



**FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE COIMBRA**

**TRABALHO FINAL DO 6º ANO MÉDICO COM VISTA À ATRIBUIÇÃO DO  
GRAU DE MESTRE NO ÂMBITO DO CICLO DE ESTUDOS DE MESTRADO  
INTEGRADO EM MEDICINA**

**FRANCISCA CAMPOS GOMES DOS SANTOS**

***DIAGNÓSTICO PRÉ-IMPLANTAÇÃO EM CORPOS  
POLARES - ESTADO DA ARTE***

**ARTIGO DE REVISÃO**

**ÁREA CIENTÍFICA DE GENÉTICA CLÍNICA**

**TRABALHO REALIZADO SOB A ORIENTAÇÃO DE:  
PROFESSORA DOUTORA TERESA ALMEIDA SANTOS**

**MARÇO DE 2016**



## ÍNDICE

RESUMO.....	3
ABSTRACT .....	5
ÍNDICE DE ABREVIATURAS.....	7
INTRODUÇÃO .....	8
MATERIAL E MÉTODOS.....	10
DIAGNÓSTICO PRÉ-IMPLANTAÇÃO – Desenvolvimento e aplicação.....	11
OVOGÉNESE .....	15
DIAGNÓSTICO PRÉ-IMPLANTAÇÃO EM CORPOS POLARES .....	18
Evolução da técnica.....	19
Biópsia de corpos polares .....	21
Deteção de anomalias genéticas.....	23
Seleção de ovócitos .....	25
Resultados .....	27
Vantagens.....	29
Limitações .....	31
Indicações atuais.....	33
Doenças monogénicas .....	33
Anomalias cromossómicas numéricas e estruturais .....	34
Suscetibilidade genética para cancro.....	35

Situações complexas.....	36
Perspetivas futuras.....	37
Deteção de doenças de hereditariedade mitocondrial .....	37
Sequenciação <i>single-cell whole-genome</i> .....	38
Rastreio genético pré-implantação .....	38
IMPLICAÇÕES ÉTICAS E LEGAIS.....	43
ACONSELHAMENTO GENÉTICO .....	46
CONCLUSÃO .....	48
ANEXOS .....	50
Anexo 1: Doenças monogénicas .....	50
AGRADECIMENTOS.....	52
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

## RESUMO

O Diagnóstico Pré-implantação (DPI) corresponde a um método de diagnóstico precoce, que permite reduzir ao máximo o risco de transmissão de doenças genéticas à descendência. A recolha do material para estudo genético pode ser efetuada em diferentes fases do desenvolvimento embrionário, através de biópsia de corpos polares, de blastómeros ou de trofoblasto. O material obtido é sujeito a análise genética para pesquisa de anomalias. O resultado deste processo será a seleção e implantação de embriões não portadores da anomalia. O DPI em corpos polares é o método de DPI mais precoce. Permite deduzir a informação genética dos ovócitos, através da análise dos seus corpos polares, previamente à finalização do processo de fecundação. Corresponde assim a uma forma de diagnóstico pré-embrionário. Neste trabalho, efetuou-se uma pesquisa da literatura científica existente sobre DPI, com incidência particular na técnica de diagnóstico em corpos polares, de forma a fazer uma revisão acerca das suas indicações, vantagens, limitações, perspetivas futuras de utilização e implicações éticas.

Concluiu-se que a biópsia de corpos polares é uma técnica precisa, segura e eficaz para realização de DPI, não apresentando diferenças significativas na deteção de anomalias genéticas em casais com risco de transmissão de anomalias genéticas de origem materna à sua descendência, relativamente a outras técnicas de biópsia.

Apesar da comprovada eficácia e das óbvias vantagens a nível ético, o DPI em corpos polares não permite a avaliação do componente paterno do embrião, ao contrário das técnicas de biópsia embrionária. Assim, apesar do entusiasmo inicial, a biópsia de corpos polares é a técnica de biópsia menos utilizada atualmente a nível global.

O surgimento de novos campos de aplicação, como o diagnóstico de doenças de hereditariedade mitocondrial, a utilização de novas técnicas de sequenciação e a discussão sobre

a utilização dos corpos polares no Rastreamento genético pré-implantação (RGPI), poderá contribuir para o aumento da importância atribuída a esta técnica. Contudo, realça-se a importância de realização de mais estudos, preferencialmente prospectivos e multicêntricos, de forma a clarificar a eficácia, vantagens, limitações e novas aplicações da biópsia de corpos polares.

**Palavras-chave:** diagnóstico pré-implantação; diagnóstico pré-natal; corpos polares; biópsia; técnicas de reprodução medicamente assistida; rastreamento genético pré-implantação; ovócitos; meiose.

## **ABSTRACT**

Preimplantation diagnosis (PID) is a method of early diagnosis, which allows minimizing the risk of transmitting genetic diseases to the offspring. The removal of genetic material can be performed at different stages of embryonic development through biopsy of polar bodies, blastomeres or trophoblast. The obtained material undergoes genetic analysis, to search for specific abnormalities. This process ends in the selection and implantation of embryos that do not carry the abnormality. PID in polar bodies is the earliest method of PID. It allows the deduction of the oocyte's genetic information, through the analysis of their polar bodies, prior to the finalization of the fertilization. Thus, it is considered a pre-embryonic diagnosis. In this paper, we performed a search of the scientific literature about PID, with particular focus on the polar bodies diagnosis, in order to make a review about its indications, advantages, limitations, future prospects and ethical implications.

We conclude that polar body biopsy is a precise, safe and effective technique to perform PID, for the detection of the maternal transmission of genetic anomalies in couples at risk, comparable to other biopsy techniques.

Despite its proven efficacy and its obvious ethical advantages, PID in polar bodies does not allow the evaluation of the paternal contribution to the genetic constitution of the embryo, unlike the embryo biopsy techniques. Therefore, despite the initial enthusiasm, polar bodies biopsy is now the less used technique.

The emergence of new fields of application, such as the detection of inherited mitochondrial diseases, the use of new sequencing techniques and the discussion about the role of polar bodies in Preimplantation genetic screening (PGS), may lead to its increasing importance. However, there is a need to perform more studies, preferably prospective and

multicentric studies, in order to clarify the efficacy, advantages, limitations and new applications of the polar bodies biopsy.

**Keywords:** preimplantation diagnosis; prenatal diagnosis; polar bodies; biopsy; assisted reproductive techniques; preimplantation genetic screening; oocytes; meiosis.



## ÍNDICE DE ABREVIATURAS

ADN – Ácido desoxirribonucleico

ADO – *Allele dropout*

CGH – Hibridização genómica comparativa

CPI – Primeiro corpo polar

CPII – Segundo corpo polar

DPI – Diagnóstico Pré-Implantação

DPN – Diagnóstico Pré-Natal

ESHRE – Sociedade Europeia de Reprodução e Embriologia Humana

FISH – Hibridização fluorescente *in situ*

FIV – Fecundação *in vitro*

hCG – Gonadotrofina coriónica humana

HLA – Antígenos humanos leucocitários

ICSI – Injeção Intracitoplasmática de espermatozoides

MI – Primeira divisão meiótica

MII – Segunda divisão meiótica

mtADN – Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

PCR – Reação de polimerização em cadeia

PMA – Procriação medicamente assistida

RGPI – Rastreio Genético Pré-Implantação

SNP – Polimorfismo de nucleótido único

## INTRODUÇÃO

Atualmente são conhecidas milhares de doenças genéticas hereditárias. Estas doenças têm uma esperança de cura reduzida, pelo que o principal foco da investigação se prende com a prevenção do seu aparecimento, através de técnicas de diagnóstico cada vez mais precoce, de forma a evitar o nascimento de indivíduos afetados.<sup>1</sup>

As técnicas de Diagnóstico Pré-natal (DPN) e Diagnóstico Pré-implantação (DPI) são utilizadas em casais com risco de transmitir uma doença genética à sua descendência. Face a este risco, estes casais podem optar entre: não ter filhos; recorrer à adoção; optar por uma gravidez sem qualquer tipo de diagnóstico genético, aceitando a possibilidade de transmitir a doença à descendência; recorrer à doação de gâmetas ou recorrer a técnicas de diagnóstico precoce.<sup>1,2</sup>

Quando a opção é realizar DPN, a mulher engravida sem recurso a qualquer tipo de técnica de procriação medicamente assistida (PMA), sendo o feto testado durante a gravidez, através de técnicas como a biópsia de vilosidades coriônicas (das 10 às 12 semanas de gestação) ou a amniocentese (das 16 às 20 semanas de gestação).<sup>3,4</sup> No caso de o feto ser afetado pela doença em causa, existe a opção de optar pela interrupção médica da gravidez. Contudo, é importante lembrar que a interrupção médica de uma gravidez desejada constitui um evento traumático para o casal e respetiva família.<sup>1</sup>

O DPI foi introduzido na década de 90 como alternativa ao DPN<sup>5</sup>, de forma a reduzir ao máximo o risco de transmissão de doenças genéticas, permitindo iniciar gestações apenas de embriões não afetados pela condição em causa.<sup>3</sup> Desde então, estas técnicas evoluíram e ampliaram as suas aplicações, estando atualmente estabelecidas como opções reprodutivas, oferecidas em centros especializados em todo o mundo. A recolha do material genético pode ser efetuada em diferentes fases do desenvolvimento embrionário, através de biópsia de corpos

polares, de blastómeros ou de trofoblasto. O material obtido é sujeito a testes moleculares, para pesquisa de uma anomalia genética previamente conhecida na família.<sup>5,6</sup> O resultado deste processo será a implantação apenas de embriões não portadores desta anomalia, de forma a evitar a sua transmissão à descendência.<sup>1</sup>

O DPI em corpos polares é o método de DPI mais precoce, permitindo deduzir a informação genética dos ovócitos, através da análise dos seus corpos polares, previamente à finalização do processo de fecundação.<sup>7,8</sup>

As técnicas de DPN e DPI estão frequentemente envoltas numa enorme carga moral e emocional. Por um lado, os casais que optam pela utilização de técnicas de DPN após uma concepção natural, sujeitam-se à necessidade de realização de uma interrupção médica da gravidez. Por outro lado, aqueles que optam pelas técnicas de DPI vêm-se confrontados com o impacto físico e psicológico associado às técnicas de PMA, com a incerteza de sucesso destas mesmas técnicas e com as suas implicações éticas.<sup>9</sup>

Procedeu-se a uma revisão da literatura existente sobre DPI, com incidência particular na técnica de diagnóstico em corpos polares, suas indicações, vantagens, limitações, perspectivas futuras de utilização e implicações éticas.

## **MATERIAL E MÉTODOS**

Efetuamos uma pesquisa da literatura científica recorrendo às bases de pesquisa PubMed, MedLine e B-on, utilizando as seguintes palavras-chave: PGD, *Polar Bodies*, ART, *Aneuploidy Polymorphisms*, *Polar body diagnosis* e PGS, conjugadas utilizando os termos “or”, “and” e “MeSH”.

A pesquisa foi realizada entre os anos de 1990 e julho de 2015, sendo limitada a artigos publicados em inglês, dando preferência a estudos retrospectivos e de revisão sistemática, referentes às principais publicações europeias e norte-americanas. Procedeu-se à leitura dos títulos e dos resumos dos artigos obtidos e selecionaram-se aqueles cujo conteúdo se mostrou mais relevante. Posteriormente foram recolhidos alguns artigos considerados importantes através da sua referência nos artigos selecionados originalmente.

## **DIAGNÓSTICO PRÉ-IMPLANTAÇÃO – Desenvolvimento e aplicação**

O DPI constitui uma das opções reprodutivas que podem ser oferecidas a casais com risco de transmitir uma alteração genética ou cromossômica à sua descendência.<sup>2</sup>

A utilização deste método precoce de diagnóstico permite evitar o sofrimento associado à ocorrência de abortos espontâneos recorrentes (como no caso de portadores de translocações equilibradas) ou à necessidade de recorrer à interrupção médica de gravidez, após diagnóstico de um feto afetado através das técnicas de DPN, uma vez que permite a implantação apenas dos embriões não afetados pela anomalia genética em causa. Desta forma, é dada a estes casais a possibilidade de conceber uma criança geneticamente relacionada, sem necessidade de considerar a interrupção médica da gravidez.<sup>10,11</sup>

Por este motivo, desde a primeira descrição da utilização das técnicas de DPI, em 1990 por Handyside *et al.*, estas foram globalmente difundidas e novas tecnologias foram rapidamente desenvolvidas. Inicialmente, o DPI foi aplicado num conjunto de casais com risco de transmissão de uma doença com hereditariedade ligada ao X, tendo sido efetuada a seleção de embriões do sexo feminino, de forma a evitar o nascimento de crianças do sexo masculino, potencialmente afetadas. Neste caso, a biópsia foi efetuada através da remoção de um blastómero de embriões em estágio de clivagem e foram utilizadas técnicas de reação de polimerização em cadeia (PCR) para deteção de segmentos do cromossoma Y. Os embriões contendo o cromossoma Y foram eliminados, implantando apenas aqueles que não possuíam este cromossoma.<sup>2,3,12</sup> Deste então, as indicações para realização de DPI sofreram uma evolução, passando atualmente pela deteção de inúmeras doenças monogénicas, de anomalias cromossômicas (numéricas ou estruturais) e ainda por algumas indicações mais controversas como a determinação do sexo para fins não médicos, a tipagem de Antígenos humanos

leucocitários (HLA) e os síndromes de predisposição hereditária para cancro, com penetrância incompleta.<sup>2,6</sup>

O desenvolvimento e a introdução na prática clínica das técnicas de PMA permitiram o desenvolvimento dos métodos de DPI, devido à possibilidade de manipulação e análise de embriões nos estádios iniciais de desenvolvimento. Estas técnicas passam pela estimulação ovárica controlada, de forma a produzir um número adequado de ovócitos. Após colheita dos ovócitos, estes são fecundados, inicialmente através de técnicas de Fecundação *in vitro* (FIV) e, atualmente através de técnicas de Injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) (microinjeção controlada de um único espermatozoide no interior do ovócito). Posteriormente, os embriões são cultivados *in vitro* até à sua transferência para o útero.<sup>3,6,13</sup>

De seguida, é necessário realizar a biópsia para estudo do material genético. Nos últimos 20 anos, têm sido principalmente utilizados embriões em estágio de clivagem (no terceiro dia de desenvolvimento embrionário), através da biópsia de 1 ou 2 blastómeros, correspondendo esta técnica a cerca de 90% dos ciclos de DPI. A nível da acuidade do diagnóstico, a utilização de 2 blastómeros é vantajosa, apesar de mais agressiva para o embrião. Outros métodos foram já desenvolvidos para recolha de material genético, nomeadamente a biópsia de trofoblasto e de corpos polares.<sup>2,14</sup>

A biópsia de corpos polares foi inicialmente efetuada através da biópsia isolada do primeiro corpo polar (CPI), tendo-se evoluído posteriormente para biópsia do CPI e do segundo corpo polar (CPII), de forma sequencial ou simultânea.<sup>2</sup> Este procedimento será descrito pormenorizadamente no seguimento deste texto.

A biópsia de trofoblasto é realizada no estágio de blastocisto, correspondendo atualmente a uma alternativa eficaz para realização de DPI. A biópsia é realizada 5 a 6 dias após a ICSI e permite a recolha de 5 a 10 células, o que facilita a realização de um diagnóstico fidedigno, diminuindo a taxa de erros. Esta técnica beneficiou substancialmente da introdução

da vitrificação como método de criopreservação de blastocistos, ganhando tempo extra para realização dos testes genéticos. A vitrificação permite um arrefecimento e aquecimento ultra rápido do blastocisto, evitando-se a formação de cristais, mantendo uma elevada taxa de sobrevivência do blastocisto e desenvolvimento embrionário bastante satisfatório.<sup>2,3,7,15</sup>

Também as técnicas de diagnóstico genético têm sofrido uma constante evolução. As técnicas de PCR baseiam-se num processo de amplificação do ácido desoxirribonucleico (ADN), de forma a permitir a análise genética. A PCR foi a primeira técnica a ser utilizada para fins de DPI, com amplificação de segmentos de cromossoma Y, para deteção do sexo do embrião em situações de doenças de hereditariedade ligada ao X. O desenvolvimento de novas técnicas de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) permitiu novas estratégias de diagnóstico genético baseadas na utilização de sondas de ADN marcadas por fluorescência, específicas de cromossomas. Contudo, a sua aplicabilidade é limitada pelo facto de permitir a deteção de um número limitado de cromossomas por célula. Nesta sequência, surgiram as técnicas de hibridização genómica comparativa (CGH) como forma de determinação do cariótipo completo, para possibilitar a deteção de aneuploidia relacionada com qualquer cromossoma. Finalmente, podem ainda utilizar-se *arrays* de Polimorfismos de nucleótido único (SNP). Esta técnica utiliza os milhares de SNPs presentes ao longo de todo o genoma, através de estudos de ligação, baseados num determinado haplótipo (obtido através da análise do genoma de familiares). Apesar de informativa, esta técnica é dispendiosa e ainda não se encontra amplamente estabelecida.<sup>2,3,6,7</sup>

Apesar de atualmente corresponder a uma das opções reprodutivas mais aliciantes para casais com risco genético, recorrer às técnicas de DPI não constitui nunca uma opção fácil. Este tipo de diagnóstico implica por vezes algum tempo de espera, de forma a validar o teste específico a utilizar em cada casal e obriga à utilização de técnicas de PMA. Estas técnicas têm um grande impacto físico e emocional para o casal, uma vez que existe risco de gravidez

gemelar, devido à implantação de múltiplos embriões, há possibilidade de formação de embriões excedentários e necessidade de eliminar os embriões afetados, o que tem implicações éticas e morais. Associadamente, as técnicas de DPI têm uma taxa de sucesso por ciclo relativamente baixa, tendo a Sociedade Europeia de Reprodução e Embriologia Humana (ESHRE) reportado em 2014 uma taxa média de gravidez por centro de 23,04%. A possibilidade de realização de um diagnóstico errado ou inconclusivo e o grande impacto económico são também desvantagens desta técnica.<sup>2,11,16</sup>

Em 2004 atingiu-se o marco de 1000 nascimentos com recurso a técnicas de DPI e estima-se que em 2010 se tenham ultrapassado os 10000 nascimentos. O DPI evoluiu não só como uma antecipação das metodologias de DPN, mas como uma nova modalidade de diagnóstico, com vantagens em situações específicas e sem o impacto emocional decorrente da interrupção médica de uma gravidez de um feto afetado. Prevê-se uma utilização crescente destas técnicas, à medida que o seu desenvolvimento permite uma maior eficácia.<sup>7</sup>



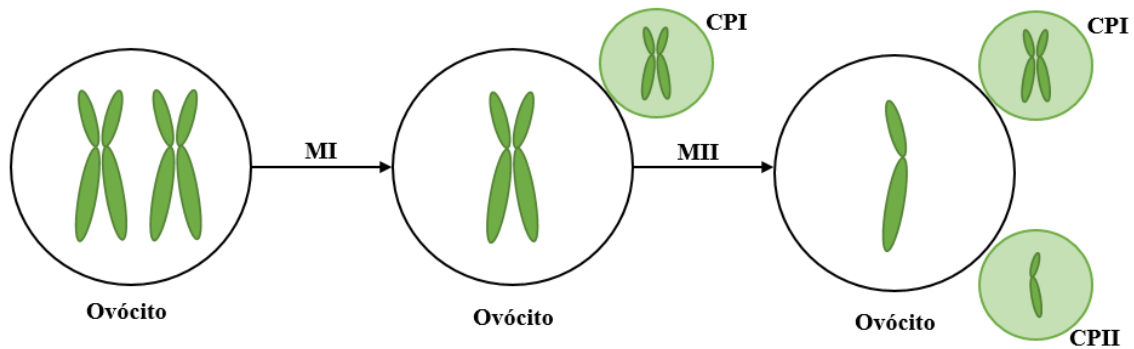
## OVOGÉNESE

A meiose compreende um conjunto de processos celulares, divididos em duas fases: a primeira divisão meiótica (MI) e a segunda divisão meiótica (MII) e é a grande responsável pela formação dos gametas humanos (células haploides envolvidas na fecundação, que se fundem para permitir a formação de um zigoto diploide).<sup>8</sup> Contrariamente à meiose masculina, um processo contínuo, a meiose feminina ocorre em fases distintas, separadas por uma janela temporal que pode variar de anos até décadas.<sup>17</sup> As duas divisões meióticas originam um ovócito haploide e a dois corpos polares, que se individualizam do ovócito após cada divisão.<sup>18</sup>

Uma mulher nasce com um número finito de ovócitos, não havendo geralmente produção de novos ovócitos após o nascimento. Estas células sofrem um processo maturativo, que se inicia com a MI, onde ocorre duplicação dos cromossomas, transformando o ovócito numa célula diploide. Nesta célula, os cromossomas homólogos alinham-se a nível do fuso meiótico, permitindo a ocorrência de troca de material genético entre as cromátides dos cromossomas homólogos. Este fenómeno ocorre através da formação de quiasmas, num processo denominado *crossing-over*. Neste ponto, o ciclo celular sofre uma pausa até à ovulação, que pode durar anos ou décadas.<sup>17</sup>

Aquando da ovulação, os cromossomas homólogos separam-se e migram para polos opostos do fuso meiótico, originando dois conjuntos de 23 cromossomas (cada um com duas cromátides). O fuso meiótico possui uma localização não-equatorial, pelo que duas massas citoplasmáticas desiguais são formadas. No final da MI, um conjunto de cromossomas, envolto por uma pequena massa citoplasmática é libertado de forma a constituir o CPI enquanto o outro conjunto de cromossomas permanece no ovócito. Nesta fase, o ciclo celular sofre novamente uma pausa até à fecundação.<sup>17,19,20</sup>

A formação do CPII ocorre após a penetração do espermatozoide no interior do ovócito. Nesta altura, as cromátides são separadas em dois conjuntos, permanecendo um deles no ovócito e sendo o outro expulso, juntamente com uma pequena massa citoplasmática, de forma a formar o CPII. Se as duas divisões meióticas ocorrerem de forma normal e os dois corpos polares forem devidamente formados, no final deste processo o CPII e o ovócito terão o mesmo número de cromátides.<sup>19,21</sup> O processo de formação dos corpos polares está apresentado de forma esquemática na Figura 1. As cromátides no CPII são protegidas por um invólucro nuclear mais resistente do que ocorre no CPI, o que lhes confere maior resistência.<sup>20,21</sup>



**Figura 1:** Meiose e formação do CPI e CPII, tendo como ponto de partida um ovócito diploide. [Adaptado de 8]

Os corpos polares correspondem a pequenas células resultantes da primeira e segunda divisões meióticas, e contém material genético redundante cuja principal função é permitir a formação de um ovócito haploide, de forma a originar um zigoto diploide após a fecundação. Cada corpo polar possui na sua constituição um pequeno volume citoplasmático, com mitocôndrias, ribossomas, grânulos corticais e outro material citoplasmático. O CPI possui 23 cromossomas, cada um deles constituído por duas cromátides, enquanto o CPII possui apenas 23 cromátides, correspondendo a uma célula haploide.<sup>20,21</sup>

Após o processo de fecundação, os pronúcleos feminino e masculino, que contêm a informação genética materna e paterna respectivamente, encontram-se no ovócito e fundem-se, dando origem ao zigoto. Estão nesta altura reunidas todas as condições para a ocorrência da primeira divisão mitótica, dando seguimento ao restante processo de desenvolvimento embrionário.<sup>8,19</sup>

## DIAGNÓSTICO PRÉ-IMPLANTAÇÃO EM CORPOS POLARES

Após a fecundação do ovócito, os corpos polares não desempenham nenhuma função biológica relevante para o desenvolvimento embrionário, pelo que podem ser removidos e utilizados para efeitos diagnósticos de forma segura, sem riscos para o desenvolvimento embrionário subsequente.<sup>8,19,20,22</sup>

Foi com base neste pressuposto que, na década de 80, a Organização Mundial de Saúde propôs a utilização dos corpos polares como uma possível abordagem para realização de DPI.<sup>22</sup> A utilização de corpos polares foi considerada uma técnica de DPI mais precoce do que as técnicas baseadas na biópsia embrionária, uma vez que permite que a análise genética ocorra antes da finalização do processo de fecundação, previamente à formação do embrião. Já na década de 90, a biópsia de corpos polares foi aplicada na prática clínica, constituindo atualmente uma abordagem bem estabelecida para realização de DPI.<sup>19,22</sup>

Como todas as outras técnicas de DPI, o DPI em corpos polares inicia-se pela realização de técnicas de PMA, permitindo a maturação, remoção e fecundação de um número variado de ovócitos.<sup>23,24</sup>

É importante ter em conta que o recurso a técnicas de PMA condiciona um dos principais responsáveis pela taxa de sucesso reprodutivo relativamente baixa associada aos ciclos de DPI. Pensa-se que a elevada prevalência de aneuploidia nos embriões humanos possa corresponder à causa deste relativo insucesso, uma vez que embriões aneuploides originam taxas de implantação inferiores e aumento do risco de abortos espontâneos numa fase inicial da gestação. Adicionalmente, existe evidência cumulativa que certos grupos de casais que recorrem a técnicas de reprodução medicamente assistida, como por exemplo mulheres com idade materna avançada, têm um risco elevado de originar ovócitos e embriões com anomalias cromossómicas, uma vez que a idade materna avançada está associada ao aumento da

frequência de aneuploidia nos ovócitos e nos embriões resultantes. Assim, estes casais estão associados à ocorrência de taxas de sucesso significativamente inferiores.<sup>17,23,25</sup>

Para que o diagnóstico seja realizado de forma correta, é necessário que as células utilizadas para análise genética sejam representativas da constituição cromossômica do embrião e que a sua biópsia não altere significativamente a viabilidade embrionária após transferência e implantação, o que se verifica com a utilização de corpos polares.<sup>23</sup> Aspectos críticos associados à técnica, que permitem assegurar a realização de um diagnóstico correto, correspondem à abertura atraumática da zona pelúcida (o revestimento extracelular do ovócito), remoção de corpos polares íntegros dentro de um *timing* definido e diagnóstico genético preciso.<sup>8</sup> Estes aspectos serão abordados de seguida de forma mais detalhada.

## **Evolução da técnica**

Depois de uma fase inicial de avaliação da eficácia das técnicas de DPI, atualmente estas são consideradas técnicas bem estabelecidas na prática clínica. Apesar disso, mantém-se a contínua necessidade de realização de estudos para comprovar a sua eficácia, para melhoria das diversas técnicas utilizadas e para desenvolvimento de novas metodologias e campos de atuação, com expansão da sua aplicação a uma variedade de condições para as quais o DPI ainda não foi, até agora, considerado.<sup>23,26</sup>

O DPI em corpos polares foi inicialmente descrito em 1990 por Verlinsky *et al.*, como método de análise de anomalias cromossômicas numéricas, sendo utilizada alguns anos mais tarde para deteção de anomalias monogénicas. Após estas aplicações iniciais, a sua utilização tornou-se mais abrangente, tendo sido descrita, a título de exemplo, para análise de

translocações em 1998, para detecção de doenças com hereditariedade ligada ao X em 2001 e para tipagem de genes HLA em 2001.<sup>27</sup>

Inicialmente foi utilizada a análise isolada do CPI. Esta abordagem foi considerada como o protótipo do diagnóstico pré-concepcional, uma vez que a biópsia é efetuada previamente à fecundação. Contudo, a informação obtida pela análise isolada do CPI mostrou-se insuficiente, porque não permite inferir o conteúdo genético do embrião, uma vez que não permite detetar todas as anomalias genéticas, já que uma grande parte dos erros meióticos ocorre na MII. Com a adição da informação dada pelo CPII, é possível inferir a informação contida no ovócito de forma mais precisa, pelo que se optou mais tarde pela biópsia do CPI e do CPII, de forma a obter informação mais fidedigna.<sup>22,23,27</sup>

Também a possibilidade de ocorrência de *allele dropout* (ADO), constitui um dos fatores associados à preferência da análise do CPI e CPII. O ADO corresponde à falha de amplificação de um dos alelos testados, o que pode levar à realização de diagnósticos errados. Constitui uma das principais causas de erros diagnósticos através de técnicas de DPI.<sup>28,29</sup> Para evitar a ocorrência não detetada de ADO, é necessário efetuar a análise do CPI e CPII, associada à pesquisa de uma mutação ou anomalia específica em combinação com múltiplos marcadores genéticos. Foi demonstrado por Verlinsky *et al.* que a utilização de três ou mais marcadores polimórficos, associados à anomalia em estudo, reduz a taxa de erro diagnóstico devido a ADO, de um valor que poderia atingir os 27%, para quase 0%.<sup>22,24,29</sup>

A biópsia de corpos polares mostra-se como uma abordagem particularmente interessante a nível ético, por não envolver a micromanipulação do embrião. Num estudo realizado por Kuliev e Rechitsk, para pesquisa de mutações maternas no CPI e no CPII, a análise genética foi completa em menos de 9 horas, enquanto todos os ovócitos testados ainda se encontravam em fase de pronúcleo. Assim, eliminaram-se os ovócitos portadores do alelo mutado antes da singamia, previamente à formação de um embrião diploide.<sup>22</sup>

No entanto, apesar das vantagens éticas, a biópsia de corpos polares não é a primeira opção na prática clínica. Uma das principais razões para esta disparidade prende-se com facto de a biópsia embrionária, um método que faculta informação mais abrangente pela possibilidade de análise do componente materno e paterno, apenas ser restrita por lei num grupo reduzido de países, continuando a ser a abordagem mais frequentemente utilizada.<sup>21,30</sup>

A avaliação morfológica do CPI relaciona-se com a taxa de fecundação, desenvolvimento e implantação do embrião, após protocolos de FIV ou ICSI. CPI redondos ou ovoides com uma superfície lisa, apresentaram taxas mais altas de fecundação, melhor morfologia embrionária e maiores taxas de blastulação, implantação e gravidez, do que CPI fragmentados ou com um tamanho superior ao normal.<sup>20</sup>

Adicionalmente, têm surgido evidências que apontam para novas aplicações dos corpos polares, nomeadamente na deteção de doenças de hereditariedade mitocondrial e na aplicação de novas técnicas, como a sequenciação *single-cell whole-genome*. Contudo, é uma questão central assegurar a concordância entre as alterações deduzidas através da análise dos corpos polares e o ovócito correspondente, bem como determinar se as alterações epigenéticas presentes nos corpos polares e no ovócito são ou não idênticas.<sup>21</sup>

### **Biópsia de corpos polares**

A abertura não traumática da zona pelúcida e a extração de corpos polares íntegros num *timing* correto, correspondem a passos essenciais para correta realização de DPI, uma vez que a lesão do ovócito durante a técnica pode levar à sua perda e a integridade dos corpos polares é essencial para o seu correto diagnóstico genético.<sup>19,27,31</sup>

Historicamente, a abertura da zona pelúcida para biópsia de corpos polares era efetuada mecanicamente, como descrito pela primeira vez por Verlinsky *et al.*. Este método é seguro e eficaz. No entanto, outras técnicas foram desenvolvidas, sendo atualmente possível efetuar uma abordagem mecânica, química ou assistida por laser.<sup>14,22,31</sup>

A abertura mecânica da zona pelúcida consiste na realização de uma incisão longitudinal com aproximadamente 30-40 µm (abordagem convencional) ou na realização de duas incisões perpendiculares (abordagem tridimensional). Estas abordagens permitem o acesso ao espaço perivitelino, possibilitando a aspiração dos corpos polares com recurso a capilares de vidro. Estudos realizados para avaliar a eficácia desta técnica não encontraram diferenças significativas a nível da idade gestacional, tipo de parto, peso e comprimento à nascença, anomalias congénitas ou desenvolvimento pós-natal aquando da utilização destas técnicas.<sup>27,32</sup>

A abertura química da zona pelúcida utiliza ácido de Tyrode (com um pH de 2,3) para criar uma abertura maior, cujo tamanho nem sempre é controlável. Ainda não é claro se a exposição a ácido pode interferir com o desenvolvimento embrionário e implantação subsequentes, questionando-se se a digestão química das glicoproteínas da matriz da zona pelúcida poderá comprometer a viabilidade do ovócito. Esta técnica, apesar de ter sido descrita por alguns autores como sendo inapropriada, continua ainda a ser utilizada.<sup>27,33</sup>

A abertura da zona pelúcida assistida por laser foi introduzida no início da década de 90 como forma alternativa para penetração da zona pelúcida e manipulação de embriões, sendo posteriormente aplicada à biópsia de corpos polares. Atualmente são utilizados sistemas de laser de díodo de infravermelho sem contacto, uma vez que não estão associados a potencial teratogénico, ao contrário dos laser de radiação ultravioleta. A dimensão da abertura pode ser definida com grande precisão, variando o tempo de exposição. Vários estudos demonstraram a ausência de efeitos adversos da utilização desta técnica quer a nível do desenvolvimento embrionário, quer a nível da taxa de implantação e gravidez. Também a taxa de lise do ovócito



após o procedimento foi avaliada, concluindo-se não ser superior à verificada com as técnicas de ICSI.<sup>27,33</sup> Contudo, a taxa de traumatismo do ovócito não é inexistente, rondando os 0,5% a 1%.<sup>8</sup> A abordagem assistida por laser é mais simples, tendo uma menor curva de aprendizagem, não tendo sido encontradas diferenças estatisticamente significativas em relação à abordagem mecânica tridimensional, pelo que a generalização desta técnica poderá ser benéfica.<sup>31,32</sup>

Através de uma das técnicas previamente abordadas, a zona pelúcida é aberta e o CPI é aspirado. O ovócito é então inseminado, aguardando-se até à formação do pronúcleo e extrusão do CPII, sendo este removido de forma semelhante ao CPI.<sup>22</sup> No caso de se pretender a remoção simultânea do CPI e CPII, o ovócito é mantido numa posição que permita que os corpos polares se localizem aproximadamente à 1 hora. É então efetuada uma abertura entre a 1 e as 2 horas, permitindo a extração simultânea de ambos os corpos polares.<sup>19</sup>

O CPI pode ser removido do ovócito, no dia da recolha deste, entre 36 a 42 horas após injeção de gonadotrofina coriônica humana (hCG). O CPI e CPII podem ser removidos simultaneamente até às 22 horas após a inseminação, uma vez que a partir das 22 horas, é provável que ocorra degeneração do CPI. Apesar da fiabilidade destas técnicas, a biópsia embrionária pode ser necessária para confirmar os resultados da biópsia de corpos polares.<sup>14</sup>

### **Deteção de anomalias genéticas**

Vários métodos têm sido aplicados à deteção de anomalias genéticas e cromossómicas, através da análise de corpos polares. Estes métodos são essencialmente semelhantes aos utilizados para as técnicas de DPI em geral e baseiam-se em três tipos de técnicas: FISH, PCR e CGH. As técnicas de FISH permitem detetar anomalias cromossómicas através da utilização de sondas marcadas com fluorescência, que se ligam a determinadas sequências alvo. Deste

modo, são utilizadas principalmente para detecção de situações de aneuploidia. Contudo, estas técnicas permitem a hibridização de um número limitado de sondas (cerca de 5 a 6 sondas por ensaio), permitindo o diagnóstico de aneuploidias associadas apenas a um número reduzido de cromossomas. Contrariamente, as técnicas de PCR permitem a amplificação do material genético e são utilizadas principalmente para detecção de anomalias monogénicas, com uma sensibilidade superior às técnicas tradicionais de FISH. Mais recentemente, foram desenvolvidas técnicas de CGH, que têm sido cada vez mais utilizadas devido ao seu elevado potencial de diagnóstico e à maior rapidez de execução, o que permite evitar a necessidade de recorrer a técnicas de criopreservação do material genético. Esta técnica permite avaliar a totalidade do genoma dos corpos polares.<sup>19,21,34</sup>

Para todas as técnicas envolvendo amplificação de ADN, é necessário evitar a possível presença de ADN exógeno, uma possível fonte de contaminação e de obtenção de falsos diagnósticos ou de resultados inconclusivos. É também necessário recorrer a técnicas que minimizem o risco de ocorrência de ADO ou de outros erros diagnósticos, tais como a escolha dos *primers* e polimerases de ADN mais indicadas para cada situação; o recurso a marcadores específicos, ligados ou não, às mutações em causa e ainda garantir a eficácia dos processos de amplificação, sendo recomendado uma eficácia de pelo menos 90%.<sup>34,35</sup>

Devido à delicadeza, importância e dificuldade técnica dos procedimentos realizados, é compreensível que todos os profissionais envolvidos na sua realização devem ser devidamente qualificados e experientes.<sup>36</sup>

Contudo, mesmo com uma equipa experiente e seguindo todas as medidas de segurança recomendadas, na maioria dos casos é aconselhado ao casal a confirmação do resultado do DPI através de métodos de DPN, principalmente em casos mais graves ou complexos.<sup>3,36</sup>

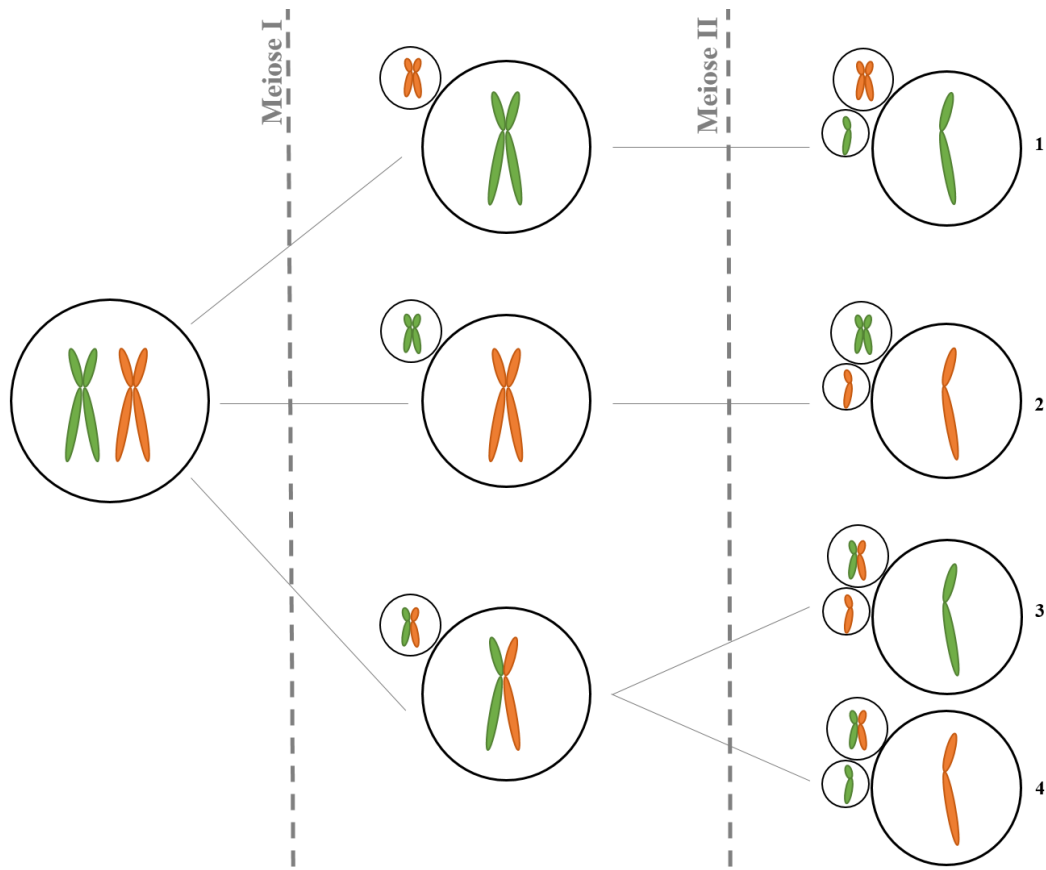
As técnicas de DPI em geral, englobando também o DPI em corpos polares, são ainda pouco regulamentadas, pelo que se justifica a realização de novos estudos comprovando a

eficácia das técnicas disponíveis, de forma a poder elaborar *guidelines* acerca dos melhores métodos a utilizar para cada situação.<sup>35</sup>

### **Seleção de ovócitos**

O DPI em corpos polares permite a análise genética indireta do ovócito de forma a deduzir a contribuição genética materna para o embrião.<sup>21</sup> Inicialmente, apenas o CPI foi testado, com base no princípio de que, na ausência de *crossing-over*, o seu material genético seria complementar ao do ovócito. Desta forma, o ovócito seria homocigoto para o alelo não contido no CPI.<sup>21,22</sup> Conclui-se, no entanto, que o genótipo do ovócito não seria corretamente deduzido na ausência de informação referente à segunda divisão meiótica. Esta informação pode ser obtida através da análise do CPII, utilizado para validar as anomalias detetadas no CPI e para detetar defeitos decorrente da MII ou existência de *crossing-over* entre cromossomas homólogos.<sup>21,37</sup>

No caso de defeitos monogénicos, na ausência de ocorrência de *crossing-over*, o CPI será portador de dois alelos do gene mutado, correspondendo a um ovócito normal, ou portador de dois alelos do gene normal, correspondendo a um ovócito portador da mutação. Quanto o CPI apresenta um alelo mutado e um alelo normal, indica a ocorrência de *crossing-over*. Neste caso, se o CPII for normal, significa que o alelo mutado está presente no ovócito. Pelo contrário, se o alelo mutado estiver presente no CPII, o ovócito será normal.<sup>8</sup> Os princípios utilizados para a seleção de ovócitos para doenças monogénicas estão esquematizados Figura 2. Neste caso, apenas os ovócitos número 1 e 3 não possuem o alelo mutado, tendo potencial para originar embriões não afetados.



**Figura 2:** Seleção de ovócitos em doenças monogénicas. A laranja cor laranja representa os cromossomas contendo o alelo mutado e a cor verde representa os cromossomas contendo o alelo não mutado. [Adaptado de 22]

O mesmo princípio pode ser utilizado para as anomalias cromossómicas, onde o ganho de um ou mais cromossomas nos corpos polares, se reflete na perda desses mesmos cromossomas no ovócito e vice-versa.<sup>18</sup>

Depois de selecionados os ovócitos livres de mutação, procede-se à fecundação e o desenvolvimento *in vitro* prossegue até ao momento adequado para a implantação no útero materno. Desta forma, evita-se a formação de embriões afetados, com posterior necessidade da sua destruição.<sup>22</sup>

## Resultados

A biópsia de corpos polares é uma técnica segura, não compromete a qualidade do embrião resultante e permite deduzir o genoma do pronúcleo do ovócito através da sequenciação dos genomas do CPI e CPII. Como foi já referido anteriormente, é importante frisar que as técnicas de biópsia de corpos polares não exercem dano aparente no ovócito. Vários estudos comprovaram a eficácia da análise de corpos polares, demonstrando uma elevada taxa de sucesso diagnóstico, sem diferenças significativas em relação aos outros tipos de abordagens (biópsia de blastómeros ou trofoblastos).<sup>21,24,34,38</sup>

Num estudo publicado em 2011 por Kuliev e Rechitsky para deteção de doenças de hereditariedade mendeliana através da biópsia de corpos polares, observaram-se 2 diagnósticos errados em 790 ciclos de DPI realizados, correspondendo a uma precisão diagnóstica de 99,7%. Esta percentagem foi concordante com o valor global obtido por estes mesmos autores, de 99,4%.<sup>22</sup> Este resultado é ainda concordante com um estudo publicado em 1999, por Rechitsky *et al.*, onde o diagnóstico obtido por corpos polares foi confirmado em 98% dos embriões resultantes.<sup>39</sup> Num estudo de Altarescu *et al.*, foi obtida uma taxa de sucesso no diagnóstico de 96% através da biópsia de corpos polares, valor semelhante ao encontrado com realização de biópsia de blastómeros.<sup>24</sup> Num estudo de Geraedts *et al.*, onde foram utilizados *arrays* de CGH para comparação do estado de ploidia dos corpos polares com os respetivos ovócitos, foi obtida uma taxa de concordância de 94%.<sup>40</sup>

Não foi observada diminuição significativa na taxa de fecundação nem na taxa de desenvolvimento de embriões provenientes de ovócitos sujeitos a biópsia de corpos polares, em relação com ovócitos controlo (não sujeitos a biópsia), o que sugere não existir efeito deletério da micromanipulação e biópsia de corpos polares no desenvolvimento embrionário

subsequente. Da mesma forma, não se observou alteração significativa na taxa de implantação e desenvolvimento de uma gravidez de termo, em relação com as restantes técnicas de PMA.<sup>41</sup>

Num estudo recente publicado pela ESHRE, observou-se uma melhoria global na taxa de gravidez por ciclo de DPI, atingindo um valor global de 23%. Neste estudo, não houve alteração significativa na idade média das mulheres sujeitas a ciclos de DPI, das indicações para realização de DPI, do número de ovócitos removidos nem do número de embriões e ovócitos sujeitos a biópsia em relação a estudos anteriores publicados pela mesma entidade, o que sugere que pode ter ocorrido uma melhoria na execução e na segurança deste tipo de técnicas. No caso do DPI através de biópsia de corpos polares, centros experientes na realização desta técnica apresentam taxas de gravidez comparáveis às taxas atingidas em ciclos de DPI através de biópsia de blastómeros.<sup>7,16</sup>

Na maioria dos casos, os erros de diagnóstico, resultaram de falhas de amplificação e hibridização ou de amplificação preferencial de um alelo. Apesar de ser raro, a contaminação ou fragmentação dos corpos polares podem ser causas de diagnósticos errados ou inconclusivos. Contudo, a estimativa da taxa de erros de diagnóstico é difícil de realizar, uma vez que muitos dos embriões transferidos não resultam em gravidez e, dos que resultam, nem todos são seguidos posteriormente ao nascimento para confirmação do resultado.<sup>12,40</sup>

Os dados apresentados permitem assim concluir que o DPI em corpos polares é um método de diagnóstico seguro e eficaz, indicado essencialmente para casais com elevado risco genético, de forma a evitar a transmissão de anomalias genéticas e cromossómicas de origem materna à sua descendência, sem a ansiedade associada à espera pelo resultado do DPN e à possibilidade de recorrer à interrupção médica da gravidez no caso de este diagnóstico revelar um feto afetado.<sup>42</sup>

## Vantagens

A utilização de corpos polares para realização de DPI difere dos restantes métodos de DPI essencialmente pelo facto de utilizar como método de obtenção de material genético corpos polares, em vez de células embrionárias. Desta forma, apresentará todas as vantagens associadas às técnicas de DPI em geral, já abordadas anteriormente, pelo que se seguem as vantagens inerentes apenas às particularidades da utilização de corpos polares.

A presença de corpos polares corresponde a uma característica única dos gâmetas femininos. Estas células podem ser removidas sem provocar a destruição do ovócito.<sup>21</sup>

Após extrusão, os corpos polares são considerados material genético extracelular, sem função biológica conhecida. Assim, a sua remoção não deverá interferir com a fecundação e desenvolvimento embrionário. Pelo contrário, foi já levantada a questão da possível interferência da biópsia embrionária no desenvolvimento embrionário subsequente, tendo-se já observado que a extração de 1 ou 2 blastómeros pode mesmo resultar numa diminuição do potencial de implantação dos embriões.<sup>8,20,43</sup> Num estudo realizado em embriões de ratos, verificou-se também que a remoção de blastómeros tem efeitos deletérios no desenvolvimento do embrião, sugerindo a necessidade de maior estudo sobre o seu efeito sobre embriões humanos.<sup>44</sup> Contudo, num estudo realizado em 2011, é relatado que a biópsia embrionária não tem efeitos adversos sobre a implantação do embrião ou desenvolvimento da gravidez, pelo que se verifica que este assunto está ainda envolto nalguma controvérsia.<sup>14</sup>

O DPI em corpos polares é a única forma de DPI que permite a realização de um diagnóstico antes do final do processo de fecundação. Em particular, a biópsia isolada do CPI pode mesmo ser realizada antes da fecundação, ou seja, um verdadeiro diagnóstico pré-concepcional. Desta forma, para alguns casais, esta técnica apresenta-se como sendo mais atrativa, uma vez que não envolve a disrupção do embrião, possibilitando a realização de um

diagnóstico pré-embrionário, ao contrário das outras técnicas utilizadas, sendo assim ultrapassadas algumas das objeções morais, sociais e religiosas impostas. Este é, até hoje, o principal argumento a favor da utilização do DPI em corpos polares.<sup>14,19,21,22</sup>

Também a nível legal, alguns países impõem algumas restrições à realização de DPI, uma vez que as suas leis proíbem a realização de biópsia de blastómeros ou onde a aplicação desta técnica resulta em situações que violam a lei, como por exemplo a formação e necessidade de eliminação de embriões excedentários. Nestes países, a biópsia de corpos polares é o único método aceite para realização de qualquer tipo de diagnóstico genético.<sup>19</sup>

Nos países onde é permitida a realização de biópsia até imediatamente antes da fusão dos pronúcleos, é permitida a análise tanto do CPI como do CPII. Contudo, a janela para realização de biópsia é apertada, uma vez que decorrem no máximo 20 horas entre a penetração do espermatozoide e aparecimento do pronúcleo.<sup>8</sup>

Adicionalmente, a janela temporal para realização de testes genéticos desde a extrusão dos corpos polares até à formação do blastocisto é de 4 a 6 dias, em comparação com uma janela temporal de 2 a 3 dias quando se biopsia um embrião de 6 a 8 células. Desta forma, esta técnica permite despender mais tempo com a aplicação das técnicas de diagnóstico e evitar a necessidade de recorrer a técnicas de criopreservação.<sup>8,20,29</sup>

O mosaicismo cromossómico surge devido a erros na segregação dos cromossomas nas primeiras divisões mitóticas que ocorrem após a fecundação. Estima-se que entre 40% e 60% dos embriões sejam mosaicos, ou seja, que contenham mais do que uma linhagem celular, o que pode levar a erros diagnósticos quando se utilizam células embrionárias para DPI, principalmente se um número reduzido de células for utilizado. A biópsia de corpos polares permite eliminar o risco de falsos diagnósticos devido a mosaicismo pós-zigótico, uma vez que é realizada previamente à primeira divisão mitótica.<sup>14,45,46</sup>



Apesar de constituir ao mesmo tempo uma limitação da técnica, o facto de permitir apenas a análise do material genético materno constitui também uma vantagem (no caso do risco de transmissão de doença estar presente apenas no constituinte feminino do casal), porque os marcadores genéticos são mais facilmente identificáveis, uma vez que apenas os alelos maternos estão presentes.<sup>24,28,29</sup>

Finalmente, uma vantagem desta técnica prende-se com o facto de que, caso a análise genética dos corpos polares se revele inconclusiva ou no caso de fragmentação ou perda dos corpos polares, pode ainda ser realizada a biópsia de blastómero, para confirmação do resultado, não sendo necessário eliminar o ovócito recém-fertilizado face a um resultado duvidoso.<sup>24,28,29,47</sup> Tal facto mostra-se particularmente importante no caso de mulheres com idade materna avançada, cujo número e qualidade dos ovócitos disponíveis é demasiado reduzido para considerar a realização de biópsia embrionária.<sup>46</sup>

## **Limitações**

Uma desvantagem óbvia da técnica de DPI em corpos polares é o facto de o material genético analisado ser proveniente apenas da mãe, não permitindo avaliar qualquer tipo de contribuição paterna. Desta forma, no caso de haver risco de transmissão paterna de uma doença hereditária, a realização de DPI em gâmetas não é possível, uma vez que não existe ainda forma de testar o material genético do espermatozoide, previamente à fecundação. Desta forma, os corpos polares não podem ser utilizados para seleção de género no caso de doenças de hereditariedade ligada ao X, doenças hereditárias dominantes cujo progenitor afetado é o pai ou doenças para as quais a anomalia é transmitida por via paterna.<sup>8,20,22</sup>

É importante salientar também o facto de, no caso de doenças autossómicas recessivas, o DPI em corpos polares poder levar à exclusão de ovócitos portadores da mutação que, no caso da não herança paterna dessa mesma mutação, iriam originar portadores saudáveis. Tal não acontece com a biópsia de células embrionárias, uma vez que há possibilidade de avaliar também a contribuição paterna.<sup>48</sup>

Como foi já referido, a análise isolada do CPI não permite detetar os erros ocorridos na MII, não permitindo fazer um correto exercício dedutivo. Desta forma, a análise sequencial ou simultânea do CPII permite aumentar substancialmente a eficácia na deteção de anomalias genéticas e cromossómicas. No entanto, desta forma perde-se o argumento da realização de um diagnóstico verdadeiramente pré-concepcional, uma vez que para que ocorra a extrusão do CPII é necessário dar início ao processo de fecundação do ovócito pelo espermatozoide. Apesar de o embrião ainda não estar formado, pode argumentar-se que a fecundação já foi iniciada, contrariando o objetivo moral inicialmente apresentado.<sup>8,22</sup>

Esta mesma linha de pensamento mantém-se para a ocorrência de ADO, *crossing-over* ou recombinação genética, situações que não podem ser detetadas eficazmente com a análise isolada do CPI, mas cuja ocorrência pode ser detetada através da análise sequencial do CPII.<sup>20</sup>

No caso de avaliação de situações de aneuploidia, com a análise de corpos polares não é possível detetar erros pós-zigóticos que ocorram durante as divisões mitóticas, uma fonte importante de anomalias cromossómicas.<sup>22,29</sup>

Acresce que o diagnóstico em corpos polares (principalmente quando envolve a análise sequencial do CPI e do CPII) é oneroso e demorado, quando comparado com as outras técnicas de DPI.<sup>28</sup>

As limitações associadas com a necessidade de realização de técnicas de PMA são transversais a todas as técnicas de DPI, não sendo o DPI em corpos polares exceção. Desta

forma, é importante salientar o relativo insucesso de cada ciclo de DPI e o risco acrescido de ocorrência de gestações gemelares.<sup>42</sup>

## **Indicações atuais**

### **Doenças monogénicas**

A aplicação clínica de técnicas de DPI para doenças monogénicas foi descrita pela primeira vez no início da década de 90 por Handyside *et al.*. Desde então, mais de 5000 doenças monogénicas foram identificadas, no entanto, o DPI foi aplicado apenas nalgumas centenas delas, devido à necessidade de desenvolvimento de protocolos específicos para cada tipo de mutação, muitas vezes personalizados para cada família. Dentro das técnicas de DPI, a utilização de corpos polares, através da análise do CPI e CPII é considerada um método eficaz, que permite o DPI de doenças monogénicas com uma elevada precisão.<sup>29,39,49</sup>

O DPI em corpos polares corresponde a uma técnica bem estabelecida, altamente eficiente e fidedigna, para diagnóstico pré-embriónico de doenças de hereditariedade mendeliana, particularmente autossómica recessiva, autossómica dominante e de hereditariedade ligada ao X, tendo já sido efetuado num elevado número de doenças (Tabela 1, em anexo).<sup>22</sup>

As doenças autossómicas recessivas correspondem a uma das indicações mais frequentes para realização de DPI em corpos polares, uma vez que a pré-seleção de ovócitos livres de mutação é suficiente para garantir a origem de embriões livres de doença, já que mesmo que a mutação esteja presente no componente genético paterno, devido ao padrão recessivo, a doença não se irá manifestar no indivíduo resultante.<sup>22</sup>

As doenças de hereditariedade ligada ao X correspondem também a uma das principais indicações para realização de DPI em corpos polares. Inicialmente, a transmissão de doenças com este tipo de hereditariedade era evitada através da seleção de embriões de sexo feminino. No entanto, desta forma eram eliminados cerca de 50% de embriões masculinos saudáveis, facto pouco aceite ética e moralmente por muitos casais. Quando a mutação é de transmissão materna, a análise genética do CPI e do CPII permite seleccionar ovócitos com um cromossoma X normal, permitindo assim a implantação de embriões sem anomalia, independentemente do sexo.<sup>22,50</sup>

Também as doenças autossómicas dominantes são passíveis de deteção através de DPI em corpos polares, no entanto, apenas quando a origem da doença é exclusivamente materna.<sup>22</sup>

As situações de mutações de novo de origem materna constituem um desafio à realização de DPI, uma vez que o haplótipo (mutação e marcadores genéticos a ela associados para minimização do risco de ADO) associado à doença não é conhecido. Contudo, a amplificação simultânea de múltiplos marcadores genéticos em conjunto com a mutação, baseados na análise do CPI e CPII, permite a construção de um haplótipo familiar, permitindo desta forma a realização do diagnóstico genético e seleção de ovócitos livres de mutação.<sup>49</sup>

### **Anomalias cromossómicas numéricas e estruturais**

A deteção de anomalias cromossómicas, numéricas e estruturais, constitui também uma das principais aplicações do DPI em corpos polares. Esta análise é particularmente pertinente em casais com elevado risco de originar descendência com anomalias cromossómicas, como a presença de translocações equilibradas, idade materna avançada, história prévia de aneuploidia na descendência ou abortos espontâneos recorrentes.<sup>19,41</sup>

As anomalias estruturais correspondem essencialmente a translocações de uma porção de um cromossoma para outro e as mulheres portadoras destas translocações, normalmente têm

uma constituição genética equilibrada. No entanto, durante a segregação cromossômica meiótica existe um alto risco de formação de gâmetas com uma constituição genética desequilibrada, originando anomalias na descendência. Nestes casos, o DPI em corpos polares pode ser útil para selecionar ovócitos normais ou portadores da alteração equilibrada.<sup>8,10,19</sup>

Mais de 90% das anomalias cromossômicas numéricas são de origem materna, resultantes maioritariamente de erros meióticos. A frequência de ocorrência de aneuploidia nos ovócitos é dependente da idade, existindo um aumento marcado a partir dos 35 anos e estimando-se que, aos 40 anos, aproximadamente 70% dos ovócitos maduros sejam aneuploides. Para além do risco de gerar uma criança como uma anomalia cromossômica, as aneuploidias constituem também uma das principais causas de abortos espontâneos e de não implantação do embrião, diminuindo a taxa de gravidez. Uma vez que se sabe que a contribuição paterna é relativamente pequena para o desenvolvimento de embriões aneuploides, é possível avaliar apenas os erros meióticos femininos, especificamente através da análise de corpos polares.<sup>19,46,51,52</sup>

Segundo um estudo realizado por Geraedts *et al.*, o estado de ploidia dos corpos polares foi concordante com o respetivo zigoto em 94% dos casos, indicando que o estado de ploidia do zigoto pode ser previsto através da análise de corpos polares com uma exatidão aceitável. Desta forma, esta estratégia de DPI apresenta-se como uma técnica globalmente aceite para diagnóstico de aneuploidias, selecionando apenas os ovócitos euploides.<sup>20,34,53</sup>

### **Suscetibilidade genética para cancro**

A identificação de genes associados a predisposição para desenvolvimento de cancro hereditário, o aumento do acesso a testes genéticos e o aumento da sobrevivência de doentes oncológicos tem aumentado a discussão sobre as opções reprodutivas deste tipo de doentes. Um tema particularmente debatido é a possibilidade de realização de DPI, de forma a evitar a

transmissão de um risco aumentado de desenvolvimento de uma doença oncológica à descendência. Depois da identificação de uma mutação específica associada ao aumento do risco de cancro hereditário numa família, esta pode ser pesquisada na descendência recorrendo a técnicas de DPN ou DPI. Dentro das técnicas de DPI, a utilização de corpos polares surge como uma das técnicas passíveis de utilização. A maioria destas mutações induz um risco aumentado de vir a desenvolver cancro, mas não um risco absoluto, uma vez que a maioria delas possui uma penetrância incompleta. Além disso, a idade de desenvolvimento da doença é habitualmente mais tardia, na idade adulta. Desta forma questiona-se a validade ética da execução de técnicas de DPI, pelo que a sua utilização para síndromes de predisposição de cancro hereditário, ainda não é consensual.<sup>4</sup>

### **Situações complexas**

Em situações complexas, pode ser necessário recorrer à associação de técnicas de DPI, de forma a assegurar a implantação apenas de embriões não afetados. Também no caso de coexistir risco paterno de transmissão de uma doença genética, no caso de se optar pela realização de biópsia de corpos polares para estudo do componente materno, torna-se impreterível a realização de uma técnica de biópsia embrionária, para estudo do componente paterno.<sup>22</sup>

Contudo, ao contrário do que se poderia esperar, a biópsia de corpos polares seguida de biópsia embrionária não parece diminuir a taxa de gravidez, quando comparada com a utilização de cada uma das técnicas individualmente, pelo que, nestes casos, a utilização de ambas as técnicas não parece ser desvantajosa.<sup>7,22</sup>

## **Perspetivas futuras**

Nos últimos anos, observou-se uma rápida evolução na área do DPI, quer a nível das tecnologias utilizadas, quer a nível do número de indicações e do crescente acesso dos casais com problemas reprodutivos a este tipo de técnicas.<sup>54</sup>

### **Deteção de doenças de hereditariedade mitocondrial**

A análise de corpos polares pode ser utilizada para pesquisa de doenças de hereditariedade mitocondrial. Em teoria, todo o ácido desoxirribonucleico mitocondrial (mtADN) é de herança materna e, normalmente, os indivíduos possuem um único genótipo de mtADN, situação denominada de homoplasmia. Contudo, nalguns indivíduos existe mais do que um genótipo na mesma célula, situação denominada de heteroplasmia, que afeta a expressão fenotípica. No caso das mutações associadas a doenças mitocondriais, estas manifestam-se essencialmente em heteroplasmia. Para a manifestação fenotípica da doença, tem de ser atingido um limiar crítico de heteroplasmia, que depende do tipo de mutação e do tecido que esta irá afetar. Uma vez que a segregação mitocondrial ocorre de forma aleatória durante a meiose, não é possível prever o nível de heteroplasmia da descendência com base no nível materno. As técnicas de DPI pretendem assim seleccionar ovócitos livres de mutação, através da análise do nível do seu heteroplasmia. Para isso, é um pré-requisito óbvio da técnica que o nível de heteroplasmia nas células analisadas (neste caso os corpos polares) seja um indicador fidedigno do nível de heteroplasmia no embrião.<sup>20,21,55</sup>

Uma vez que a segregação mitocondrial ocorre de forma aleatória, seria de esperar que o conjunto aleatório de mitocôndrias presente nos corpos polares seria semelhante ao que permanece no ovócito. No entanto, existe alguma controvérsia acerca da correlação entre os níveis de heteroplasmia encontrados nos corpos polares e nos embriões correspondentes. Num

estudo realizado em modelos animais por Neupane *et al.*, a correlação encontrada foi apenas modesta, coincidindo com alguns estudos realizados em humanos, o que deixa algumas dúvidas sobre a aplicabilidade da análise de corpos polares para deteção de anomalias genéticas mitocondriais.<sup>21,55</sup>

### **Sequenciação *single-cell whole-genome***

Neste contexto evolutivo também os corpos polares podem ter múltiplas novas aplicações na tecnologia de reprodução medicamente assistida. Um novo campo de aplicação está a surgir com o desenvolvimento de técnicas de sequenciação *single-cell whole-genome*. Esta técnica, quando aplicada aos corpos polares, permite identificar variantes genéticas raras, que podem ser tão importantes como outras variantes já identificadas, como por exemplo os SNPs relacionados com doenças monogénicas. Em teoria, é possível deduzir o genótipo do ovócito de forma a prever a suscetibilidade individual a uma determinada doença. No entanto, colocam-se questões importantes, nomeadamente quais as variações relevantes em cada portador e quais delas poderiam prever o potencial de desenvolvimento ou suscetibilidade a uma determinada doença. Estas técnicas vieram encorajar uma maior exploração do verdadeiro potencial dos corpos polares na medicina reprodutiva. Contudo, está bem estabelecido que existe ainda um longo caminho a percorrer até à sua aplicação à biologia e medicina reprodutiva, com um impacto clínico substancial.<sup>21</sup>

### **Rastreio genético pré-implantação**

A maioria dos ciclos de PMA não culmina num resultado final satisfatório: a conceção de uma criança. Uma das principais causas para esta taxa relativamente baixa de gravidez nos ciclos de reprodução medicamente assistida é a presença de anomalias cromossómicas nos embriões gerados.<sup>56</sup>



Atualmente, como tentativa de melhorar a taxa de sucesso dos ciclos de PMA, a maioria dos embriões produzidos é submetida a avaliação morfológica ou morfodinâmica, com o intuito de identificar e transferir os embriões com maior potencial de originar uma gestação viável. Alguns dos parâmetros morfológicos avaliados e possivelmente relacionados com a viabilidade do embrião são o número de blastómeros, a multinucleação, a fragmentação embrionária e a formação de um blastocisto. Contudo, estes métodos são pouco preditivos da taxa de implantação e não existe uma correlação bem estabelecida entre a existência de aneuploidias no embrião e a sua morfologia.<sup>56-59</sup>

A taxa de aneuploidia em ovócitos e embriões humanos é extremamente elevada e o seu aumento tem uma relação bem estabelecida com o aumento da idade materna, podendo atingir valores na ordem dos 30 a 40% dos ovócitos analisados.<sup>38,42,57,60</sup> Quando se avalia a taxa de aneuploidia em gravidezes estabelecidas, esta varia entre 2% a 3% em mulheres entre os 20 e os 25 anos e 35% em mulheres com mais de 40 anos de idade.<sup>60</sup> Os defeitos genéticos relacionados com a idade resultam numa taxa de aneuploidia na descendência mais elevada, particularmente para os cromossomas 13, 18, 21, X e Y, com aumento da taxa de abortos espontâneos e redução da taxa de implantação.<sup>57</sup>

Desta forma, foi sugerido que os embriões formados através de técnicas de PMA deveriam ser testados para anomalias cromossómicas, previamente à sua implantação. Para isso, foi desenvolvido o Rastreio Genético Pré-Implantação (RGPI), como método de seleção dos ovócitos a implantar, de forma a melhorar os resultados obtidos. O RGPI baseia-se na colheita de material genético através de biópsia de corpos polares, biópsia de blastómeros (em embriões em estágio de clivagem) ou biópsia de células da trofoectoderme (em blastocistos), segundo princípios semelhantes aos utilizados para as técnicas de DPI. A biópsia é seguida de análise citogenética, de forma a seleccionar os ovócitos ou embriões euploides. O RGPI difere das tradicionais técnicas de DPI, uma vez que é utilizado em casais em que nenhum dos

elementos possui qualquer tipo de alteração genética ou cromossômica conhecida.<sup>38,56,60,61</sup> Por este motivo, esta técnica foi também denominada por alguns autores como “DPI de baixo risco”.<sup>36</sup>

Os primeiros casos de sucesso obtidos através do uso das técnicas de RGPI foram descritos por Verlinsky *et al.*, através do rastreio de aneuploidias com recurso a sondas de FISH para os cromossomas X, Y, 18, 13 e 21. Em teoria, assegurando a normalidade cromossômica dos embriões transferidos, seria de esperar um aumento da taxa de implantação, diminuição da taxa de aborto espontâneo e redução do risco de nascimento de uma criança afetada com patologias associadas à ocorrência de aneuploidia. No entanto, mesmo com a implantação de um embrião cromossomicamente normal, não é possível assegurar o estabelecimento de uma gravidez viável.<sup>38,60</sup>

Os estudos iniciais, utilizando técnicas de FISH, revelaram resultados muito pouco promissores, possivelmente devido ao número limitado de cromossomas avaliados por esta técnica e às possíveis implicações da própria biópsia e das técnicas de micromanipulação. Estudos mais recentes, utilizando técnicas de CGH e PCR, revelaram um aumento nas taxas de gravidez após seleção embrionária, provavelmente devido à possibilidade de estudo de todos os cromossomas.<sup>58</sup>

Assim, apesar de alguma controvérsia inicial, atualmente é sugerido que o RGPI poderá ser benéfico, com melhoria da seleção de embriões viáveis e consequente aumento da taxa de implantação e diminuição da taxa de abortos espontâneos. Desta forma, algumas indicações para realização de RGPI têm sido a idade materna avançada, falhas na implantação recorrentes e abortos frequentes. No entanto, impõe-se a necessidade de realizar mais estudos randomizados e controlados, de forma a assegurar a aplicabilidade destas técnicas, avaliar a sua relação custo-benefício e determinar a melhor abordagem para remoção de material genético, bem como quais os métodos de análise genética mais indicados.<sup>38,56,60,62</sup>

Quanto à abordagem para recolha de material genético, uma vez que cerca de 90% das aneuploidias humanas têm origem materna, particularmente em erros meióticos, a biópsia de corpos polares foi considerada apropriada para realização de RGPI. Esta abordagem mostra-se também favorável, uma vez que não existe mosaicismo no estágio de ovócito ou zigoto, ao contrário do que ocorre nos estádios embrionários utilizados para biópsia, o que pode levar à realização de diagnósticos errados.<sup>59,60</sup>

Uma vez que os erros meióticos ocorrem quer na MI, quer na MII a análise do CPI e do CPII está indicada, uma vez que a análise isolada do CPI levaria à implantação de embriões aneuploides devido a erros não detetados na MII.<sup>37,58</sup>

A utilização de corpos polares apresenta à partida algumas desvantagens óbvias em relação às técnicas de diagnóstico embrionário, nomeadamente o facto de ser uma técnica onerosa e não avaliar as aneuploidias de origem paterna.<sup>58,59</sup>

Contudo, o RGPI com recurso a corpos polares parece apresentar uma tendência para melhores resultados de implantação após técnicas de PMA. No entanto, o benefício da seleção deve ultrapassar qualquer dano ou prejuízo causado pelas técnicas de micromanipulação. Uma vez que existem ainda alguns resultados inconclusivos ou contraditórios, possivelmente devido ao escasso número de estudos realizados, muitos dos quais baseados em técnicas de FISH, com pesquisa de um número limitado de cromossomas, impõe-se mais investigação, de forma a melhor determinar o papel dos corpos polares nas técnicas de RGPI.<sup>61</sup>

Adicionalmente, é importante referir que a pré-seleção de embriões viáveis não pode ser obtida apenas através do rastreio de anomalias nucleares. Também características citoplasmáticas indicadoras da maturidade dos ovócitos e embriões devem ser tidas em conta, como por exemplo a variação no conteúdo de mitocôndrias, que comprovadamente pode afetar a funcionalidade dos gâmetas e dos embriões resultantes.<sup>38,63</sup> O número de mitocôndrias pode dar indicação acerca da disponibilidade bioenergética dos ovócitos, uma vez que este organelo

é o responsável pela produção da maioria da energia essencial para os processos metabólicos nestas células. Também neste campo, a utilização dos corpos polares como método de rastreio pré-implantação foi proposta. Num estudo desenhado para quantificar o mtADN em corpos polares e embriões, os corpos polares provenientes de mulheres com idade mais avançada (entre os 38 e os 45 anos) revelaram a presença de menor quantidade de mtADN, em comparação com mulheres mais novas. Este facto correlacionou-se com um nível mais elevado de mtADN nos blastocistos resultantes. Verificou-se também que cerca de 25% dos blastocistos sem anomalias cromossómicas que não foram bem-sucedidos na implantação após transferência para o útero, apresentavam uma quantidade excessiva de mtADN, confirmando que esta característica pode fornecer informação adicional ao rastreio de aneuploidias, contribuindo para a identificação dos embriões com melhor potencial de implantação.<sup>38,57</sup>

## IMPLICAÇÕES ÉTICAS E LEGAIS

Antes do advento do DPI, o diagnóstico genético era unicamente efetuado através de DPN, com recurso maioritariamente a biópsia de vilosidades coriônicas e amniocentese. Esta abordagem sujeita o casal à difícil decisão de, face a um diagnóstico positivo, recorrer à interrupção médica da gravidez, procedimento frequentemente acompanhado de um grande sofrimento e impacto emocional. Por motivos religiosos, éticos ou sociais, para muitas famílias a interrupção médica da gravidez não é uma opção aceitável. É também importante ter em conta que, algumas doenças, não cursam com uma redução da sobrevida ou da qualidade de vida suficientemente elevada para tornar aceitável a interrupção de uma gravidez desejada, por grande parte dos casais e da população em geral.<sup>24,29</sup>

O DPI surge neste contexto de diagnóstico precoce como uma forma de medicina preventiva, alternativa ao DPN, evitando a transmissão de anomalias genéticas à descendência, ao mesmo tempo que suprime a necessidade de recorrer a interrupção médica da gravidez.<sup>64</sup>

Contudo, o DPI não se encontra livre de objeções éticas e morais. Apesar de evitar o recurso à interrupção da gravidez, há necessidade de interromper o desenvolvimento de embriões que apresentem anomalias genéticas. Alguns autores consideram que a vida humana se inicia no momento da fecundação. Este argumento dá origem a uma das maiores questões éticas associadas ao DPI: a necessidade de eliminar embriões. Por esta ordem de pensamento, estes embriões podem já ser considerados indivíduos e, como tal, devem ser providos do mesmo tipo de proteção legal do que qualquer indivíduo após o nascimento, não devendo por isso nenhum embrião ser privado da possibilidade de implantação, nem sujeito a técnicas de diagnóstico que diminuam a sua taxa de sobrevivência. No entanto, outros autores consideram que o embrião ainda não consiste claramente num indivíduo, uma vez que é composto por um

conjunto de células indiferenciadas, em processo de divisão, pelo que não consideram a existência de objeções éticas relacionadas com a eliminação destes embriões.<sup>64</sup>

Devido a todas as questões éticas e à controvérsia que envolve estas técnicas, nem todos os países permitem a utilização da biópsia embrionária como método de DPI. Na Alemanha, os embriões adquirem o direito à vida no momento da fusão do espermatozoide com o ovócito, sendo o embrião formado após fusão dos pronúcleos materno e paterno, sensivelmente 24 horas após a inseminação. Neste contexto, a biópsia de corpos polares surge como um método de DPI que permite fazer o diagnóstico do componente genético materno, dentro do período de tempo permitido pela lei.<sup>65</sup>

No caso da biópsia do CPI, a mais vantajosa a nível ético, a biópsia é realizada previamente ao início do processo de fecundação. Contudo, a análise de ambos os corpos polares, apesar de efetuada posteriormente ao início da fecundação, ocorre antes da formação do embrião, previamente à fusão dos pronúcleos. Desta forma, esta técnica tem sido maioritariamente utilizada nalguns países onde a biópsia de embriões não é permitida por lei, como por exemplo, na Alemanha, Itália e Suíça.<sup>2,14,19,22,40,66</sup>

Para além das questões éticas referidas anteriormente, existem algumas situações envoltas numa discussão ética ainda mais complexa. Dois exemplos são as doenças de início tardio e as mutações associadas a risco acrescido de desenvolvimento de cancro hereditário. As doenças de início tardio, apesar de um enorme impacto emocional, conferem vários anos de vida livre de doença. Além disso, uma vez que a doença só se irá desenvolver anos ou mesmo décadas após o nascimento, por vezes é argumentado que se pode vir a desenvolver um tratamento ou mesmo uma cura eficaz até lá. Uma situação semelhante coloca-se com mutações associadas a risco acrescido de desenvolvimento de cancro, como no caso das mutações nos genes *BRCA 1 e 2*, associadas a síndromes hereditárias de cancro da mama e ovário. Neste caso, as técnicas de DPI selecionam embriões sem risco acrescido para desenvolvimento de cancro

hereditário. Contudo, nos indivíduos resultantes de embriões afetados, o cancro não se desenvolveria até à idade adulta, podendo mesmo não se manifestar, devido à penetrância frequentemente incompleta destas situações.<sup>5,64,65</sup>

Por fim, é importante salientar que atualmente, não é permitida a utilização de técnicas de DPI para selecionar características físicas, traços de comportamento ou inteligência e a maioria dos autores concorda que, quer as técnicas de DPI como as técnicas de DPN, devem ser utilizadas apenas para diagnóstico de condições potencialmente graves para a descendência.<sup>1,64,65</sup>

## **ACONSELHAMENTO GENÉTICO**

Desde os primeiros relatos, as técnicas de DPI desenvolveram-se substancialmente, com uma grande evolução dos procedimentos clínicos e laboratoriais, de forma a expandir o número de indicações de forma segura e reprodutível. A complexidade destas técnicas implica uma abordagem por uma equipa multidisciplinar, composta não só por profissionais da área da medicina reprodutiva e genética, como também por uma equipa de enfermagem sensibilizada para o impacto emocional deste tipo de técnicas e por profissionais da área da citogenética e biologia molecular.<sup>3</sup>

O primeiro passo para casais que consideram a realização de DPI é o aconselhamento genético. Desta forma, é possível a discussão de procedimentos importantes associados às técnicas de reprodução medicamente assistida utilizadas, dos possíveis riscos e complicações associados à estimulação ovárica e remoção de ovócitos, da duração e custo dos ciclos e de qualquer outra dúvida que o casal possa querer ver esclarecida. Outro ponto específico que deve ser esclarecido prende-se com a possibilidade de não se conseguir obter nenhum embrião saudável ou viável de forma a possibilitar a sua transferência. É também nesta fase que é determinada a natureza e severidade da anomalia genética em causa, bem como o seu risco de transmissão à descendência, de forma a avaliar se a realização de DPI é indicada, como forma de seleccionar embriões livres de anomalias e qual a melhor abordagem a utilizar. Nesta fase, os casais devem ainda estabelecer uma comparação entre o DPI e as outras alternativas reprodutivas disponíveis, tais como o DPN; doação de gâmetas; não ter filhos; aceitar o risco genético, prosseguindo para uma gravidez sem qualquer tipo de teste ou recorrer à adoção. Esta comparação permite a escolha do método reprodutivo mais adequado à situação genética e convicções morais, éticas, sociais e religiosas de cada casal.<sup>3,36</sup>



Por lidar com questões tão delicadas, este tipo de aconselhamento deve ser realizado por profissionais altamente qualificados, capazes de orientar os casais na melhor decisão a tomar e de lhes oferecer suporte emocional adequado durante e após o processo de decisão. Muitas vezes, a mera possibilidade de ter de recorrer a técnicas de DPN ou de DPI, causa um enorme impacto emocional nos casais portadores de anomalias genéticas, facto de não deve ser negligenciado aquando da realização de aconselhamento genético.<sup>9</sup>

Num estudo relacionado com casais portadores da mutação *BRCA 1* ou *BRCA 2*, com risco de transmissão de cancro da mama e ovário hereditário, a maioria dos casais indicaram que a principal razão para recorrerem a técnicas de DPI é a proteção da sua descendência do impacto físico e psicológico associado à herança da mutação. Esta perceção é variável tendo em conta as experiências pessoais e familiares de cada casal, tornando-se essencial para a decisão de recorrer a técnicas de DPI a seguinte questão: as desvantagens de transmitir a mutação à descendência ultrapassam as desvantagens associadas às técnicas de DPI? Neste mesmo estudo, observa-se ainda que vários casais que optaram por prosseguir com uma gestação sem recorrer a qualquer tipo de método de DPN ou DPI, expressaram sentimentos de dúvida ou mesmo de culpa acerca da sua decisão, por receio que a descendência herdasse a mutação e viesse mesmo a expressar a doença, de onde se infere a importância de uma discussão detalhada acerca das vantagens de desvantagens associadas a esta técnica e da escolha de um método de diagnóstico de forma individual e personalizada para cada situação.<sup>9</sup>

## CONCLUSÃO

A biópsia de corpos polares foi inicialmente introduzida na prática clínica como uma técnica com um grande potencial, apresentando vantagens sobretudo a nível ético, por possibilitar o diagnóstico pré-implantação de doenças genéticas, previamente à formação do embrião. Desta forma, possibilitou que casais com objeções éticas, morais ou legais à micromanipulação embrionária tivessem acesso a técnicas de DPI.

A biópsia de corpos polares é um método de DPI preciso e eficaz, estando bem estabelecido na prática clínica, não apresentando diferenças significativas na deteção de anomalias genéticas em casais com risco de transmissão de anomalias genéticas de origem materna à sua descendência, em relação a outras técnicas de DPI. A segurança da biópsia de corpos polares é uma questão central na realização desta técnica. Foi demonstrado que os corpos polares não possuem nenhuma função biológica no desenvolvimento embrionário, podendo ser removidos sem dano para o ovócito ou embrião resultante. Vários estudos demonstraram que a biópsia de corpos polares é uma técnica segura, não afetando a qualidade do embrião ou o seu desenvolvimento subsequente, quando comparada com outras técnicas de biópsia embrionária.<sup>21,33,41</sup>

Contudo, apesar de ser um método seguro e eficaz, a biópsia de corpos polares é atualmente a técnica de biópsia menos utilizada, estando apenas amplamente difundida nos países com restrições legais à biópsia embrionária. A incapacidade de avaliação do componente genético paterno constitui uma desvantagem desta técnica em relação às técnicas de biópsia embrionária e é a principal razão para a sua menor utilização.<sup>22,48</sup>

O surgimento de novos campos de aplicação dos corpos polares, como por exemplo a deteção de doenças de hereditariedade mitocondrial, a utilização de técnicas como a sequenciação *single-cell whole-genome* e a discussão ainda em aberto sobre o papel dos corpos

polares no RGPI, poderá contribuir para a maior aplicação desta técnica e para o aumento da sua importância no contexto global do DPI.

Existem poucos trabalhos sobre DPI em corpos polares, muitos dos quais foram realizados num número reduzido de ciclos de DPI e não sendo realizada comparação com outras técnicas de biópsia para recolha de material genético. Assim, realça-se a importância da realização de mais estudos, preferencialmente prospetivos e multicêntricos, de forma a estabelecer a eficácia, vantagens, limitações e novas aplicações da biópsia de corpos polares, permitindo assim clarificar o interesse desta abordagem no âmbito do DPI.

**ANEXOS****Anexo 1: Doenças monogénicas**

**Tabela 1:** Exemplos de doenças monogénicas para as quais já foi realizado DPI em corpos polares. [Adaptado de 22]

<b>Doença genética</b>	<b>Tipo de hereditariedade</b>
Acidémia isovalérica	AR
Acidúria argininosuccínica	AR
Albinismo oculocutâneo tipo 1	AR
Anemia de Fanconi	AR
Anemia falciforme	AR
Cistinose nefropática	AR
Citrulinémia	AR
Défice de acil-coenzima A desidrogenase	AR
Défice de glutatona-sintetase	AR
Doença de Gaucher tipo 1	AR
Doença de Krabbe	AR
Doença de Sandhoff	AR
Doenças de Tay-Sachs	AR
Epidermólise bolhosa distrófica	AR
Fibrose quística	AR
Hiperplasia congénita da supra-renal	AR
Osteopetrose	AR
Púrpura trombótica trombocitopénica congénita	AR
Síndrome de Hurler	AR
Síndrome de Zellweger	AR
Surdez neurossensorial	AR
Tirosinémia tipo 1	AR
Albinismo mucocutâneo tipo II	AD
Angioedema hereditário	AD

Ataxia espinhocerebelar	AD
Ataxia-telangiectasia	AD
Distrofia miotónica tipo I	AD
Doença de Charcot-Marie-Tooth	AD
Doença de Huntington	AD
Doença de Machado-Joseph	AD
Doença renal poliquística	AD
Esclerose tuberosa tipo I e II	AD
Neoplasia endócrina múltipla tipo I	AD
Neurofibromatose tipo I e II	AD
Osteogénese imperfeita congénita	AD
Polipose adenomatosa cólica	AD
Retinoblastoma	AD
Síndrome de Li-Fraumeni	AD
Síndrome de Marfan	AD
Síndrome de Omenn	AD
Síndrome de predisposição hereditária para cancro do ovário e mama	AD
Síndrome de Stickler	AD
Síndrome de Von Hippel-Lindau	AD
Adrenoleucodistrofia	Ligada ao X
Agamaglobulinémia ligada ao X	Ligada ao X
Albinismo ocular tipo I	Ligada ao X
Distrofia muscular de Duchenne	Ligada ao X
Distrofia muscular de Emery-Dreifuss ligada ao X	Ligada ao X
Doença de Fabry	Ligada ao X
Doença de Norrie	Ligada ao X
Hemofilia A	Ligada ao X
Hemofilia B	Ligada ao X
Incontinência pigmentar	Ligada ao X
Síndrome de Alport ligada ao X	Ligada ao X
Síndrome de Rett	Ligada ao X

AR: Autossómica recessiva; AD: Autossómica dominante.

## **AGRADECIMENTOS**

À Professora Doutora Teresa Almeida Santos, pelo auxílio na escolha e desenvolvimento do tema deste trabalho e pelo cuidado, rigor e disponibilidade com que me orientou na sua execução.

Ao Dr. Jorge Veiga, pela disponibilidade, compreensão e dedicação com que me ajudou no desenvolvimento deste trabalho.

À minha família e amigos, pela motivação e apoio prestados, em especial àqueles que contribuíram para a revisão e correção linguística do texto final.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Monk M. Preimplantation Diagnosis of Genetic Disease. *Ann Med.* 1993;25:463-466.
2. Harper JC, SenGupta SB. Preimplantation genetic diagnosis: State of the ART 2011. *Hum Genet.* 2012;131(2):175-186.
3. Bick DP, Lau EC. Preimplantation Genetic Diagnosis. *Pediatr Clin North Am.* 2006;53(4):559-577.
4. Offit K, Kohut K, Clagett B, et al. Cancer Genetic Testing and Assisted Reproduction. *J Clin Oncol.* 2006;24(29):4775-4782.
5. Sermon K, Steirteghem A, Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis. *Lancet.* 2004;363:1633-1641.
6. Ogilvie CM. Preimplantation Genetic Diagnosis--An Overview. *J Histochem Cytochem.* 2005;53(3):255-260.
7. Simpson JL. Preimplantation genetic diagnosis at 20 years. *Prenat Diagn.* 2010;30(7):682-695.
8. van der Ven K, Montag M, van der Ven H. Polar body diagnosis - a step in the right direction? *Dtsch Arztebl Int.* 2008;105(11):190-196.
9. Derks-Smeets I a P, Gietel-Habets JIG, Tibben A, et al. Decision-making on preimplantation genetic diagnosis and prenatal diagnosis: a challenge for couples with hereditary breast and ovarian cancer. *Hum Reprod.* 2014;29(5):1103-1112.
10. Huang C-C, Chang L-J, Tsai Y-Y, et al. A feasible strategy of preimplantation genetic diagnosis for carriers with chromosomal translocation: Using blastocyst biopsy and array comparative genomic hybridization. *J Formos Med Assoc.* 2013;112(9):537-544.
11. Snowdon C, Green JM. Preimplantation diagnosis and other reproductive options: attitudes of male and female carriers of recessive disorders. *Hum Reprod.*

- 1997;12(2):341-350.
12. Harper JC, Wilton L, Traeger-Synodinos J, et al. The ESHRE PGD Consortium: 10 years of data collection. *Hum Reprod Update*. 2012;18(3):234-247.
  13. Gianaroli L. Preimplantation genetic diagnosis: polar body and embryo biopsy. *Hum Reprod*. 2000;15(suppl 4):69-75.
  14. 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(1):41-46.
  15. Cohen J, Alikani M, Grudzinskas G, H. Johnson M. Blastocyst biopsy and preimplantation genetic diagnosis for single gene diseases: a turnaround on the horizon? *Reprod Biomed Online*. 2012;25(5):441-442.
  16. Moutou C, Goossens V, Coonen E, et al. ESHRE PGD Consortium data collection XII: cycles from January to December 2009 with pregnancy follow-up to October 2010. *Hum Reprod*. 2014;29(5):880-903.
  17. Fragouli E, Alfarawati S, Goodall N -n., Sanchez-Garcia JF, Colls P, Wells D. The cytogenetics of polar bodies: insights into female meiosis and the diagnosis of aneuploidy. *Mol Hum Reprod*. 2011;17(5):286-295.
  18. Delhanty JDA. Is the polar body approach best for pre-implantation genetic screening? *Placenta*. 2011;32(SUPPL. 3):S268-S270.
  19. Montag M, van der Ven K, Rösing B, van der Ven H. Polar body biopsy: a viable alternative to preimplantation genetic diagnosis and screening. *Reprod Biomed Online*. 2009;18(1):6-11.
  20. Gitlin S, Gibbons W, Gosden R. Oocyte biology and genetics revelations from polar bodies. *Reprod Biomed Online*. 2003;6(4):403-409.



21. Wei Y, Zhang T, Wang Y-P, Schatten H, Sun Q-Y. Polar Bodies in Assisted Reproductive Technology: Current Progress and Future Perspectives. *Biol Reprod.* 2015;92(1):19-19.
22. Kuliev A, Rechitsky S. Polar body-based preimplantation genetic diagnosis for Mendelian disorders. *Mol Hum Reprod.* 2011;17(5):275-285.
23. Capalbo A, Bono S, Spizzichino L, 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(2):509-518.
24. Altarescu G, Eldar-Geva T, Brooks B, et al. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) for nonsyndromic deafness by polar body and blastomere biopsy. *J Assist Reprod Genet.* 2009;26(7):391-397.
25. Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, et al. Prevention of Age-Related Aneuploidies by Polar Body Testing of Oocytes. *J Assist Reprod Genet.* 1999;16(4):165-169.
26. Kuliev A, Verlinsky Y. Current features of preimplantation genetic diagnosis. *Reprod Biomed Online.* 2002;5(3):294-299.
27. Dawson a, Griesinger G, Diedrich K. Screening oocytes by polar body biopsy. *Reprod Biomed Online.* 2006;13(1):104-109.
28. Altarescu G, Brooks B, Eldar-Geva T, et al. Polar Body-Based Preimplantation Genetic Diagnosis for *N*-Acetylglutamate Synthase Deficiency. *Fetal Diagn Ther.* 2008;24(3):170-176.
29. Renbaum P, Brooks B, Kaplan Y, et al. Advantages of multiple markers and polar body analysis in preimplantation genetic diagnosis for Alagille disease. *Prenat Diagn.* 2007;27(4):317-321.
30. Macas E, Mátyás G, Reuge P, Berger W, Imthurn B. Polar body biopsy for Curschmann-

- Steinert disease and successful pregnancy following embryo vitrification. *Reprod Biomed Online*. 2009;18(6):815-820.
31. Clement-Sengewald A, Buchholz T, Schütze K, Berg U, Berg FD. Noncontact, Laser-Mediated Extraction of Polar Bodies for Prefertilization Genetic Diagnosis. *J Assist Reprod Genet*. 2002;19(4):183-194.
  32. Montag M, van der Ven K, Dorn C, van der Ven H. Outcome of laser-assisted polar body biopsy and aneuploidy testing. *Reprod Biomed Online*. 2004;9(4):425-429.
  33. Hammoud I, Molina-Gomes D, Albert M, et al. Are zona pellucida laser drilling and polar body biopsy safe for in vitro matured oocytes? *J Assist Reprod Genet*. 2010;27:423-427.
  34. Magli MC, Montag M, Koster M, et al. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part II: technical aspects. *Hum Reprod*. 2011;26(11):3181-3185.
  35. Harton GL, De Rycke M, Fiorentino F, et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for amplification-based PGD. *Hum Reprod*. 2011;26(1):33-40.
  36. Harton G, Braude P, Lashwood A, et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for organization of a PGD centre for PGD/preimplantation genetic screening. *Hum Reprod*. 2011;26(1):14-24.
  37. Kuliev A, Cieslak J, Ilkevitch Y, Verlinsky Y. Chromosomal abnormalities in a series of 6733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies. *Reprod Biomed Online*. 2003;6(1):54-59.
  38. Konstantinidis M, Alfarawati S, Hurd D, et al. Simultaneous assessment of aneuploidy, polymorphisms, and mitochondrial DNA content in human polar bodies and embryos with the use of a novel microarray platform. *Fertil Steril*. 2014;102(5):1385-1392.
  39. Rechitsky S, Strom C, Verlinsky O, et al. Accuracy of Preimplantation Diagnosis of

- Single-Gene Disorders by Polar Body Analysis of Oocytes. *J Assist Reprod Genet.* 1999;16(4):192-198.
40. Geraedts J, Montag M, Magli MC, et al. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results. *Hum Reprod.* 2011;26(11):3173-3180.
  41. Verlinsky Y, Kuliev A. Preimplantation Polar Body Diagnosis. *Biochem Mol Med.* 1996;58:13-17.
  42. Strom CM, Levin R, Strom S, Masciangelo C, Kuliev A, Verlinsky Y. Neonatal Outcome of Preimplantation Genetic Diagnosis by Polar Body Removal: The First 109 Infants. *Pediatrics.* 2000;106(4):650-653.
  43. Liu Y, Zhou C, Xu Y, Fang C, Zhang M. Pregnancy outcome in preimplantation genetic diagnosis cycle by blastomere biopsy is related to both quality and quantity of embryos on day 3. *Fertil Steril.* 2009;91(4):1355-1357.
  44. Terada Y, Ugajin T, Hasegawa H, Nabeshima H, Yaegashi N. Different embryonic development after blastomere biopsy for preimplantation genetic diagnosis, observed by time-lapse imaging. *Fertil Steril.* 2009;92(4):1470-1471.
  45. Pujol a, Durban M, Benet J, et al. Multiple aneuploidies in the oocytes of balanced translocation carriers: a preimplantation genetic diagnosis study using first polar body. *Reproduction.* 2003;126(6):701-711.
  46. Christopikou D, Handyside AH. Questions about the accuracy of polar body analysis for preimplantation genetic screening. *Hum Reprod.* 2013;28(6):1732-1733.
  47. Durban M, Benet J, Boada M, et al. PGD in female carriers of balanced Robertsonian and reciprocal translocations by first polar body analysis. *Hum Reprod Update.* 2001;7(6):591-602.
  48. Griesinger G, Bündgen N, Salmen D, Schwinger E, Gillessen-Kaesbach G, Diedrich K.

- Polar Body Biopsy in the Diagnosis of Monogenic Diseases: The Birth of Three Healthy Children. *Dtsch Arztebl Int.* 2009;106(33):533-538.
49. Altarescu G, Eldar-Geva T, Varshower I, et al. Real-time reverse linkage using polar body analysis for preimplantation genetic diagnosis in female carriers of de novo mutations. *Hum Reprod.* 2009;24(12):3225-3229.
  50. Verlinsky Y, Rechitsky S, Verlinsky O, et al. Polar body-based preimplantation diagnosis for X-linked disorders. *Reprod Biomed Online.* 2002;4(1):38-42.
  51. Pujol A, Boiso I, Benet J, et al. Analysis of nine chromosome probes in first polar bodies and metaphase II oocytes for the detection of aneuploidies. *Eur J Hum Genet.* 2003;11(4):325-336.
  52. Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, et al. Preimplantation Diagnosis of Common Aneuploidies by the First- and Second-Polar Body FISH Analysis. *J Assist Reprod Genet.* 1998;15(5):285-289.
  53. Verlinsky Y. Chromosomal abnormalities in the first and second polar body. *Mol Cell Endocrinol.* 2001;183:S47-S49.
  54. Harton GL, Harper JC, Coonen E, Pehlivan T, Vesela K, Wilton L. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for fluorescence in situ hybridization-based PGD. *Hum Reprod.* 2011;26(1):25-32.
  55. Neupane J, Vandewoestyne M, Heindryckx B, et al. A systematic analysis of the suitability of preimplantation genetic diagnosis for mitochondrial diseases in a heteroplasmic mitochondrial mouse model. *Hum Reprod.* 2014;29(4):852-859.
  56. Łukaszuk K, Pukszta S, Wells D, et al. Routine use of next-generation sequencing for preimplantation genetic diagnosis of blastomeres obtained from embryos on day 3 in fresh in vitro fertilization cycles. *Fertil Steril.* 2015;103(4):1031-1036.
  57. Rubio C, Rodrigo L, Mir P, et al. Use of array comparative genomic hybridization (array-

- CGH) for embryo assessment: clinical results. *Fertil Steril*. 2013;99(4):1044-1048.
58. Feichtinger M, Stopp T, Göbl C, et al. Increasing Live Birth Rate by Preimplantation Genetic Screening of Pooled Polar Bodies Using Array Comparative Genomic Hybridization. Liang C-G, ed. *PLoS One*. 2015;10(5).
59. Geraedts J, Collins J, Gianaroli L, et al. What next for preimplantation genetic screening? A polar body approach! *Hum Reprod*. 2010;25(3):575-577.
60. Chen C-K, Yu H-T, Soong Y-K, Lee C-L. New perspectives on preimplantation genetic diagnosis and preimplantation genetic screening. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2014;53(2):146-150.
61. Schmutzler AG, Acar-Perk B, Weimer J, et al. Sham-controlled implantation after preimplantation genetic screening by polar body biopsy and FISH. *Arch Gynecol Obstet*. 2014;289(2):439-444.
62. Huang CC, Chang LJ, Chen HF, Chen SU. Response to: “Preimplantation genetic diagnosis strategy combining blastocyst biopsy and array comparative genomic hybridization for parents carrying chromosomal translocation.” *J Formos Med Assoc*. 2014;113(11):883-884.
63. Santos TA, El Shourbagy S, St. John JC. Mitochondrial content reflects oocyte variability and fertilization outcome. *Fertil Steril*. 2006;85(3):584-591.
64. Roberts JC. Customizing conception: a survey of preimplantation genetic diagnosis and the resulting social, ethical, and legal dilemmas. *Duke Law Technol Rev*. 2002.
65. Gehring J. Thinking Hypothetically Realistically: Preimplantation Genetic Diagnosis and the Legal Landscape. *Michigan State Univ Coll Law*. 2010.
66. Milachich T. New Advances of Preimplantation and Prenatal Genetic Screening and Noninvasive Testing as a Potential Predictor of Health Status of Babies. *Biomed Res Int*. 2014;2014(1):1-8.