



ELSEVIER

Reprodução & Climatério

<http://www.sbrh.org.br/revista>

Artigo de revisão

Biópsia embrionária: qual a melhor escolha?☆

Aleister Crowley de Aquino^{a,*}, Ana Carolina Nogueira Martinhago^b
e Ciro Dresch Martinhago^b^a Complexo Médico Penal, Pinhais, Paraná, PR, Brasil^b Chromosome Medicina Genômica, São Paulo, SP, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 4 de março de 2014

Aceito em 15 de junho de 2014

On-line em 7 de julho de 2014

Palavras-chave:

Biópsia

Blastocisto

Fase de clivagem do zigoto

Óvulo

Técnicas reprodutivas

R E S U M O

Introdução: a biópsia embrionária tem como objetivo selecionar embriões geneticamente normais. Essa seleção ocorre por meio de testes genéticos pré-implantacionais. Espera-se, com isso, uma diminuição dos riscos de doenças genéticas e um aumento das taxas de implantação em fertilização *in vitro*.

Objetivo: verificar, por meio de revisão bibliográfica, qual técnica de biópsia embrionária é considerada mais apropriada para feitura de testes genéticos pré-implantacionais.

Método: pesquisa bibliográfica, na forma de revisão de publicações científicas, por meio das redes US National Library of Medicine (Pubmed), Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs), Google Acadêmico e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS).

Resultados e conclusão: existem três maneiras de efetuar a biópsia para reprodução humana assistida. A primeira consiste em retirar o primeiro e/ou o segundo corpúsculo polar estruído pelo oócito. Também se pode fazer a biópsia a partir de um blastômero do embrião em estágio de clivagem ou usar cinco a dez células do trofoectoderma de blastocisto. Normalmente as técnicas usadas para o diagnóstico são PCR, Fish, CGH array e SNP array, entre outras. Acredita-se que a biópsia de blastocistos é a melhor técnica para manter o potencial de implantação embrionária. Essa tendência se justifica por causa da maior quantidade de material genético disponível em fase avançada de desenvolvimento embrionário. Admite-se que nessa fase a incidência de mosaïcismo seja menor em relação à biópsia de blastômeros, com conseqüente aumento na eficácia dos testes genéticos. Outra questão importante é que na biópsia de blastocistos as células são retiradas do trofoectoderma, enquanto que na biópsia em estágio de clivagem a remoção de um blastômero pode prejudicar o desenvolvimento embrionário.

© 2014 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de [CC BY-NC-ND](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

☆ Trabalho desenvolvido no Instituto de Educação e Pesquisa Sapientiae, São Paulo, SP, Brasil.

* Autor para correspondência.

E-mail: aleister.aquino@gmail.com (A.C. de Aquino).<http://dx.doi.org/10.1016/j.recli.2014.06.001>1413-2087 © 2014 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda. Este é um artigo Open Access sob a licença de [CC BY-NC-ND](http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/)

Embryo biopsy: what is the best choice?

A B S T R A C T

Keywords:

Biopsy
Blastocyst
Ovum cleavage stage
Ovum
Reproductive techniques

Introduction: the embryo biopsy aims to select genetically normal embryos. This selection occurs through pre-implantation genetic testing. It is expected the reduction of risk of genetic disorders and increase implantation rates in IVF.

Objective: to verify, through bibliographical revision, which embryo biopsy technique is considered more suitable for pre-implantation genetic diagnosis.

Method: bibliographical research, in the form of literary review of scientific publications via networks, US National Library of Medicine (Pubmed), Latin-American Literature and Caribbean Health Sciences (Lilacs), Google Scholar and Virtual Health Library.

Results and conclusion: there are three ways to perform the biopsy on assisted human reproduction. The first one consists in removing the 1st and/or 2nd polar body (if there was fertilization). You can also perform the biopsy from the one blastomere of embryo cleavage stage or use 5-10 trophoctoderm cells blastocyst. Usually the techniques used for diagnostic purpose are PCR, Fish, CGH array, SNP array and others. Nowadays it is believed that blastocyst biopsy is the best technique in order to maintain the embryonic implantation. This tendency is justified by the larger amount of genetic material available in an advanced stage of embryonic development. It is assumed that in this stage the incidence of mosaicism is reduced with the consequent increase in the effectiveness of genetic testing. Another important question is that the blastocyst biopsy cells are removed from the trophoctoderm while in biopsy in cleavage stage, the removal of one blastomere can impair embryonic development.

© 2014 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Published by Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de [CC BY-NC-ND](#)

Introdução

As técnicas de biópsia usadas em fertilização *in vitro* (FIV) visam a obter material para a feitura de testes genéticos pré-implantacionais. Para tanto, podem ser usados oócitos ou embriões humanos, os quais terão sua composição genética avaliada a fim de escolher um embrião ou oócito cromossomicamente normal.¹

Em 1990, foi aplicado pela primeira vez em seres humanos, com sucesso, o diagnóstico genético pré-implantacional (PGD) para doença relacionada ao cromossomo X.² Desde então, essa técnica passou a ser usada para análise do conteúdo genético em embriões humanos obtidos por meio de FIV para selecionar aqueles que tivessem um melhor potencial para gerar uma prole saudável.³

O PGD é uma avaliação para selecionar embriões geneticamente normais de pais afetados. Já o screening genético pré-implantacional (PGS) é um teste de triagem para aneuploidias usado em embriões cujos pais têm cariótipos normais.¹ Seu principal objetivo é selecionar embriões cromossomicamente normais para transferência e, com isso, melhorar as taxas de implantação e gravidez clínica e reduzir taxas de abortos e evitar gestações aneuploides.⁴

A biópsia para testes genéticos pré-implantacionais pode ocorrer de três maneiras. A primeira acontece por meio da remoção do primeiro corpúsculo polar (CP) ou após a fertilização, com o uso do segundo CP ou ambos. A segunda é a partir da biópsia de um blastômero no estágio de clivagem. A terceira ocorre pela retirada de células do trofoectoderma (TE) de blastocistos no quinto dia de desenvolvimento. Assim,

conforme a biópsia de escolha haverá alteração do material biológico a ser usado para extração de DNA.⁵⁻⁸

Os blastômeros do terceiro dia de desenvolvimento de embriões humanos obtidos por meio de FIV são considerados células totipotentes, cada uma com potencial para se transformar em um novo embrião. Já no quarto dia de desenvolvimento, as células mais externas do embrião darão origem ao TE, enquanto que os blastômeros internos vão se diferenciar na massa celular interna (MCI), que são células consideradas pluripotentes.⁹

Para efetuar os procedimentos de biópsias é necessário o rompimento da zona pelúcida (ZP) do oócito ou embrião. Normalmente, usa-se um laser para causar esse enfraquecimento e, logo após, ocorre extração mecânica das células.¹ O diâmetro do pulso de laser parece não interferir no desenvolvimento embrionário até a fase de blastocisto¹⁰ e, pela sua praticidade, ele é cada vez mais usado em todas as fases de biópsias embrionárias para testes genéticos pré-implantacionais.⁷ Também pode ser usada a solução ácida de Tyrode ou feita mecanicamente a abertura da ZP.¹¹ Não foram verificadas diferenças nas taxas de gravidez com o uso do laser ou da solução ácida de Tyrode.¹²

A técnica de PGD é feita por meio de hibridização fluorescente *in situ* (Fish), que analisa entre cinco a dez cromossomos de uma célula biopsiada do embrião em estágio de clivagem.¹³ É a técnica usada em 90% de todos os ciclos de PGD relatados.¹⁴ Entretanto, são inegáveis as dificuldades operacionais de se fazer Fish além das limitadas informações que se conseguem por esse meio.^{5,13,15} Para uma análise genética mais ampla, tem-se a hibridização genômica comparativa de arranjo (CGH array). Ela permite a análise dos 22 cromossomos autossomos

além dos dois sexuais e admite um melhor resultado em relação à Fish.^{5,13,15,16}

O arranjo polimórfico de nucleotídeo único (SNP array) também é usado em testes genéticos pré-implantacionais e demonstra ser mais eficiente do que o CGH array.¹⁷⁻¹⁹ Outro método opcional de análise cromossômica é a reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real, multiplex (Real Time qPCR Multiplex). Essa tecnologia tem a vantagem de obtenção dos resultados em até quatro horas, o que possibilita a feitura da biópsia de TE e a transferência no mesmo ciclo. A desvantagem é que não é possível fazer análises com apenas uma célula.²⁰

A avaliação morfológica oocitária, muito usada como forma de escolher o melhor ócito a ser fertilizado, acaba por rejeitar aqueles com imaturidade nuclear, degenerações significativas ou anormalidades grosseiras e, assim, insemina a maioria dos oócitos em metáfase II (MII), apenas com base em seu aspecto morfológico.²¹ Após a fertilização, a morfologia também contribui muito na escolha do embrião a ser transferido e melhora consideravelmente as taxas de implantação. Entretanto, não deve ser usada como único meio de seleção, pois mais de 70% dos embriões oriundos de FIV falham ao implantar.¹⁹

Acredita-se que a alta taxa de abortos espontâneos em reprodução humana assistida (RHA) ocorra por causa das aneuploidias. No entanto, foi observado que o desenvolvimento morfológico normal do embrião não tem necessariamente relação com a euploidia.^{22,23}

A biópsia do embrião humano deve ser considerada como o equilíbrio entre a retirada de células para uma análise genética segura e eficiente somada à preservação do potencial de implantação do embrião.²⁴ É de fundamental importância o conhecimento das características das amostras para que as análises feitas sejam adequadas.²⁵ Independentemente dos testes genéticos pré-implantacionais usados, será necessário obter DNA por meio de algum método de biópsia.²⁶

Uma das questões de grande interesse nos centros de RHA é qual o melhor momento de fazer a biópsia embrionária. Deve-se manter o embrião em cultivo até o quinto ou sexto dia de desenvolvimento para efetuar a biópsia de blastocistos? Sabe-se que hoje existe uma tendência de acreditar que a biópsia de blastocistos é mais eficiente e causa menos riscos à integridade e ao desenvolvimento embrionário subsequente.

Dessa forma, o objetivo deste estudo é verificar, por meio de revisão bibliográfica, qual técnica de biópsia embrionária é considerada mais apropriada para feitura de testes genéticos pré-implantacionais. Para tanto, foram considerados os benefícios proporcionados e a viabilidade embrionária subsequente. Como objetivo específico, comparou-se a biópsia em estágio de clivagem com a biópsia em estágio de blastocistos.

Método

Pesquisa bibliográfica, na forma de revisão de publicações científicas, por meio das redes US National Library of Medicine (Pubmed), Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde (Lilacs), Google Acadêmico e Biblioteca Virtual em Saúde (BVS). Não houve limite de tempo nas pesquisas feitas, mas foram privilegiadas publicações dos últimos

cinco anos. Foram pesquisados artigos em língua inglesa e portuguesa. As palavras-chave pesquisadas foram: biópsia; corpúsculos polares; blastômeros e trofoectoderma.

Biópsia de corpúsculos polares

Quando se fala em biópsia de corpúsculos polares (CP), tem-se uma possibilidade importante para não afetar a integridade embrionária.²⁷ O uso da biópsia de CP pode ser uma opção interessante para países que não permitem a biópsia embrionária, como, por exemplo, a Alemanha e a Suíça.^{6,28} Por meio dessa técnica é possível prever o genótipo materno dos embriões, de maneira indireta, já que os CP são subprodutos da meiose feminina.^{6,29}

Quando ocorre a indução da ovulação, os oócitos recuperados, em sua maioria, estão em M II, o que é caracterizado pela presença do primeiro CP, quando ocorre a primeira divisão meiótica. Logo após a fertilização, haverá a extrusão do segundo CP e o número de cromossomos será reduzido pela metade, ou seja, 23.¹¹

Para a feitura da biópsia de CP é necessário o acesso ao espaço perivitelinico do ócito através de uma abertura na ZP, que pode ser feita de forma química, mecânica ou a laser. A retirada do primeiro e do segundo CP pode ocorrer de maneira sequencial ou simultânea.⁷ O primeiro CP pode ser removido de 36 a 42 horas após a administração do hormônio coriônico gonadotrófico (hCG). Já a remoção simultânea deve acontecer entre nove e 22 horas após a inseminação. Porém, no limite desse intervalo o primeiro CP pode ter degenerado.²⁸ Nesse caso, pode haver dificuldade de distinguir o primeiro CP do segundo, o que torna preferível a feitura sequencial da biópsia.²⁶ Não é aconselhável o uso de solução de ácido Tyrode ou laser para a remoção do primeiro CP antes da fertilização, pois pode haver efeitos negativos ao fuso meiótico.²⁸

A análise dos resultados é um fator crucial para a biópsia de CP. Existem dois tipos fundamentais de erros que ocorrem na meiose I materna: não disjunção e separação prematura das cromátides irmãs (PSSC). Significa que para cada par de cromossomos existem cinco resultados únicos que podem ocorrer durante a meiose I: normal, não disjunção com perda ou ganho e PSSC com perda ou ganho. Assumindo-se que não há outros erros na meiose II, existem sete resultados possíveis no momento em que a meiose materna é completa. Isso se reflete na existência de dois resultados possíveis na meiose II após PSSC na meiose I.²⁶

Note-se que a não disjunção na meiose I resulta em erros recíprocos, no primeiro e no segundo CP. No entanto, com PSSC, erros recíprocos indicam que o erro na meiose I foi corrigido na meiose II. Assim, os erros recíprocos idênticos encontrados na análise do primeiro e do segundo CP não são interpretáveis, porque não é possível prever se eles refletem não disjunção (que resulta em aneuploidia) ou PSSC com correção (que resulta em euploidia).²⁶

Um estudo de 2012 de Levin et al.³⁰ sugeriu que a biópsia de CP pode ser prejudicial ao desenvolvimento embrionário por causa do aumento das taxas de fragmentação e diminuição da velocidade de clivagem. Essas alterações, segundo os autores, ocasionaram número de blastômeros reduzidos em relação aos embriões usados como controle. Porém, este estudo não avaliou taxas de implantação e ainda acredita-se que a

remoção dos CP, a partir de oócitos MII e oócitos fertilizados, causa poucos efeitos negativos sobre o desenvolvimento embrionário.^{1,25,26,29,30}

Geraedts et al.³¹ demonstraram em 2011, em estudo-piloto, que a análise de ambos CP pode ser feita em até 12 horas para PGS, por meio de CGH array.³¹ No entanto, sabe-se que a biópsia de ambos os CP consegue detectar aproximadamente 75% de possíveis erros cromossômicos. Essa limitação se deve a que tais erros podem ocorrer em diversos estágios do desenvolvimento embrionário.²⁶

Apesar de a biópsia de CP ser considerada menos invasiva, não é possível detectar defeitos derivados paternos.^{5,27} Por causa desses fatores, é importante que estejam disponíveis técnicas de biópsia de blastômeros e biópsia de TE, para que sejam evitadas transferências de embriões afetados em casos mais complexos.²⁹ No entanto, acredita-se que até 90% das aneuploidias têm origem materna e em países em que não são permitidas análises em embriões a biópsia de CP é eticamente aceita.^{5,31}

Kuliev e Rechitsky²⁹ publicaram em 2001 estudo em que foram feitos 938 ciclos de PGD para 146 tipos de doenças monogênicas mendelianas, por meio de 9.036 oócitos biopsiados e analisados por PCR multiplex. Desses, 1.578 geraram embriões saudáveis e foram transferidos em 790 ciclos. Essas transferências resultaram em 329 gravidezes e 345 nascimentos. Apesar de ter usado biópsia de blastômeros ou de blastocistos em 701 dos embriões transferidos, os autores concluem que o PGD de CP pode ser seguro e confiável.²⁹

Geraedts et al.³¹ fizeram em 2011 estudo de prova de princípio em dois centros de RHA para determinar a confiabilidade de biópsia de CP com o uso de CGH microarray para análises de CPI e CPII, em um tempo máximo de 12 horas. Os CP foram analisados separadamente para todos os cromossomos e aqueles diagnosticados aneuploides tiveram seus respectivos embriões biopsiados para análise de concordância. As biópsias foram feitas entre seis e nove horas após a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI). A remoção dos CP ocorreu de forma simultânea e as análises foram feitas separadamente.³¹

Participaram deste estudo 41 pacientes de FIV com idade média de 40 anos. Dos 226 zigotos, 225 obtiveram sucesso na biópsia de ambos os CP. Quase 80% dos ciclos foram concluídos em até 12 horas. Os demais necessitaram de uma hora a mais de análise. Dos 195 casos, a taxa de aneuploidia diagnosticada foi de 72% (140) e de euploidia de 28% (55). Foram feitos 43 ciclos e em 19 não houve embriões euploides para transferência. A taxa de implantação por embriões transferidos foi de 26% (10/39), gravidez clínica de 19% (8/42) por ciclo e 33% (8/24) por transferência e taxa de gravidez em curso de 17% (7/42) por ciclo e 29% (7/24) por transferência.³¹

Ficaram disponíveis para a análise de concordância 177 zigotos que não foram transferidos. Porém, por causa de fatores como contaminação e falha de processo, obtiveram-se resultados em 138 pares de CP e, desses, 130 (94%) foram concordantes e oito (6%) discordantes. Dos oito casos, sete tinham diagnósticos aneuploides e o zigoto euploide, enquanto que em um os CP eram euploides e o zigoto era aneuploide. Os autores concluem que biópsia de CP para análise por CGH microarray pode obter resultados confiáveis em tempo oportuno para transferência no mesmo ciclo de FIV.³¹

Biópsia de blastômeros

Desde o início do PGD, a biópsia de blastômeros no terceiro dia de desenvolvimento é a abordagem mais usada.^{5,6,11,32,33} Ela ocorre por meio da extração de um único blastômero^{11,33} e pode ser usada para doenças monogênicas, doenças ligadas ao sexo, translocações cromossômicas balanceadas e tipagens de antígeno leucocitário humano (HLA).^{6,7} Podem ser analisadas tanto alterações cromossômicas paternas quanto maternas e os resultados são alcançados ainda em tempo para transferência no quinto ou sexto dia de desenvolvimento, sem que haja necessidade de criopreservação do embrião.^{7,26}

Para a retirada do blastômero, o rompimento da ZP normalmente ocorre no terceiro dia de desenvolvimento. Porém, isso pode variar conforme a clínica e também de acordo com cada caso. Normalmente, o meio de cultivo usado para a biópsia é livre de cálcio e magnésio e a extração do blastômero ocorre por aspiração.²⁸

A técnica de Fish associada à biópsia de blastômeros foi, até recentemente, considerada como a melhor opção para PGS. Muitos trabalhos com fracas evidências de melhorias nos resultados de RHA foram publicados.³¹ No entanto, nos últimos tempos, diversos ensaios clínicos demonstraram que não houve avanços nos resultados com essa técnica e em alguns casos foi constatado declínio.³⁴⁻³⁶

Masterbroek et al.³³ fizeram em 2007 estudo randomizado, multicêntrico, duplo cego controlado, para comparar ciclos de FIV com PGS com uso de biópsia de blastômeros e sem PGS (grupo controle), em mulheres de 35 a 41 anos. Participaram 206 mulheres no grupo que fez PGS e 202 do grupo controle. Foram feitos 836 ciclos de FIV. No grupo controle, os embriões foram escolhidos por meio do seu aspecto morfológico e no grupo de PGS a escolha foi baseada tanto nos resultados das análises genéticas quanto na morfologia. Foram transferidos apenas os embriões considerados euploides para os cromossomos testados. A biópsia foi feita no terceiro dia de desenvolvimento e oito cromossomos foram analisados mediante Fish. Os embriões que continham quatro ou mais blastômeros foram biopsiados. Cada ciclo teve dois embriões transferidos.³³

O grupo que fez o rastreamento genético pré-implantacional teve uma taxa de gravidez em curso significativamente menor do que o grupo controle (25% × 37%, respectivamente) e taxa de nascidos vivos inferior (24% × 35%, respectivamente). Os autores sugerem que a redução nas taxas de nascidos vivos e de gravidezes em curso no grupo de mulheres que foram submetidas ao PGS pode ter sido causada pela biópsia de blastômeros, o que afetaria o potencial de implantação desses embriões.³³

Deve-se também levar em consideração a incidência relativamente alta da separação cromossômica anômala por causa de falhas na clivagem. Essas falhas muitas vezes resultam em mosaicismos cromossômicos, de modo que a retirada de um blastômero, por meio de biópsia, pode não ser representativa para todo o embrião.^{4,5,33} Acredita-se que 40% a 60% dos embriões no estágio de clivagem sejam mosaicos²⁸ e que, nessa fase, o mosaicismos é maior em relação aos embriões do quinto dia de desenvolvimento.^{6,18}

Outro fator importante é a possibilidade de autocorreção do embrião, que parece acontecer de maneira mais intensa

no estágio de clivagem. Essa autocorreção pode causar o descarte de embriões considerados aneuploides no terceiro dia de desenvolvimento, mas eles poderiam, por algum mecanismo de correção, se tornar euploides já na fase de blastocistos.^{37,38}

Mertzaniidou et al.³ em 20012 analisaram 14 embriões criopreservados de nove pacientes de FIV por meio de ICSI que obtiveram partos saudáveis e verificaram taxa de aneuploidias e incidência de mosaicismo em embriões de boa qualidade. Os embriões foram criopreservados no segundo dia de desenvolvimento e, após o descongelamento, ficaram incubados durante aproximadamente 12 horas. Logo após foram retirados da incubadora por 24 horas. Em seguida, removeu-se a ZP e os blastômeros foram desagregados. Obtiveram-se 91 blastômeros para estudo, os quais foram analisados por arranjo de hibridização genômica comparativa (CGH array).³

O PGS mostrou que em dez dos 14 embriões biopsiados (71,4%) foram diagnosticados mosaicos com alta taxa de aneuploidias, ainda que nenhum dos embriões apresentasse o mesmo padrão de aneuploidia em todas as células. Já quatro de 14 (28,6%) eram uniformemente diploides. Foram analisados 70 blastômeros, dos quais 39 eram diploides (55,7%). Desses blastômeros, cinco tinham aberrações estruturais (7,1%) e 31 traziam anormalidades numéricas (44,3%). Esses resultados demonstraram uma elevada taxa de aneuploidias em embriões de boa qualidade no estágio de clivagem. Os autores sugerem que alguns dos embriões mosaicos podem ter potencial de implante e que, por meio de mecanismos de autocorreção, possa haver a diminuição das células aneuploides nos estágios de clivagem, mórula ou blastocisto.³

Biópsia de blastocistos

Nos últimos anos, a biópsia de blastocistos tem sido amplamente usada porque, assim como a de blastômeros, permite fazer análises genéticas maternas e paternas.⁵ Essa técnica só foi viável após a melhoria no processo de cultivo de embriões *in vitro*. Ela tem uma clara vantagem em relação às outras técnicas, pois fornece maior quantidade de células para a análise genética, além de os estudos sugerirem um menor dano ao embrião.^{7,39}

Para que ocorra a retirada das células do TE é necessário que seja feita uma abertura na ZP do embrião, que pode ser no terceiro dia de desenvolvimento ou na mesma manhã em que for feita a biópsia, conforme protocolo de cada clínica. Após as células trofoectodérmicas herniarem pela abertura da ZP, sua remoção pode ser feita por uso do *laser* nos pontos de contato celular ou excisão mecânica.²⁸

Com o aumento na tendência de aneuploidia embrionária, por causa da idade materna avançada, somado aos decepcionantes resultados clínicos com biópsia em estágio de clivagem e Fish para PGD e à limitada capacidade de análise cromossômica que Fish tem, a biópsia de TE, associada às novas tecnologias de análises genéticas (CGH array, SNP array), está se tornando uma realidade em RHA. O aperfeiçoamento dos processos de vitrificação de blastocistos também foi fundamental para o sucesso da biópsia de TE, pois muitas clínicas não têm laboratórios de genética anexos, o que pode tornar fundamental a criopreservação para transferências em ciclos posteriores.

Schoolcraft et al.³⁶ por meio de estudo clínico feito em 2009, avaliaram análise cromossômica completa por meio de biópsia de TE e CGH. Foram submetidos à biópsia de TE 45 pacientes inférteis com idade superior a 35 anos. Para controle, usaram-se 113 pacientes clinicamente semelhantes que fizeram transferência embrionária de blastocistos. Dasquelas pacientes que fizeram PGS, foram biopsiados 287 embriões e 269 foram diagnosticados (93,7%). A taxa de aneuploidia foi de 51,3%. Em ciclo subsequente, 90 embriões biopsiados e diagnosticados euploides foram descongelados e transferidos. Desse grupo, a taxa de implantação foi de 72,2% (65/90) e de batimento cardíaco fetal de 68,9% (62/90) e no grupo controle, de 46,5% (139/299) e 44,8% (134/299), respectivamente. Os autores sugerem que a biópsia de blastocistos e CGH pode ser muito promissora para melhorar as taxas de sucesso em FIV.³⁶

Schoolcraft et al.,¹⁹ em outro estudo feito em 2011, combinaram biópsia de TE, vitrificação de blastocistos e SNP microarray em mulheres com idade materna avançada, abortos de repetição e falhas recorrentes de implantação. Foram feitas 100 transferências de 130 ciclos feitos por 127 pacientes. A taxa de nascidos vivos foi de 71% para uma média de 1,78 embrião transferido por ciclo. A percentagem de embriões diagnosticados euploides foi de 47,4% (356/751). Esses resultados sugerem que essas técnicas associadas podem contribuir muito para PGS em pacientes com as características mencionadas no estudo.¹⁹

Yang et al.,¹⁸ em estudo piloto randomizado feito em 2012, associaram a técnica de biópsia de blastocistos para feitura de CGH array com transferência única de embriões. Para isso, usaram uma população de pacientes com bom prognóstico de FIV: idade inferior a 35 anos, cariótipo normal e sem histórico de abortos recorrentes. As pacientes foram separadas em dois grupos. No grupo A (n=55) os embriões foram escolhidos por meio da morfologia e PGS por CGH array. No grupo B (n=48) foi usada apenas a morfologia para a escolha do melhor embrião a ser transferido. Todas as pacientes receberam apenas um blastocisto cada e os embriões foram transferidos no sexto dia de desenvolvimento. A taxa de gravidez clínica foi significativamente maior no grupo em que foi usada a biópsia de blastocistos e morfologia em comparação com o grupo que usou apenas a morfologia (70,9% e 45,8%, respectivamente). Além desses dados, foi observada taxa de 44,9% de aneuploidias no grupo dos blastocistos analisados por CGH array.¹⁸

Biópsia de blastocistos x biópsia de blastômeros

Um estudo piloto com 20 casais portadores de betatalassemia, publicado por Kokkali et al. em 2007,⁴⁰ comparou a biópsia de blastômeros (grupo A) do terceiro dia de desenvolvimento (um blastômero biopsiado) e transferência no quinto dia com a biópsia de TE (grupo B) no quinto dia de desenvolvimento (quatro a cinco células) e transferência no sexto dia, para detecção de betatalassemia por meio de PCR multiplex em tempo real. Esse estudo incluiu 10 ciclos para cada grupo.⁴⁰

No grupo A foram fertilizados 131 oócitos e conseguiram-se 101 embriões adequados para retirada de um blastômero, dos quais foi possível analisar 76 (75,2%) e 30 blastocistos não afetados foram transferidos. Esse grupo obteve como resultado

seis gravidezes e oito batimentos cardíacos fetais, com taxa de implantação de 26,7%. Já o grupo B obteve 128 oócitos fertilizados. Desses, 53 alcançaram o estágio de blastocistos, dos quais 50 foram analisados (94,3%) e 21 blastocistos não afetados foram transferidos, e geraram seis gravidezes e dez batimentos cardíacos fetais, com taxa de implantação de 47,6%. No entanto, as taxas de desenvolvimento embrionário foram semelhantes tanto para biópsia de blastômeros (50,4%) quanto para a de blastocistos (46,9%).⁴⁰

Em trabalho publicado em 2009 por Zhang et al.,⁴¹ embriões criopreservados de oócitos anormalmente fertilizados foram aleatoriamente alocados para biópsia e grupo controle. Após o descongelamento, os embriões que foram biopsiados em estágio de clivagem e criopreservados tiveram uma taxa de sobrevivência significativamente menor do que a do grupo controle de clivagem (não biopsiados), 64% e 92%, respectivamente. Na fase de mórula, não houve diferenças entre aqueles que sofreram biópsias e o grupo controle. Já os embriões descongelados, que estavam na fase de blastocisto e foram biopsiados, tiveram uma taxa de sobrevivência de 95,6% contra 81,3% do grupo controle ($p=0,035$).⁴¹

Os autores sugerem que a vitrificação em estágio de desenvolvimento embrionário mais avançado pode ser benéfica por causa da maior exposição ao crioprotetor da blastocelule expandida.⁴¹ Entretanto, em 2013 foi relatado por Scott et al.²⁶ que a biópsia de blastômeros pode causar efeitos prejudiciais aos embriões e, portanto, pode ajudar a explicar os resultados inferiores que se obtiveram com a criopreservação e o consequente descongelamento dos embriões biopsiados no estágio de clivagem.²⁶

Um ensaio clínico emparelhado randomizado, feito em 2013 por Scott et al.,³² teve como objetivo verificar se a biópsia no estágio de clivagem ou a biópsia de blastocistos afeta a competência reprodutiva embrionária. Foram selecionados casais inférteis com idade da mulher inferior a 35 anos. Em cada ciclo de FIV, foram selecionados dois embriões para transferência e entre os dois selecionados um foi submetido à biópsia e o outro usado como controle, de forma aleatória. A decisão de manter os embriões até o quinto dia de desenvolvimento e fazer a biópsia de TE ou a de blastômeros foi tomada conforme protocolos da clínica. Os resultados das biópsias não foram revelados antes da transferência embrionária. A partir da biópsia e da técnica de SNP array, foi possível comparar o DNA do conceito com o DNA das biópsias feitas. Em caso de ocorrer gravidez gemelar ou falha no ciclo, os resultados entre os embriões biopsiados e controles foram considerados semelhantes e quando houve gravidez única, foi possível saber se o embrião que gerara o conceito foi o que sofreu a biópsia ou o embrião controle.³²

Participaram desse estudo 116 pacientes, 46 foram submetidas à transferência com embrião em estágio de clivagem e 70 no estágio de blastocistos e três não completaram o estudo. Na biópsia de blastômeros e na referente interpretação das análises, obteve-se êxito nas 46 pacientes. Já na biópsia de blastocistos aconteceu uma falha de amplificação e duas pacientes descontinuaram o tratamento, com total de 67 pacientes. A morfologia de ambos os grupos não apresentou diferenças significativas. Dos resultados, 12 das pacientes que receberam os embriões no estágio de clivagem obtiveram gravidez gemelar, para 21 pacientes não houve sucesso na

implantação e em 13 pacientes ocorreu gravidez única. Dessas 13 pacientes, apenas uma gravidez foi oriunda de embrião biopsiado. As outras 12 resultaram dos embriões controles.³²

No total, 14 embriões biopsiados no terceiro dia de desenvolvimento implantaram (30,4%), contra 23 embriões não biopsiados implantados (50%). Essa diminuição significativa nas taxas de implantação (19,6%) ou a redução relativa de 39,1% nas probabilidades de implantação embrionária, segundo os autores, representa o risco de se fazer a biópsia de embriões no estágio de clivagem. Já no grupo da biópsia de blastocistos, dos 67 pares de embriões, 27 pacientes obtiveram gravidez múltipla, 24 não engravidaram e 16 conseguiram gestação única. Sete foram de embriões que passaram por biópsia de TE e nove daqueles embriões não biopsiados (controle).³²

Quando levados em consideração todos os embriões transferidos, 34 biopsiados (51%) e 36 não biopsiados (54%) resultaram em nascimentos. Essa diferença de 3% não foi considerada significativa. Os autores concluem que os resultados encontrados são forte indicativo de que a biópsia de terceiro dia é prejudicial e diminui as taxas de implantação e que a biópsia de blastocistos não demonstra efeito adverso ao embrião, ao menos até a concepção.

Discussão

Os diferentes tipos de biópsia usados em RHA são imprescindíveis para o uso das diversas tecnologias de testes genéticos pré-implantacionais. No entanto, torna-se necessário compreender as diferenças de cada uma para fazer a melhor escolha. A biópsia de CP tem grande vantagem em países onde não é possível biopsiar embriões por causa dos regulamentos vigentes.^{5,28} Ela também é considerada menos invasiva do que as demais, por não necessitar de células de embriões e permitir tempo hábil para transferência de embriões no mesmo ciclo.²⁶

A biópsia de CP parece não ser prejudicial ao desenvolvimento embrionário,^{1,7,26,29} mas não há consenso sobre sua segurança para o embrião. Seu valor preditivo das aneuploidias está abaixo das demais biópsias para RHA, o que, em alguns casos, torna necessária a confirmação do diagnóstico por testes adicionais.²⁹ Também não se consegue verificar erros genéticos derivados do gameta masculino^{5,27} nem possíveis falhas nas primeiras clivagens.³¹ Outro fator desfavorável é a escassez de material disponível. Segundo Capalbo et al.,⁸ uma em cada dez biópsias de CP permanece inconclusiva por falha de diagnóstico em ao menos um dos CP. Além do mais, nem todos os oócitos biopsiados têm potencial para chegar ao estágio embrionário, o que ocasiona gastos desnecessários aos pacientes.

A biópsia de blastômeros ainda é a técnica mais usada por muitos centros de RHA e certamente aumentou as possibilidades de casais afetados por alguma doença monogênica virem a ter filhos normais.³² Uma das grandes discussões acerca do assunto é se a biópsia de blastômeros no terceiro dia de desenvolvimento pode ser prejudicial ao embrião. Diversos ensaios clínicos randomizados não demonstraram melhoria nas taxas de nascidos vivos em relação aos grupos controles e possíveis danos ao desenvolvimento subsequente.³⁴⁻³⁶ Esse

quadro pode ser explicado, em parte, por erro de técnica, o que pode ocasionar o descarte de embriões viáveis por diagnósticos inconclusivos ou errôneos. Ou pela falta de experiência de fazer a biópsia, o que afeta seu potencial de implantação e as limitações inerentes à própria técnica de Fish, que não analisa todos os cromossomos.²⁰ Além dessas possíveis adversidades, o trabalho de Scott et al.³² demonstrou que a retirada de um blastômero realmente prejudica o potencial de implantação do embrião. Nesse mesmo trabalho, a biópsia de TE não evidenciou tais efeitos. Os resultados obtidos vão ao encontro da tendência atual de optar pela biópsia de blastocistos.³²

Outro aspecto de grande relevância é a alta taxa de mosaicismos cromossômico no estágio de clivagem, que pode causar um aumento de resultados falso-positivos e falso-negativos, o que parece ser menor em blastocistos,²⁸ pois, apesar de não estar bem esclarecido, acredita-se que um embrião diagnosticado com mosaicismos ou aneuploidia na fase de clivagem possa autocorrigir e gerar um blastocisto cromossomicamente normal.³⁶ Deve-se considerar a necessidade de criopreservação de blastocistos biopsiados para transferência em ciclo posterior, situação normalmente ocasionada pela dificuldade dos laboratórios de genética de entregar os resultados das análises em tempo hábil. Entretanto, foi demonstrado que a criopreservação de embriões em estágio de blastocistos não diminui as taxas de sucesso em FIV.^{19,36}

Apesar das vantagens da biópsia de blastocistos, vale salientar que em casos de idade materna avançada pode haver um menor número de oócitos em relação às demais pacientes e, conseqüentemente, menos embriões disponíveis. Esse fato pode favorecer a transferência no terceiro dia de desenvolvimento e evitar prolongar o cultivo embrionário e não ter embriões para transferência, já que nem todos os embriões que chegam ao terceiro dia atingirão a fase de blastocistos em laboratório.

Conclusão

Os dados levantados neste estudo sugerem que com a evolução dos testes genéticos pré-implantacionais e a necessidade de melhores resultados em RHA, a biópsia de blastocistos é a melhor escolha do momento. Com essa técnica aplicada à PGD/PGS é possível uma ampla análise genética do embrião. Ela também não demonstra ter efeitos negativos no potencial de implantação, como ocorre com a biópsia de blastômeros, que oferece maior quantidade de DNA e aperfeiçoa as análises.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

- Brezina PR, Brezina DS, Kearns WG. Preimplantation genetic testing. *BMJ*. 2012;18:e5908, 345.
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*. 1990;344:768-70.
- Mertzanidou A, Wilton L, Cheng J, Spits C, Vanneste E, Moreau Y, et al. Microarray analysis reveals abnormal chromosomal complements in over 70% of 14 normally developing human embryos. *Hum Reprod*. 2013;28:256-64.
- Christopikou D, Tsorva E, Economou K. Polar body analysis by array comparative genomic hybridization accurately predicts aneuploidies of maternal meiotic origin in cleavagel stage embryos of women of advanced maternal age. *Hum Reprod*. 2013;28:1426-34.
- Chang LJ, Chen SU, Tsai YY, Hung CC, Fang MY, Su YN, et al. An update of preimplantation genetic diagnosis in gene diseases, chromosomal translocation, and aneuploidy screening. *Clin Exp Reprod Med*. 2011;38:126-34.
- Ly KD, Agarwal A, Nagy ZP. Preimplantation genetic screening: does it help or hinder IVF treatment and what is the role of the embryo? *J Assist Reprod Genet*. 2011;28:833-49.
- Xu K, Montag M. New perspectives on embryo biopsy: not how, but when and why? *Semin Reprod Med*. 2012;30:259-66.
- Capalbo A, Bono S, Spizzichino L, Biricik A, Baldi M, Colamaria S, et al. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres, and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. *Hum Reprod*. 2013;28:509-18.
- Galan A, Diaz-Gimeno P, Poo ME, Valbuena D, Sanchez E, Ruiz V, et al. Defining the genomic signature of totipotency and pluripotency during early human development. *PLoS One*. 2013;8:e62135.
- Taylor TH, Gilchrist JW, Hallowell SV, Hanshew KK, Orris JJ, Glassner MJ, et al. The effects of different laser pulse lengths on the embryo biopsy procedure and embryo development to the blastocyst stage. *J Assist Reprod Genet*. 2010;27:66377.
- Wolff P, Martinhago CD, Ueno J. Diagnóstico genético pré-implantacional: uma ferramenta importante para a rotina de fertilização in vitro? *Femina*. 2009;37:297-303.
- Joris H, De Vos A, Janssens R, Devroey P, Liebaers I, Van Steirteghem A. Comparison of the results of human embryo biopsy and outcome of PGD after zona drilling using acid Tyrode medium or a laser. *Hum Reprod*. 2003;18:1896-902.
- Lee MJ, Lee RK, Lin MH, Hwu YM. Cleavage speed and implantation potential of early-cleavage embryos in IVF or ICSI cycles. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29:745-50.
- Harper JC, Coonen E, De Rycke M, Harton G, Moutou C, Pehlivan T, et al. ESHRE PGD Consortium data collection X: cycles from January to December 2007 with pregnancy follow-up to October 2008. *Hum Reprod*. 2010;25:2685-707.
- Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S, Biricik A, Kokkali G, Rienzi L, et al. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod*. 2011;26:1925-35.
- Tao X, Su J, Pepe R, Northrop LE, Ferry KM, Treff NR. PGD for monogenic disease by direct mutation analysis alone in 2 or more cells is more reliable than multiple marker analysis in single cells. *Fertil Steril*. 2011;96:S21.
- Treff NR, Su J, Tao X, Levy B, Scott RT. Accurate single cell 24 chromosome aneuploidy screening using whole genome amplification and single nucleotide polymorphism microarrays. *Fertil Steril*. 2010;94:2017-21.
- Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet*. 2012;5:24.
- Schoolcraft WB, Treff NR, Stevens JM, Ferry K, Katz-Jaffe M, Scott RT. Live birth outcome with trophectoderm biopsy, blastocyst vitrification, and single-nucleotide polymorphism

- microarray-based comprehensive chromosome screening in infertile patients. *Fertil Steril*. 2011;96:638–40.
20. Handyside AH. 24-chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies. *fertil steril*. 2013;100:595–602.
 21. Gianaroli L, Racowsky C, Geraedts J, Cedars M, Makrigiannakis A, Lobo RA. Best practices of ASRM and ESHRE: a journey through reproductive medicine. *Fertil Steril*. 2012;98:1380–94.
 22. Fragouli E, Lenzi M, Ross R, Katz-Jaffe M, Schoolcraft WB, Wells D. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Hum Reprod*. 2008;23:2596–608.
 23. Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutiérrez-Mateo C, Schoolcraft WB, et al. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril*. 2011;95:520–4.
 24. De Vos A, Staessen C, De Rycke M, Verpoest W, Haentjens P, Devroey P, et al. Impact of cleavage-stage embryo biopsy in view of PGD on human blastocyst implantation: a prospective cohort of single embryo transfers. *Hum Reprod*. 2009;24:2988–96.
 25. Xu K, Montag M. New perspectives on embryo biopsy: not how, but when and why? *Semin Reprod Med*. 2012;30:259666.
 26. Scott KL, Hong KH, Scott RT. Selecting the optimal time to perform biopsy for preimplantation genetic testing. *Fertil Steril*. 2013;100:608–14.
 27. Magli MC, Gianaroli L, Ferraretti AP, Toschi M, Esposito F, Fasolino MC. The combination of polar body and embryo biopsy does not affect embryo viability. *Hum Reprod*. 2004;19:1163–9.
 28. Harton GL, Magli MC, Lundin K, Montag M, Lemmen J, Harper JC, ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group. Best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS). *Hum Reprod*. 2011;26:41–6.
 29. Kuliev A, Rechitsky S. Polar body-based preimplantation genetic diagnosis for Mendelian disorders. *Mol Hum Reprod*. 2011;17:275–85.
 30. Levin I, Almog B, Shwartz T, Gold V, Ben-Yosef D, Shaubi M, et al. Effects of laser polar-body biopsy on embryo quality. *Fertil Steril*. 2012;97:1085–8.
 31. Geraedts J, Montag M, Magli MC, Repping S, Handyside A, Staessen C, et al. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results *Hum Reprod*. 2011;26:3173–80.
 32. Scott RT, Upham KM, Forman EJ, Zhao T, Treff NR. Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial. *Fertil Steril*. 2013;100:624–30.
 33. Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *N Engl J Med*. 2007;357:9–17.
 34. Debrock S, Melotte C, Spiessens C, Peeraer K, Vanneste E, Meeuwis L, et al. Preimplantation genetic screening for aneuploidy of embryos after in vitro fertilization in women aged at least 35 years: a prospective randomized trial. *Fertil Steril*. 2010;93:364–73.
 35. Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjö T, Nilsson L, Stevic J, et al. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum Reprod*. 2008;23:2806–12.
 36. Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG, Stevens J, Rawlins M, Munne S. Preimplantation aneuploidy testing for infertile patients of advanced maternal age: a randomized prospective trial. *Fertil Steril*. 2009;92:157–62.
 37. Scott RT, Treff NR, Stevens J, Forman EJ, Hong KH, Katz-Jaffe MG, et al. Delivery of a chromosomally normal child from an oocyte with reciprocal aneuploid polar bodies. *J Assist Reprod Genet*. 2012;29:533–7.
 38. Barbash-Hazan S, Frumkin T, Malcov M, Yaron Y, Cohen T, Azem F, et al. Preimplantation aneuploid embryos undergo self-correction in correlation with their developmental potential. *Fertil Steril*. 2009;92:890–6.
 39. Schoolcraft WB, Katz-Jaffe MG. Comprehensive chromosome screening of trophoctoderm with vitrification facilitates elective single-embryo transfer for infertile women with advanced maternal age. *Fertil Steril*. 2013;100:615–9.
 40. Kokkali G, Traeger-Synodinos J, Vrettou C, Stavrou D, Jones GM, Cram DS, et al. Blastocyst biopsy versus cleavage stage biopsy and blastocyst transfer for preimplantation genetic diagnosis of beta-thalassaemia: a pilot study. *Hum Reprod*. 2007;22:1443–9.
 41. Zhang X, Trokoudes KM, Pavlides C. Vitrification of biopsied embryos at cleavage, morula, and blastocyst stage. *Reprod Biomed Online*. 2009;19:526–31.