

## DECLARAÇÃO SOBRE ESTUDOS GENÉTICOS NA INFERTILIDADE

*Foi solicitada a opinião do Conselho Nacional de Procriação Medicamente Assistida (CNPMA) acerca da necessidade de fazer constar da lista de exames complementares de diagnóstico que podem ser prescritos nas Unidades de Saúde os exames genéticos necessários para a correcta orientação clínica de muitos casais em situação de infertilidade, nomeadamente, os cariótipos, o estudo da fragmentação do ADN dos espermatozóides e estudo cromossómico dos espermatozóides por FISH.*

*Dada a relevância da situação em causa, apesar de bem saber que a questão ultrapassa as suas competências, antes se inserindo na gestão do Serviço Nacional de Saúde, o Conselho aceitou discutir essa temática.*

*Na verdade, na sua dimensão gestionária, trata-se apenas de determinar quem é que no âmbito do sistema nacional de saúde é competente para validar uma decisão médica que aconselha a realização de exames genéticos como meios complementares de diagnóstico de infertilidade.*

*Todavia, a sua manifesta ligação com as questões do direito de acesso à procriação medicamente assistida justifica a atenção do CNPMA, ao abrigo da sua competência genérica de pronúncia sobre as "questões éticas, sociais e legais da PMA" (v. art.º 30º/1 da Lei nº 32/2006, de 26 de Julho).*

*Efectivamente, a importância desta questão decorre, desde logo, do seu impacto negativo na qualidade da prestação de cuidados de saúde aos utentes, a saber:*

- *No plano organizativo, obrigando os utentes a andar de consulta em consulta para obter um resultado de natureza burocrática: obter uma credencial administrativa que autorize a realização de determinados exames complementares de diagnóstico;*
- *No plano financeiro, provocando a realização de despesas excepcionais com deslocações desnecessárias, porque evitáveis;*
- *No plano económico, com a perda do rendimento de dias de trabalho;*



- *No **plano social**, com os incómodos que provoca e com o aumento dos sentimentos de ineficácia do sistema que estimula;*
- *No **plano jurídico** por dificultar, de forma passível de juízos de censura jurídico-constitucional, o direito de acesso aos cuidados de saúde, especialmente à procriação assistida.*

*Para além disso, a necessidade da tomada de posição por parte do CNPMA decorre também dos impactos negativos que a situação pode ter no funcionamento do Serviço Nacional de Saúde, a saber:*

- *De **natureza operacional**, consequentes da sobrecarga de trabalho nas consultas de infertilidade dos Hospitais;*
- *De **natureza financeira**, na medida em que a sobrecarga de trabalho nas consultas agrava os custos de funcionamento do sistema;*
- *De **natureza burocrática**, na medida em que essa sobrecarga de trabalho e de encargos não se traduz em qualquer mais-valia na prestação dos cuidados médicos aos utentes.*

**Nessa conformidade e unicamente com os objectivos supra enunciados, o CNPMA solicita que sejam tomadas as medidas que permitam ultrapassar rápida e eficazmente esta dificuldade, tendo para o efeito aprovado a seguinte Declaração:**

O conhecimento das situações de origem genética - génica e cromossómica - que produzem infertilidade e, sobretudo, a capacidade de as interpretar correctamente, é de importância indiscutível para uma prática médica correcta. Isto porque, ao contrário das outras inúmeras causas de infertilidade resultantes da acção nefasta de agentes biológicos, químicos ou físicos e cujo combate, em regra, terá uma tradução positiva em termos individuais e de espécie, a infertilidade de causa genética poderá constituir um mecanismo biológico automático de

eliminação de genes ou cromossomas anómalos pelo que a hipótese da sua resolução deve ser exaustivamente analisada e ponderada.

Os êxitos e os fracassos reprodutivos da espécie humana estão também intimamente relacionados com a constituição cromossómica dos produtos de concepção. Múltiplos trabalhos têm demonstrado a importância das anomalias cromossómicas na infertilidade, nomeadamente de causa masculina, embora nem sempre haja acordo quanto à incidência destas anomalias, o que resulta fundamentalmente dos diferentes critérios usados na selecção dos doentes estudados. Um estudo realizado no Serviço de Genética da Faculdade de Medicina da Universidade do Porto (FMUP) revelou, em 404 homens inférteis, anomalias cromossómicas de número em 3,2% dos doentes (S. Klinefelter: 2,5%, 47,XYY: 0,7%) e anomalias cromossómicas de estrutura em 3,0% (translocações robertsoneanas: 1,7%, translocações recíprocas: 0,5%, inversões pericêntricas: 0,7%). Este estudo mostrou também a associação entre a frequência das anomalias cromossómicas e a concentração de espermatozóides, sendo a frequência das cromossomopatias tanto maior quanto menor é o número de espermatozóides (na azoospermia: 15,1%; com concentrações inferiores a 10 milhões/ml: 8,0%; com concentrações iguais ou superiores a 10 milhões/ml: 2,0%).

Se esta diferença da frequência de anomalias cromossómicas permite esperar com maior probabilidade uma anomalia cromossómica nos azoospermicos e oligozoospermicos, por outro lado demonstra que o homem infértil, mesmo que normozoospermico, terá uma probabilidade pelo menos 3-4 vezes superior à esperada na população geral de possuir uma cromossomopatia (incidência das cromossomopatias na população geral: 0,5-0,7%).

Estas observações permitem afirmar que a indicação correcta para realizar o cariótipo é a infertilidade masculina e não qualquer dos parâmetros definidos no espermograma.

No entanto, a indicação da realização do cariótipo de linfócitos de alta resolução deve assumir um carácter ainda mais abrangente, isto é, não apenas nos homens inférteis mas em ambos os membros do casal quando há abortamentos espontâneos de repetição (dois ou mais) ou quando vão ser submetidos a um tratamento de procriação medicamente assistida (PMA). De



facto, está descrita uma frequência de anomalias cromossómicas significativamente maior (cerca de 5 a 10 vezes) nos casais inférteis relativamente à população geral. Com base neste conhecimento consolidado, várias sociedades científicas internacionais publicaram guidelines que recomendam a realização do cariótipo a ambos os membros dos casais candidatos à realização de qualquer técnica de PMA.

O estudo do cariótipo do casal infértil, para além de poder fazer um diagnóstico etiológico da infertilidade, poderá proporcionar elementos muito importantes para a definição prognóstica e orientação terapêutica (que pode incluir a contra-indicação para a realização da PMA com os gâmetas de um dos membros do casal, por exemplo, no caso de uma translocação recíproca entre cromossomas homólogos).

O estudo cromossómico dos espermatozóides por FISH (Fluorescence In Situ Hybridization), ao permitir determinar o número de alguns cromossomas (em regra, o 13, 18, 21, X e Y), está indicado na avaliação dos portadores de anomalias cromossómicas de estrutura, nos casos de bloqueio embrionário ou de um aumento de aneuploidias embrionárias observados no decurso da fertilização in vitro (FIV) ou da microinjecção intracitoplasmática de um espermatozóide (ICSI), na infertilidade idiopática de longa duração (superior a 3 anos), nos casos de 2 ou mais insucessos de FIV ou ICSI e nas situações de abortamentos de repetição de causa idiopática.

A eficácia procriativa dos espermatozóides poderá estar também dependente da percentagem de fragmentação do seu DNA.

O estudo da fragmentação do ADN dos espermatozóides estará indicado nas situações de varicocele, terapêutica prévia com quimio e/ou radioterapia, infertilidade idiopática de longa duração (superior a 3 anos), nos casos de 2 ou mais insucessos de FIV ou ICSI e nos abortamentos de repetição de causa idiopática.

A pesquisa de microdelecções do cromossoma Y (em Yq11: regiões AZFa, AZFb e AZFc), realizada em 3002 homens inférteis, no Serviço de Genética da FMUP, revelou a presença de

microdelecções em 8,7% das azoospermias secretoras e em 4,7% das oligozoospermias com um número de espermatozóides inferior a 1 milhão/ml. Não foram detectadas microdelecções nestas regiões em doentes com um número de espermatozóides igual ou superior a 1 milhão/ml. As microdelecções em AZFc são as mais frequentemente diagnosticadas (86%), podendo ser encontradas isoladamente ou em associação com as microdelecções em AZFb.

As microdelecções em AZFa são as menos frequentes (cerca de 6% das delecções) e a respectiva histologia testicular tem revelado uma ausência completa de células germinativas (Sertoli cell-only syndrome).

No caso das microdelecções em AZFb tem sido observado um bloqueio da espermatogénese, anterior ou durante a meiose (paragem da maturação), mas a biopsia testicular, com retirada de múltiplos fragmentos, tem uma probabilidade de obtenção de espermátides ou espermatozóides na ordem dos 40%.

As microdelecções em AZFc (à partida, as de melhor prognóstico) não podem ser associadas com uma interrupção numa fase específica da espermatogénese. De facto, há uma grande variabilidade na expressão fenotípica testicular - desde uma ausência completa de células germinativas até uma espermatogénese completa com espermatozóides presentes no ejaculado. Esta variação da expressão fenotípica ocorre de indivíduo para indivíduo mas também pode acontecer no mesmo indivíduo ao longo do tempo, com uma evolução negativa partindo de um número normal de espermatozóides ou de uma oligozoospermia até hipoplasia, paragem da maturação ou ausência completa de células germinativas. Este conhecimento permite entender a importância de um diagnóstico precoce desta microdelecção: para um tratamento precoce e para uma eventual criopreservação profilática dos espermatozóides em azoto líquido.

A microinjecção intracitoplasmática, possibilitando o sucesso reprodutivo aos portadores de uma microdelecção em AZFb ou AZFc, tem como consequência a transmissão da microdelecção aos descendentes masculinos (pela respectiva transmissão do cromossoma Y).

A expressão da microdelecção pode ser variável, estando descritos alguns casos de uma

microdelecção maior nos filhos do que nos progenitores – o que é indicador de uma expansão da microdelecção. Em consequência, a consulta de aconselhamento genético é absolutamente indispensável.

Em conclusão, as indicações consensuais (porque outras têm sido pontualmente sugeridas) para o estudo molecular do cromossoma Y são a azoospermia secretora e a oligozoospermia grave (número de espermatozoides inferior a 1 milhão/ml).

No primeiro patamar dos estudos genéticos criteriosamente realizáveis deverá estar também o estudo do gene da Fibrose Cística (Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator - CFTR). A fibrose cística (FC) é a doença autossómica recessiva mais frequente nas populações caucasianas (1:2500), sendo que 4% (1:25) dos indivíduos são portadores assintomáticos de uma mutação do gene referido. O CFTR está localizado no cromossoma 7, tendo sido descritas mais de 1500 mutações distribuídas ao longo de todo o gene. Mais de 95% dos homens com fibrose cística apresentam azoospermia obstrutiva resultante da ausência congénita bilateral dos canais deferentes (CBAVD). Por outro lado, as mutações do gene CFTR são também a principal causa de CBAVD em homens inférteis sem qualquer outra manifestação clínica de FC. Ao contrário do descrito para a FC (causada pela presença de duas mutações graves nos dois alelos), a CBAVD é causada pela presença de uma mutação grave num alelo e de uma moderada no outro alelo ou pela existência de duas mutações moderadas nos dois alelos.

As mutações no gene CFTR podem também estar na base da ausência congénita unilateral dos canais deferentes, da obstrução idiopática do epidídimo e da obstrução bilateral dos canais ejaculadores com concomitantes anomalias das vesículas seminais.

O estudo molecular da fibrose cística, a realizar nas situações de azoospermia obstrutiva em que tenham sido excluídas outras causas (traumática, infecciosa, iatrogénica, etc.), tem a óbvia importância do esclarecimento etiológico mas também assume um grande relevo profilático, pois o diagnóstico de uma mutação no marido deve levar à realização do estudo molecular da FC no cônjuge antes de iniciar o ciclo de microinjecção intracitoplasmática. No caso de a mulher ser também portadora de uma mutação, o risco de terem um filho com FC será de 25%

(de 50% se o marido for portador da mutação em homozigotia ou de duas mutações graves diferentes), pelo que, no âmbito global do aconselhamento genético, o casal deverá ser esclarecido sobre a possibilidade de realização do respectivo diagnóstico genético pré-implantação e/ou de diagnóstico pré-natal.

O diagnóstico genético pré-implantação (DGPI) é um método muito precoce de diagnóstico pré-natal para os casais com um elevado risco de transmissão de patologia génica ou cromossómica, tendo como objectivo a transferência de embriões geneticamente normais no que respeita à patologia estudada. Esta selecção embrionária in vitro poderá eliminar a necessidade de uma futura interrupção de gravidez.

As metodologias possíveis são a biopsia do 1.º e 2.º glóbulos polares (possibilita o despiste de mutações ou aneuploidias maternas; tem a vantagem de ser eticamente mais aceitável para muitos, já que não intervém sobre o embrião, mas tem vários inconvenientes pois não permite diagnosticar doenças autossómicas dominantes transmitidas pelo homem, não-disjunções cromossómicas paternas, mosaicismos ou o sexo do embrião e, nas doenças autossómicas recessivas, apenas se transferirão 50% dos embriões e não 75%), a biopsia de blastocistos (permitirá retirar até cerca de 10 células da trofoectoderme mas tem limitações: apenas cerca de 40-50% dos embriões chegam a blastocisto e o material genético pode divergir geneticamente da massa celular interna, de onde resultará o feto) e a biopsia de uma ou duas células (blastómeros) de embriões no seu terceiro dia de desenvolvimento (número total de células variável entre 6 e 12).

As indicações principais do DGPI são: doenças génicas, diagnóstico de aneussomias quando um dos progenitores é portador de uma translocação recíproca ou robertsoneana, identificação do sexo nos casos de doenças génicas ligadas ao cromossoma X (em que ainda não é possível a identificação do gene), o diagnóstico de aneuploidias e a prevenção da recorrência da doença neoplásica do trofoblasto.

A insuficiência ovárica prematura, definida como o fim da função ovárica antes dos 40 anos, ocorre em cerca de 1% das mulheres. A etiologia não é identificada na maioria das doentes

mas tem sido considerado que até cerca de 30% dos casos resultarão de uma causa genética, nomeadamente associada ao síndrome do X-frágil, doença ligada ao cromossoma X, causada pela ausência da fragile X mental retardation protein (FMRP). Habitualmente, esta ausência da FMRP resulta da expansão da repetição de trinucleotídeos que ocorre no promotor do gene e que conduzirá a um processo de hipermetilação que torna o gene inactivo. Nos casos normais, há menos de 50 destas repetições (CGG); os alelos com cerca de 55-200 repetições são classificados de pré-mutações, enquanto que a mutação completa ( $\geq 200$  repetições) causará o síndrome do X-frágil. Alguns dos aspectos importantes relativos à pré-mutação dizem respeito à sua definição, estabilidade da repetição durante a transmissão meiótica e à probabilidade da sua expansão para uma mutação completa. A repetição mais pequena até hoje descrita que se expandiu, numa geração, para a mutação completa, é de 59 CGGs; em consequência, a fronteira da normalidade e da pré-mutação é geralmente considerada à volta dos 55 CGGs.

Durante muitos anos pensou-se que as portadoras de pré-mutações não revelariam quaisquer anomalias fenotípicas; todavia, há uma evidência crescente de que a pré-mutação X-frágil é um factor de risco significativo para a insuficiência ovárica prematura, o que tem óbvias implicações no aconselhamento genético, pessoal e familiar, e salienta a importância do estudo molecular do X-frágil.

Alterações citogenéticas envolvendo o braço longo do cromossoma X, concretamente Xq13-q21 e Xq26-q28, têm também sido associadas à insuficiência ovárica prematura, pelo que, também nesta entidade patológica, está indicada a realização do cariótipo de linfócitos de alta resolução.

## CONCLUSÃO

Os meios complementares de diagnóstico que devem ser criteriosamente considerados no estudo etiológico de uma infertilidade ou a realizar antes da procriação medicamente assistida (ou durante, no caso do diagnóstico genético pré-implantação) incluem uma ou mais das

análises genéticas seguintes, em função da avaliação da situação clínica concreta, individual ou do casal.

As indicações que se apresentam constituem uma orientação geral para a realização dos respectivos exames genéticos mas o pedido destes não deverá ser feito de forma automatizada mas sim em obediência a critérios rigorosos de avaliação clínica e laboratorial:

#### **Cariótipo de linfócitos de alta resolução**

- infertilidade de causa masculina
- abortamentos espontâneos de repetição ( $\geq 2$ )
- antes da procriação medicamente assistida

#### **Estudo molecular do cromossoma Y**

- azoospermia secretora
- oligozoospermia grave (número de espermatozóides inferior a 1 milhão/ml)

#### **Estudo molecular da fibrose cística**

- azoospermia obstrutiva (quando excluídas as causas traumáticas, infecciosas, iatrogénicas, etc.)

#### **Estudo da fragmentação do ADN dos espermatozóides**

- varicocele
- terapêutica prévia com quimio e/ou radioterapia
- infertilidade idiopática de longa duração (superior a 3 anos)
- 2 ou mais insucessos de FIV ou ICSI
- abortamentos de repetição de causa idiopática

#### **Estudo cromossómico dos espermatozóides por FISH**

- avaliação dos portadores de anomalias cromossómicas de estrutura



- casos de bloqueio embrionário ou de um aumento de aneuploidias embrionárias observados no decurso da FIV ou da ICSI
- infertilidade idiopática de longa duração (superior a 3 anos)
- casos de 2 ou mais insucessos de FIV ou ICSI
- abortamentos de repetição de causa idiopática

#### **Estudo cromossómico ou molecular dos blastómeros ou dos glóbulos polares**

- doenças génicas
- diagnóstico de aneussomias quando um dos progenitores é portador de uma translocação recíproca ou robertsoneana
- identificação do sexo nos casos de doenças génicas ligadas ao cromossoma X (em que ainda não é possível a identificação do gene)
- diagnóstico de aneuploidias
- prevenção da recorrência da doença neoplásica do trofoblasto

#### **Estudo molecular do X-frágil**

- insuficiência ovárica prematura

10 de Setembro, 2010