



TÉCNICA DE BIÓPSIA – CORPÚSCULO POLAR, ESTÁGIO DE CLIVAGEM E BLASTOCISTO

Daniela Paes de Almeida Ferreira Braga



PGD

- Prevenção de uma doença genética

PGS

- Aumento na taxa de nascidos vivos
- Embriões livres de aneuploidia: Maior potencial de desenvolvimento e implantação e menor aborto

Wilton, 2002



BIÓPSIA EMBRIONÁRIA



- Retirar embrião da incubadora por no mínimo alguns minutos
- Fazer uma abertura na zona pelúcida
- Aspirar uma ou mais células

De Vos and Van Steirteghem, 2001

BIÓPSIA EMBRIONÁRIA



Corpúsculo Polar

- Primeiro
- Segundo

Oócito ou zigoto

MOMENTO PARA REALIZAÇÃO DA BIOPSIA: O QUE DEVEMOS CONSIDERAR

- Momento permite a identificação precisa dos erros genéticos do embrião biopsiado?
- As anormalidades detectadas pelo exame predizem de maneira consistente eventuais anormalidades no embrião em estágios seguintes?
- A amostra é obtida em tempo hábil para realização dos testes genéticos e transferência do embrião selecionado?
- A biopsia compromete o potencial de desenvolvimento e implantação do embrião?

BIÓPSIA EM ESTÁGIO DE CLIVAGEM

Human Reproduction, Vol.26, No.1 pp. 41–46, 2011

Advanced Access publication on October 21, 2010 doi:10.1093/humrep/deq265

human
reproduction

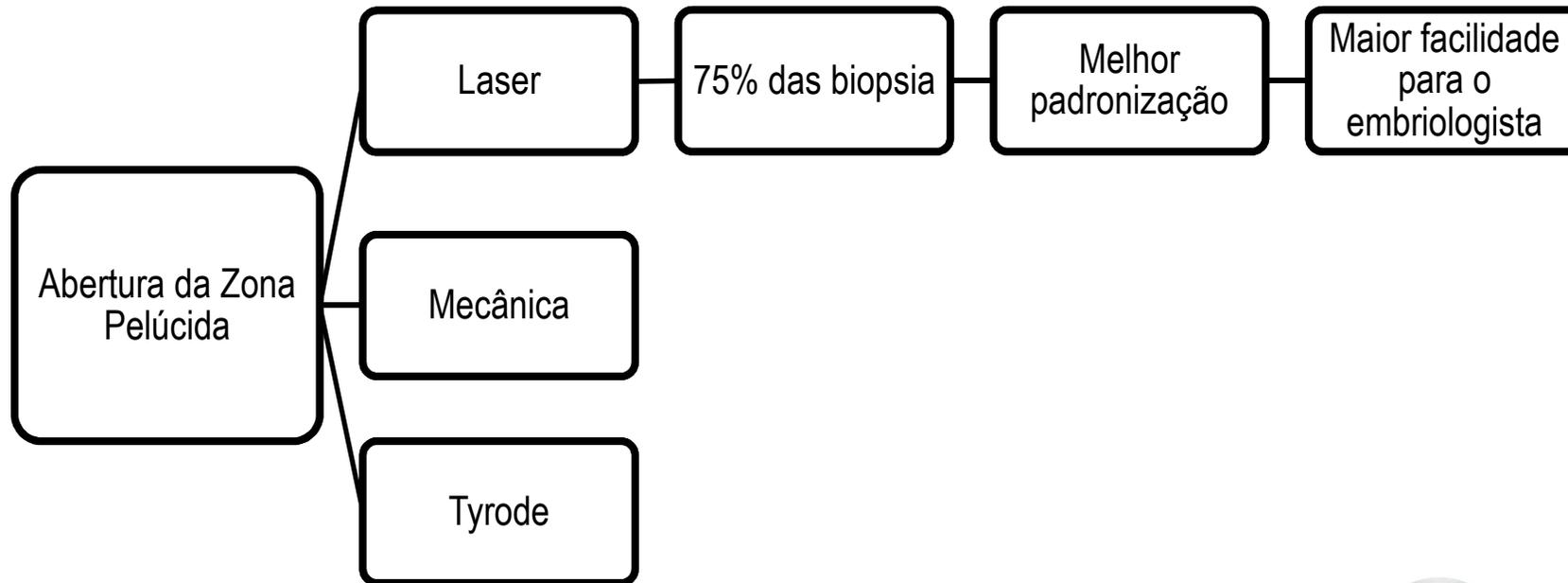
ESHRE PAGES

ESHRE PGD Consortium/Embryology Special Interest Group—best practice guidelines for polar body and embryo biopsy for preimplantation genetic diagnosis/screening (PGD/PGS)[†]

G.L. Harton^{1,*}, M.C. Magli², K. Lundin^{3,4}, M. Montag⁵, J. Lemmen⁶,
and J.C. Harper^{7,8}

- 90% das biopsias na ultima década foram feitas em embriões em estágio de clivagem
- Menos de 1% em blastocisto

BIÓPSIA EM ESTÁGIO DE CLIVAGEM



Jones et al., 2006 e Taylor et al., 2010

BIÓPSIA EM ESTÁGIO DE CLIVAGEM

FERTILITY AND STERILITY®
VOL. 72, NO. 5, NOVEMBER 1999
Copyright © 1999 American Society for Reproductive Medicine
Published by Elsevier Science Inc.
Printed on acid-free paper in U.S.A.

Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis categories for which

RBM Online - Vol 7, No 1, 91-97 Reproductive BioMedicine Online; www.rbmonline.com/Article/892 on web 15 May 2003

Luca Gianaroli, M.D.,* M. Cristina Magli
Santiago Munné, Ph.D.†

S.I.S.M.E.R., Bologna, Italy; and Saint Barnabas

Article

Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy



Dr Santiago Munné

Santiago Munné has been director of PGD at Saint Barnabas Medical Center since 1995. His group there focuses on identifying genetically normal embryos. Originally from Barcelona, Spain, Dr Munné gained his PhD in genetics from the University of Pittsburgh and joined Dr Jacques Cohen at Cornell University Medical College, New York in 1991. There he developed the first PGD test to detect embryonic numerical chromosome abnormalities. His work has been recognized by several prizes: in 1994, 1995 and 1998 from the Society for Assisted Reproductive Technology, and in 1996 from the American Society for Reproductive Medicine. Recently the PGD team has shown higher pregnancy rates in women of advanced age undergoing PGD. This team has performed more than 250 PGD cycles for translocations and over 1600 PGD cycles for chromosome abnormalities related to advanced maternal age. Dr Munné has more than 100 publications to his name, and is a frequent lecturer, both nationally and internationally, on his team's work and the field of preimplantation genetics.

Santiago Munné¹, Mireia Sandalinas, Tomas Escudero, Esther Velilla, Renee Walmsley, Sasha Sadowy, Jacques Cohen, David Sable

Institute for Reproductive Medicine and Science, Saint Barnabas Medical Centre, Livingston, NJ 07052, USA

¹Correspondence: Tel: +1 973 3226236; Fax: +1 973 3226235; e-mail: santi.munne@embryos.net

FERTILITY AND STERILITY®
Copyright © 1997 American Society for Reproductive Medicine
Published by Elsevier Science Inc.

Preimplantation genetic diagnosis in human in vitro fertilization by avoid abnormal embryos

Luca Gianaroli, M.D. Agnese Fiorentino, B.Sc.
M. Cristina Magli, M.Sc. John Garrisi, Ph.D.
Anna Pia Ferraretti, Ph.D. Santiago Munné, Ph.D.

Società Italiana Studi Medicina della Riproduzione, Bologna, Italy; and The Institute for Reproductive Medicine and Science of St. Barnabas Medical Center, Livingston, New Jersey

BIÓPSIA EM ESTÁGIO DE CLIVAGEM

The NEW ENGLAND JOURNAL of MEDICINE

ESTABLISHED IN 1812

JULY 5, 2007

VOL. 357 NO. 1

In Vitro Fertilization with Preimplantation Genetic Screening

Sebastiaan Mastenbroek, M.Sc., Moniek Twisk, M.D., Jannie van Echten-Arends, Ph.D.,
Birgit Sikkema-Raddatz, Ph.D., Johanna C. Korevaar, Ph.D., Harold R. Verhoeve, M.D., Niels E.A. Vogel, M.D.,
Eus G.J.M. Arts, Ph.D., Jan W.A. de Vries, Ph.D., Patrick M. Bossuyt, Ph.D., Charles H.C.M. Buys, Ph.D.,
Maas Jan Heineman, M.D., Ph.D., Sjoerd Repping, Ph.D., and Fulco van der Veen, M.D., Ph.D.

206
PGS

202
Controle

Idade avançada

Nascido vivo com: PGS 24% e controle 35%

Preimplantation genetic screening: a systematic review and meta-analysis of RCTs

S. Mastenbroek^{*}, M. Twisk, F. van der Veen, and S. Repping

Center for Reproductive Medicine, Academic Medical Center, University of Amsterdam, Meibergdreef 9, 1105 AZ, Amsterdam, The Netherlands

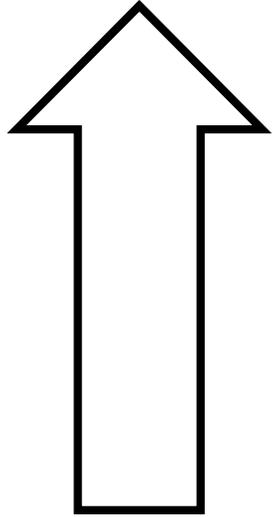
^{*}Correspondence address. Tel: +31-20-5663090; E-mail: s.mastenbroek@amc.uva.nl

Submitted on December 31, 2009; resubmitted on January 10, 2011; accepted on January 31, 2011

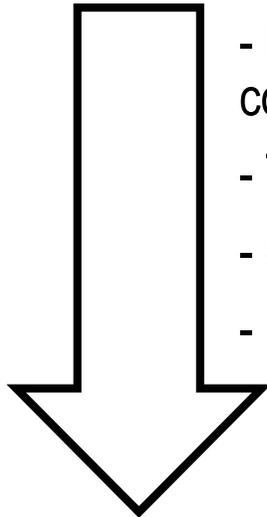
Efeito negativo

- Alta % de mosaicismo
- Questões técnicas

BIÓPSIA EM ESTÁGIO DE CLIVAGEM



- Detecção de doenças inerentes a mãe e ao pai
- Determinação do sexo
- Altamente padronizada: vasta gama de estudos clínicos disponíveis
- Embriões biopsiados ainda atingem o estágio de blastocisto



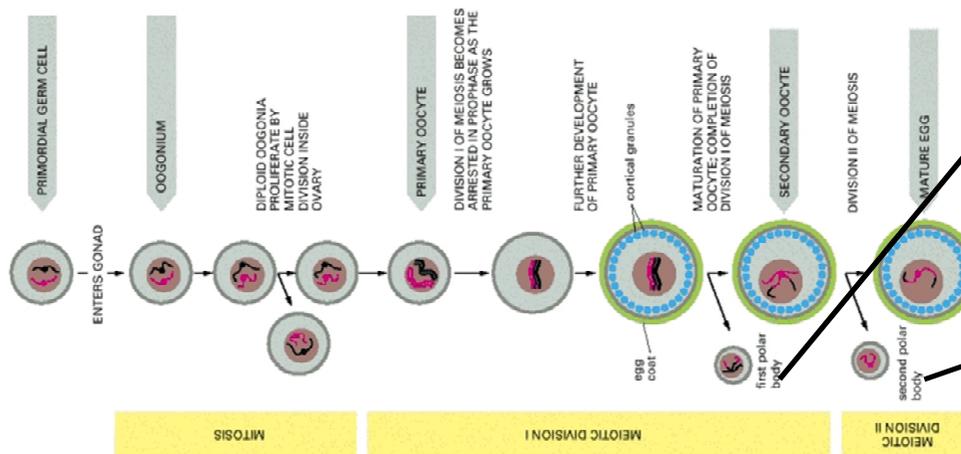
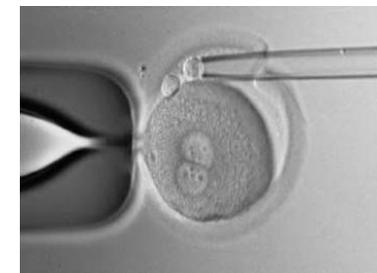
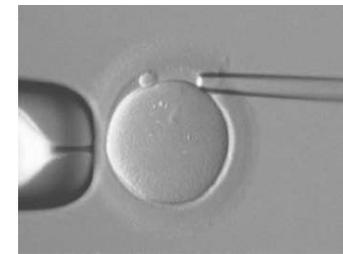
- Mosaicismo (40 – 60% dos embriões são mosaicos) ou auto correção
- Tempo limitado para análise
- Quantidade de material é limitada – Análise sensível
- Potencial de implantação pós biopsia é reduzido

What next for preimplantation genetic screening (PGS)? A position statement from the ESHRE PGD Consortium steering committee[†]

Joyce Harper^{1,12}, Edith Coonen², Martine De Rycke³,
Francesco Fiorentino⁴, Joep Geraedts², Veerle Goossens⁵,
Gary Harton⁶, Celine Moutou⁷, Tugce Pehlivan Budak⁸,
Pam Renwick⁹, Sioban SenGupta¹, Joanne Traeger-Synodinos¹⁰,
and Katerina Vesela¹¹

- Movimento para biopsia de corpúsculo polar e blastocisto

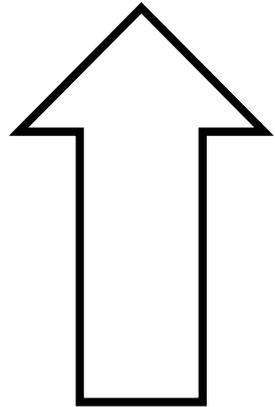
BIÓPSIA DE CORPÚSCULO POLA



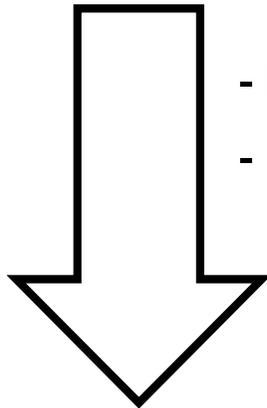
Fonte: Molecular Biology of the Cell. 4º edição

BIÓPSIA DE CORPÚSCULO POLAR

- Investigação da constituição cromossômica do oócito



- Não tem mosaicismo
- Investigação em estágios precoce (mais tempo hábil)
- Não retira células embrionárias
- Regiões onde a biopsia embrionária é proibida por lei (Alemanha)



- Detecção de aneuploidias de origem materna
- Impacto no desenvolvimento embrionário??

(Verlinsky et al., 1995) (Nicolaidis and Petersen, 1998)
(Handyside et al., 2004; Spits et al., 2006).

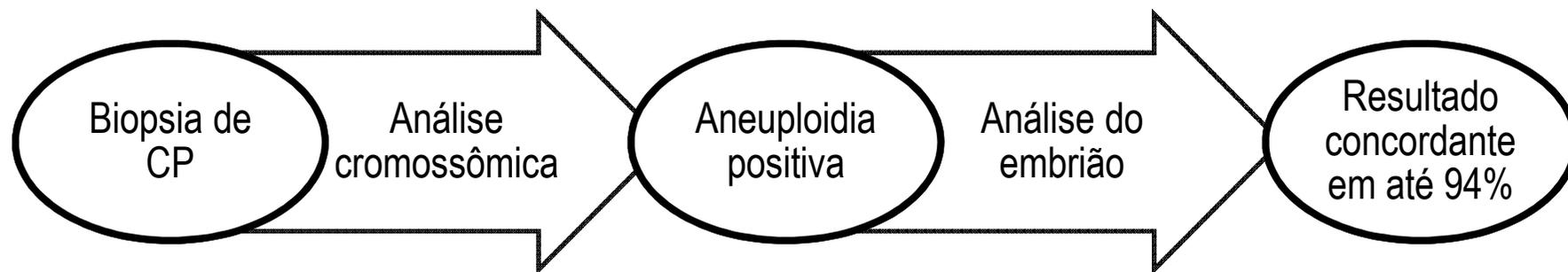
Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results

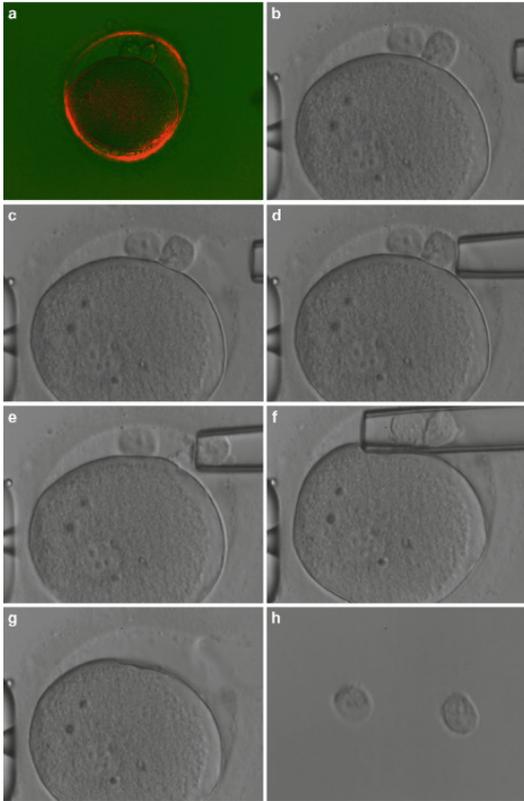
Joep Geraedts^{1,*}, Markus Montag², M. Cristina Magli³, Sjoerd Repping⁴, Alan Handyside⁵, Catherine Staessen⁶, Joyce Harper^{7,8}, Andreas Schmutzler⁹, John Collins¹⁰, Veerle Goossens¹¹, Hans van der Ven², Katerina Vesela¹², and Luca Gianaroli³

OBJETIVO

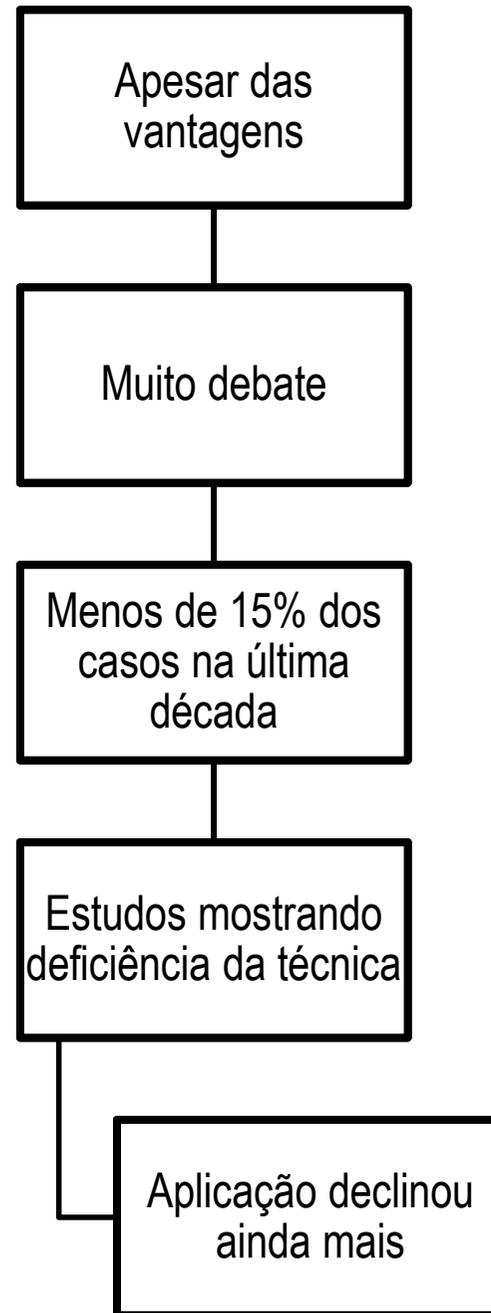
- Provar que a análise cromossômica de ambos CPs pode ser feita em até 12 horas.
- Provar que o status cromossômico identificado nos CPs bate em até 90% com aquele do zigoto.

Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results





Montag et al., 2012



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

Antonio Capalbo^{1,*}, Sara Bono², Letizia Spizzichino², Anil Biricik², Marina Baldi², Silvia Colamaria¹, Filippo Maria Ubaldi¹, Laura Rienzi¹, and Francesco Fiorentino²

¹Centre for Reproductive Medicine, GENERA, Clinica Valle Giulia, Via G. De Notaris 2b, Rome 00197, Italy ²Molecular Genetics Laboratory, GENOMA, Via Po, Rome 102 00198, Italy

*Correspondence address. Tel: +39 063269791; E-mail: capalbo@generaroma.it

- Alta incidência de diagnósticos errados (25 %): aneuploidias mitóticas e aneuploidias de origem paterna não são tão raras.
- Necessidade da biopsia de ambos os CP: procedimento mais demorado e trabalhoso.

Effects of laser polar-body biopsy on embryo quality

Ishai Levin, M.D., Benny Almog, M.D., Tamar Shwartz, B.Sc., Veronica Gold, M.Sc., Dalit Ben-Yosef, Ph.D., Michal Shaubi, M.D., Ami Amit, M.D., and Mira Malcov, Ph.D.

Sarah Racine IVF Unit, Lis Maternity Hospital, Tel Aviv Sourasky Medical Center, Sackler Faculty of Medicine, Tel Aviv University, Tel Aviv, Israel

VOL. 97 NO. 5 / MAY 2012

Fertility and Sterility®

Biopsia de CP vs não biopsia

- Alta taxa de fragmentação
- Pior qualidade embrionária
- Maior índice de parada de clivagem
- Menor número de blastômeros
- Implantação ???

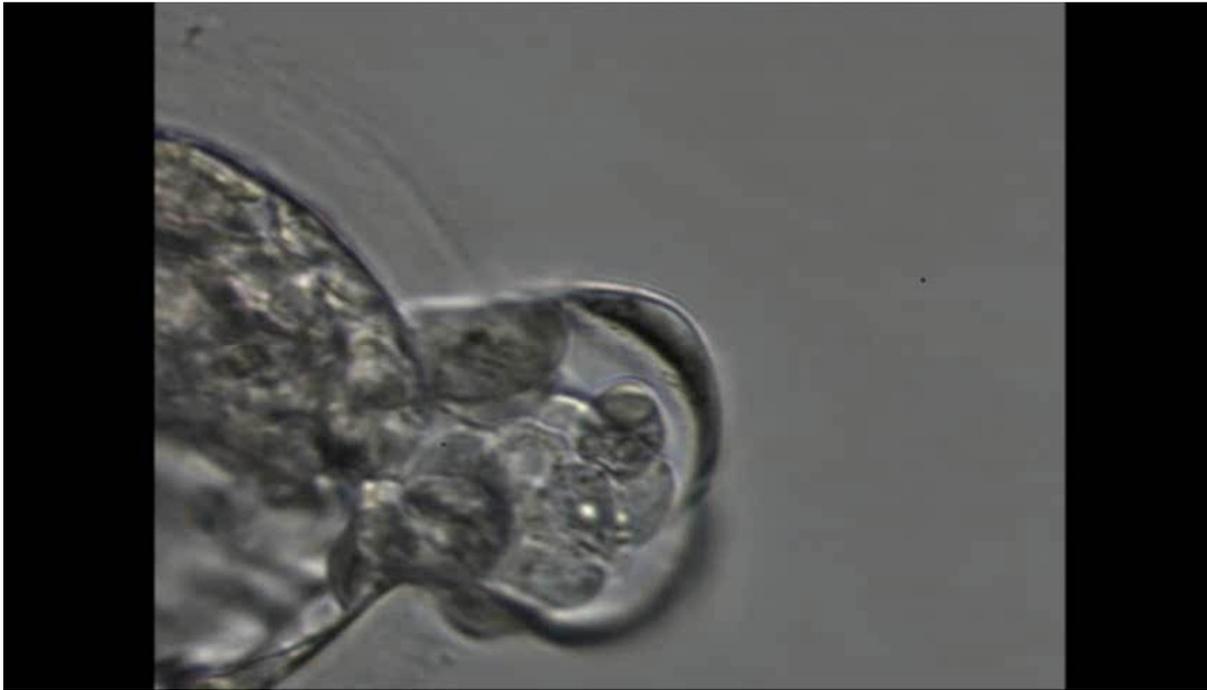
BIÓPSIA DE CORPÚSCULO POLAR



Segurança do procedimento ainda sob debate

Em andamento dois RCT s a respeito dos resultados clínicos e segurança da biópsia de CP

BIÓPSIA DE BLASTOCISTO



- Proposta inicialmente por Boer e colaboradores em 2004
- Primeiros nascimentos reportados por Kokkali e colaboradores e McArthur e colaboradores em 2005
- Poucos erros de diagnóstico (mais células são biopsiadas)
- Menor impacto do mosaicismo na análise molecular

Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts

Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage

PRENATAL DIAGNOSIS

Prenat Diagn 2008; 28: 434–442.

Published online in Wiley InterScience

(www.interscience.wiley.com) DOI: 10.1002/pd.1924

Blastocyst trophectoderm biopsy and preimplantation genetic diagnosis for familial monogenic disorders and chromosomal translocations

S. J. McArthur*, D. Leigh, J. T. Marshall, A. J. Gee, K. A. De Boer and R. P. S. Jansen

Sydney IVF, 321 Kent Street, Sydney, Australia

SEMINAL CONTRIBUTION

Cleavage-stage biopsy significantly impairs human embryonic implantation potential while blastocyst biopsy does not: a randomized and paired clinical trial

Richard T. Scott Jr., M.D.,^{a,b} Kathleen M. Upham, B.S.,^a Eric J. Forman, M.D.,^b Tian Zhao, M.S.,^a and Nathan R. Treff, Ph.D.^{a,b,c}

^a Reproductive Medicine Associates of New Jersey, Morristown; ^b Division of Reproductive Endocrinology, Department of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Sciences, Robert Wood Johnson Medical School, Rutgers University, New Brunswick; and ^c Department of Genetics, Rutgers–State University of New Jersey, Piscataway, New Jersey

Fertility and Sterility®



FIGURE 1

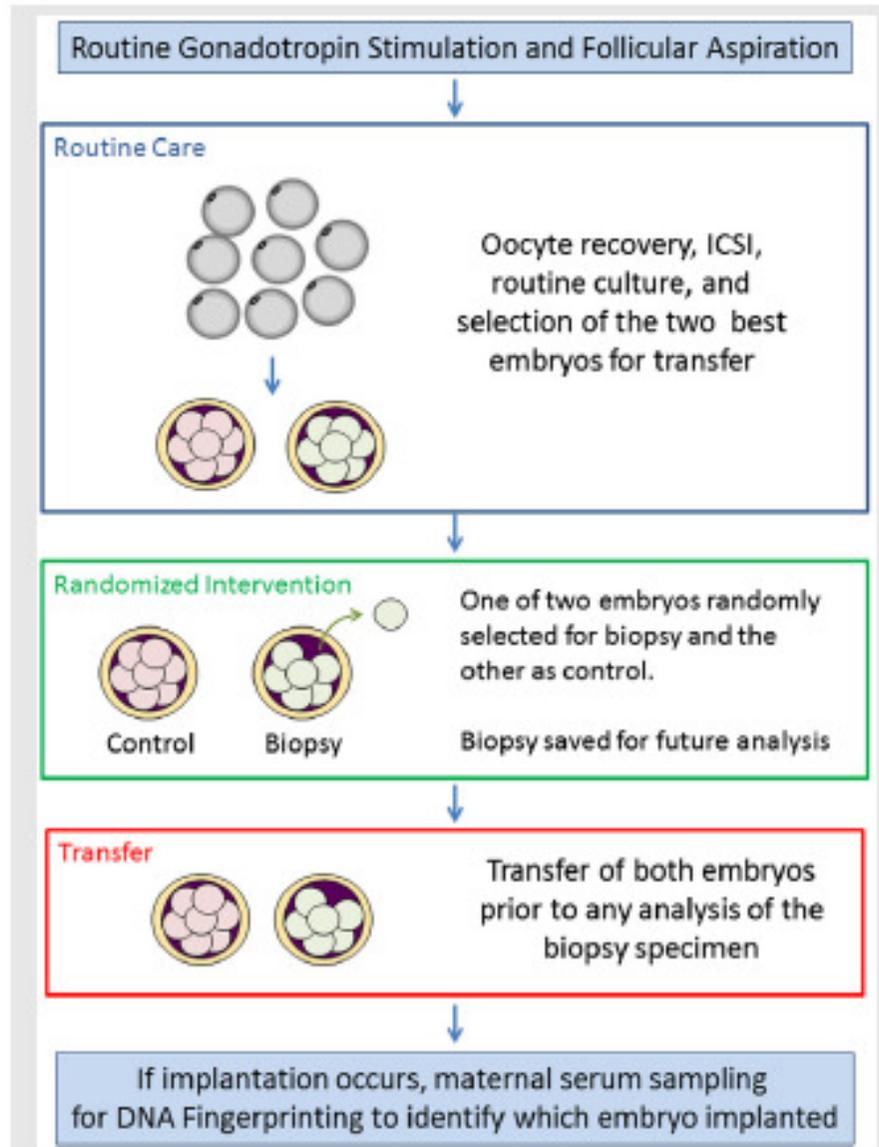
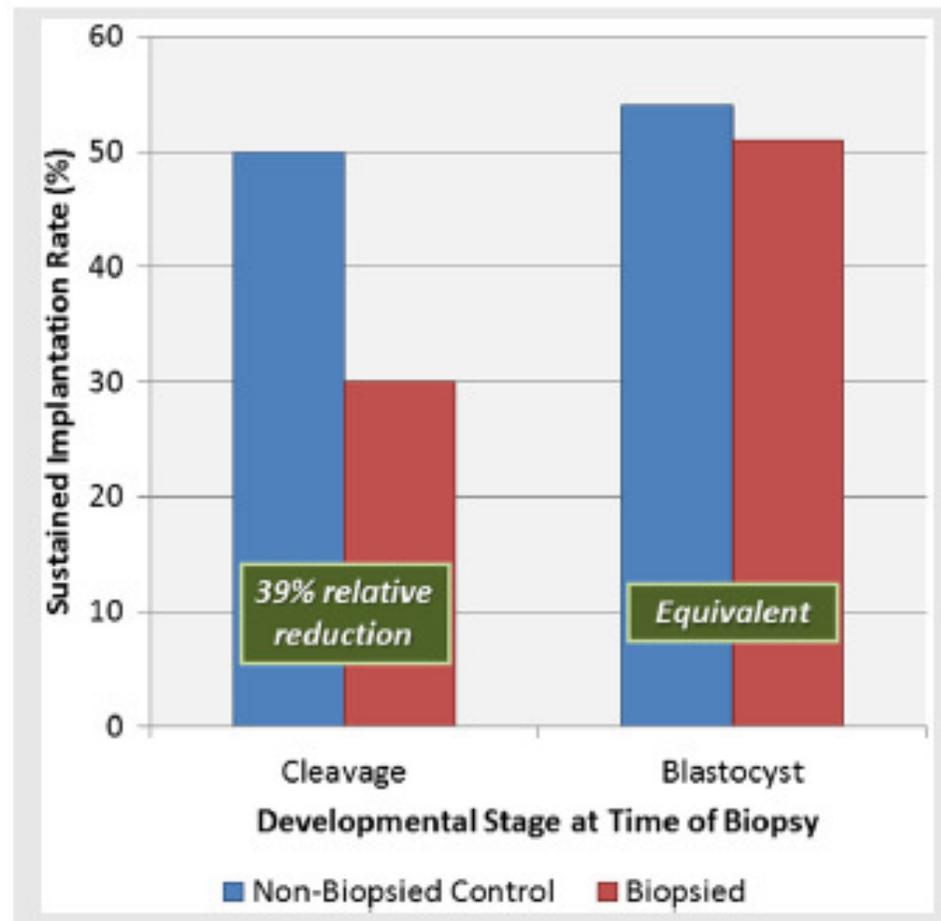


FIGURE 3



BIOPSIA DE BLASTOCISTO

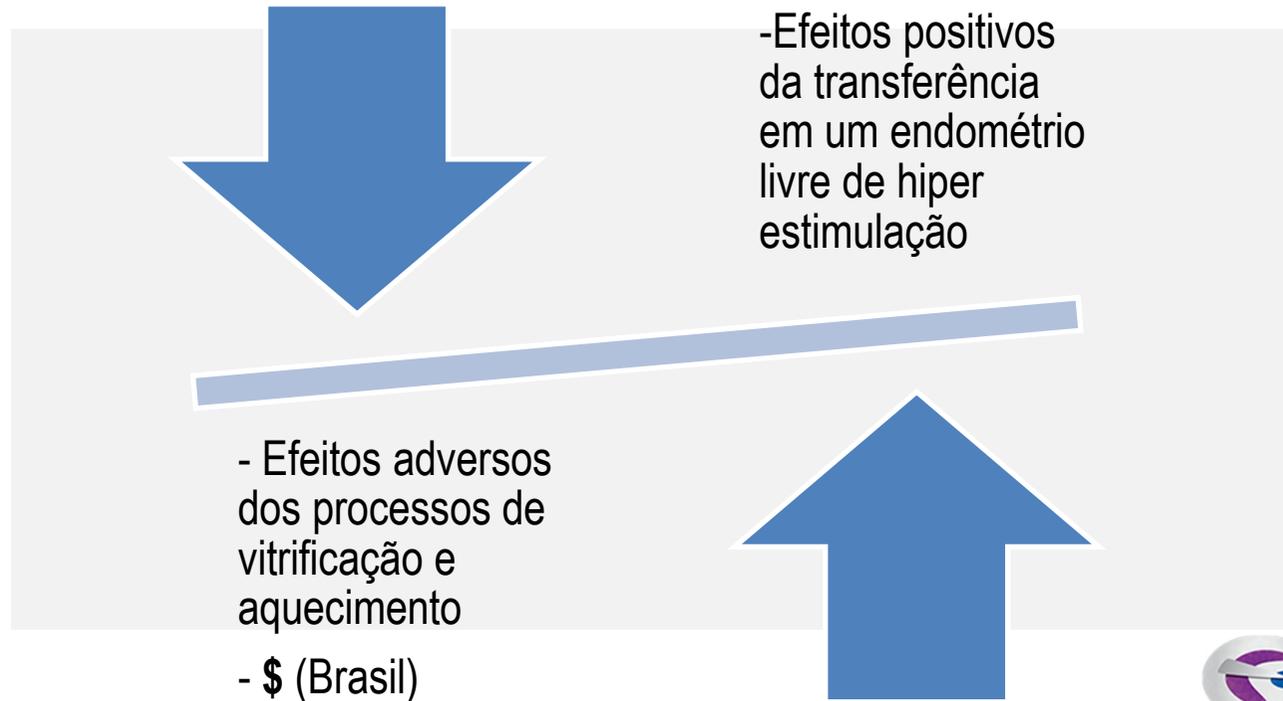
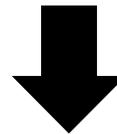
BIOPSIA EM ESTÁGIO DE CLIVAGEM

Análise de uma ou duas
células: problemas técnicos
como alta taxa de falha de
amplificação

TEMPO PARA REALIZAÇÃO DO SCREENING PARA ANEUPLOIDIA



Maioria dos laboratórios não tem tecnologia para realizar o *screening* para aneuploidia a tempo para a transfência do blastocisto a fresco



Live birth outcome with trophectoderm biopsy, blastocyst vitrification, and single-nucleotide polymorphism microarray–based comprehensive chromosome screening in infertile patients

William B. Schoolcraft, M.D.,^a Nathan R. Treff, Ph.D.,^{b,c} John M. Stevens, B.Sc.,^a Kathleen Ferry, B.Sc.,^b Mandy Katz-Jaffe, Ph.D.,^a and Richard T. Scott, Jr., M.D., H.C.L.D.^{b,c}

^a Colorado Center for Reproductive Medicine, Lone Tree, Colorado; ^b Reproductive Medicine Associates of New Jersey, Morristown, New Jersey; and ^c Division of Reproductive Endocrinology and Infertility, Department of Obstetrics, Gynecology, and Reproductive Science, University of Medicine and Dentistry of New Jersey–Robert Wood Johnson Medical School, New Brunswick, New Jersey

Fertility and Sterility® Vol. 96, No. 3, September 2011

Copyright ©2011 American Society for Reproductive Medicine, Published by Elsevier Inc.

B. Patient comprehensive chromosome screening (CCS) and clinical outcome.

| | |
|--|--|
| CCS results (n = 125 cycles) | |
| No result | 4.5% |
| All aneuploid cycle | 20% |
| Euploid blastocysts | 47.4% (356/751) |
| Outcome results (n = 100 fresh frozen embryo transfers) | |
| Blastocyst survival after warming | 96.8% (179/185) |
| Mean no. of euploid blastocysts transferred | 1.78 |
| Biochemical pregnancy | 87% (87/100) |
| Clinical pregnancy (fetal heart tone) | 73% (73/100) |
| Missed abortion | 2.7% (2/73) |
| Implantation rate (fetal heart tone) | 64.6% (115/178) |
| Euploid babies born | 113 = 71% live birth rate per transfer = 55.9% live birth rate per oocyte retrieval |

Blastocyst biopsy and vitrification are effective for preimplantation genetic diagnosis of monogenic diseases

Li-Jung Chang¹, Chu-Chun Huang¹, Yi-Yi Tsai¹, Chia-Cheng Hung², Mei-Ya Fang², Yi-Chun Lin², Yi-Ning Su^{1,2}, Shee-Uan Chen^{1,3,*}, and Yu-Shih Yang¹

¹Department of Obstetrics and Gynecology, National Taiwan University Hospital and College of Medicine, 8 Chung-Shan South Road, Taipei, Taiwan ²Department of Medical Genetics, National Taiwan University Hospital and College of Medicine, Taipei, Taiwan ³Research Center for Developmental Biology and Regenerative Medicine, National Taiwan University Hospital and College of Medicine, Taipei, Taiwan

Table III Blastocyst biopsy, vitrification and thawed embryo transfer for monogenic diseases.

| | |
|---|--------------|
| Couples | 33 |
| OPU cycles | 40 |
| Mature oocyte number | 566 (14 ± 8) |
| Normally fertilized oocytes | 436 (77%) |
| Embryos biopsied | 272 (62%) |
| Genotype diagnosed | 244 (90%) |
| Unaffected | 158 (65%) |
| Affected | 86 (35%) |
| Genotype un-diagnosed | 28 (10%) |
| Amplification failure | 14 (5%) |
| Allele drop-out | 14 (5%) |
| Cycles of frozen-thawed ET | 38 |
| Embryos thawed | 68 |
| Embryos survived after thawing | 64 (94%) |
| Number of embryos transferred | 64 |
| Mean embryos transferred/transfer cycle | 1.7 ± 0.5 |
| Implantation rate | 32/64 (50%) |
| Clinical pregnancy rate per OPU cycle | 25/40 (63%) |
| Ongoing pregnancy rate per OPU cycle | 24/40 (60%) |

OPU, ovum pick-up; ET, embryo transfer. Data are expressed as the mean ± standard deviation.

MOMENTO PARA REALIZAÇÃO DA BIOPSIA: O QUE DEVEMOS CONSIDERAR

- Momento permite a identificação precisa dos erros genéticos do embrião biopsiado?

Quando feito muito cedo, ou seja ainda em oócitos ou zigotos, o teste pode falhar em detectar alguns erros que podem impactar no potencial de desenvolvimento do embrião.

MOMENTO PARA REALIZAÇÃO DA BIOPSIA: O QUE DEVEMOS CONSIDERAR

- As anormalidades detectadas pelo exame predizem de maneira consistente eventuais anormalidades no embrião em estágios seguintes?

Se o embrião tem o potencial de se autocorriger ou apenas algumas células estão afetadas, a identificação de “desbalanços” na amostra biopsiada pode levar a um resultado incorreto e descarte de embriões normais.

MOMENTO PARA REALIZAÇÃO DA BIOPSIA: O QUE DEVEMOS CONSIDERAR

- A amostra é obtida em tempo hábil para realização dos testes genéticos e transferência do embrião selecionado?

Muitas vezes não. Neste caso deve-se considerar o programa de vitrificação e aquecimento e os valores deste procedimento no centro em questão (considerando que no Brasil o governo não paga por tratamentos de RA)

MOMENTO PARA REALIZAÇÃO DA BIOPSIA: O QUE DEVEMOS CONSIDERAR

- A biopsia compromete o potencial de desenvolvimento e implantação do embrião?

A segurança do procedimento ainda não foi totalmente elucidada, aparentemente biopsias em embriões em estágios mais desenvolvidos são mais seguras

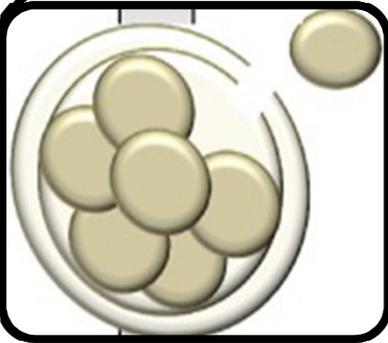
CONCLUSÃO

BIOPSIA DE CP

- Mais aceito por questões legais



CONCLUSÃO

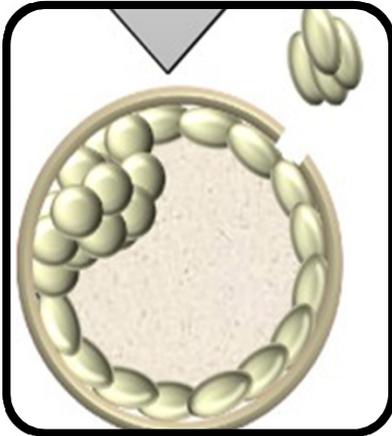


BIOPSIA DE BLASTÔMERO

- Detecção de erros de origem materna e paterna



CONCLUSÃO



BIOPSIA DE BLASTOCISTO

- Detecção de erros de origem materna e paterna





FERTILITY[®]
MEDICAL GROUP



www.fertility.com.br