://www.guideline.gov/summary/summary.aspx?doc_id=4807&nbr=003469&string=fertility acesso novembro 2009. [database on the Internet]. Available from: http://www.guideline.gov/summary/summary.aspx?doc_id=4807&nbr=003469&string=fertility.
13. Registro Latinoamericano de Reproducción Asistida. In: Zegers-Hochschild FS, J.E ; Galdames. V., editor. Chile: Registro Latinoamericano de Reproducción Asistida; 2008.
14. Clinic Summary Report 2010 [cited 2010 11/2010]; Available from: https://www.sartcorsonline.com/rptCSR_PublicMulYear.aspx?ClinicPKID=0.
15. Preimplantation genetic testing: a Practice Committee opinion. *Fertil Steril*. 2008;90(5 Suppl):S136-43.
16. Ovarian tissue and oocyte cryopreservation. *Fertil Steril*. 2008;90(5 Suppl):S241-6.

Recebido: 12/11/2010

Aceito: 24/11/2010