



Associação Propagadora Esdeva
Centro Universitário Academia – UniAcademia
Curso de Ciências Biológicas
Trabalho de Conclusão de Curso – Artigo

TÉCNICAS DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRÉ-IMPLANTACIONAL E SUA APLICAÇÃO NA REPRODUÇÃO HUMANA ASSISTIDA

Amanda Jdenaina Mendoza Visconde¹

Centro Universitário Academia, Juiz de Fora, MG

Nathália Barbosa do Espírito Santo Mendes²

Centro Universitário Academia, Juiz de Fora, MG

Moísa Lucia Pedrosa Corrêa da Silva³

Laboratório de Reprodução Humana do Hospital Mater Dei, Belo Horizonte, MG

Linha de Pesquisa: Saúde

RESUMO

A Reprodução Humana Assistida (RHA) possibilita através das técnicas de Fertilização *in vitro* (FIV) e Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoide (ICSI), realizar o Teste Genético Pré-implantacional (PGT), visando diagnosticar em células embrionárias doenças genéticas e cromossômicas antes da transferência dos embriões para a cavidade uterina. O presente estudo teve como objetivo identificar as principais técnicas realizadas no PGT e sua aplicabilidade na Reprodução Humana Assistida, bem como as indicações para realização de tal procedimento. Trata-se de uma revisão da literatura nas bases de dados científicos SciELO, BIREME, CAPES, PUBMED, sites oficiais, livros e dissertações. Foram selecionados trabalhos da literatura médica inglesa e portuguesa publicados no período de 2002 a 2020. O PGT é classificado em PGT-A (Teste Genético para Aneuploidia), PGT-M (Teste Genético para Desordem Monogênica) e PGT-SR (Teste Genético para Rearranjos Estruturais). É possível identificar aneuploidias, translocações, inversões, duplicações, deleções, doenças monogênicas e selecionar somente os embriões normais para implantação. Para os testes genéticos são realizadas biópsias das células do embrião. Os métodos de análise variam de acordo com a doença investigada, portanto, na análise genética podem ser aplicados o Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH); Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); Hibridação Genômica Comparativa (CGH); Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e EMBRACE. Foi possível concluir que, a técnica de Biópsia do

¹ Discente do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário Academia – UniAcademia. Endereço: Av. Gov. Valadares – Manoel Honório, 673 Celular: (32) 984420608. E-mail: amandamendoza.17@hotmail.com

² Docente do Curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário Academia – UniAcademia. Orientador(a).

³ Embriologista do Laboratório de Reprodução Humana do Hospital Mater Dei de Belo Horizonte. Co-orientador(a).

Trofoectoderma, Sequenciamento de Nova Geração e EMBRACE são as mais utilizadas nos laboratórios de RHA, por proporcionar melhores resultados nos embriões que serão transferidos.

Palavras-chave: Diagnóstico genético pré-implantacional. Biópsia. Fertilização *in vitro*. Embriões. Infertilidade.

1 INTRODUÇÃO

A infertilidade é hoje considerada uma doença do sistema reprodutor que afeta cerca de 60 a 80 milhões de casais em todo o mundo (RODRIGUES, 2017). A falência da saúde reprodutiva é um problema de saúde pública, visto que, interfere significativamente nas questões sociais, econômicas e demográficas (NOGUEIRA, 2016). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a infertilidade é definida como a incapacidade de engravidar ou de levar uma gestação a termo, após um ano (12 meses) de relação sexual regular sem proteção em mulheres com menos de 35 anos de idade, e seis meses de relações sexuais regulares sem proteção em mulheres com mais de 35 anos de idade, ocorrendo durante o período fértil (WHO, 2020).

A infertilidade ocorre tanto em mulheres quanto em homens, e existem diversos fatores que predisõem tal condição (POLIS *et al.*, 2017). As causas podem ser de origem feminina (37%), masculina (8-30%) e de causas mistas ou combinadas, quando ambos apresentam problemas de fertilidade (20-35%) (NOGUEIRA, 2016).

Com o avanço da Reprodução Humana Assistida (RHA) ou Reprodução Medicamente Assistida (RMA), foi possível realizar por meio de um conjunto de técnicas altamente especializadas a manipulação dos gametas, com o intuito de possibilitar a casais com problemas de fertilidade a realização do desejo de serem pais (FREITAS; SIQUEIRA; SEGRE, 2008).

As técnicas de RHA são classificadas de acordo com sua complexidade, em técnicas de baixa complexidade que são a Inseminação Intrauterina (IIU); Inseminação Intracervical (IC) e Coito Programado. E técnicas de alta complexidade que compreendem a Fertilização *in vitro* (FIV); Injeção Intracitoplasmática de

Esp ermatozoide (ICSI) e algumas técnicas de diagnóstico (FREITAS; SIQUEIRA; SEGRE, 2008; LUNA, 2005).

Pacientes que possuem em seu genoma alterações genéticas que podem ser passadas para seus descendentes, correm o risco de sofrer uma interrupção precoce na gestação (POMPEU; VERZELETTI, 2015). Portanto, dentro da Reprodução Humana existe o Aconselhamento Genético (AG), que oferece aos casais informações sobre a ocorrência e recorrência de doenças genéticas na família, que poderá ser passado para o embrião (FELIX; OLIVEIRA; BARBOSA, 2016; GONÇALVES *et al.*, 2019).

Uma opção do AG muito utilizada na RHA é o Teste Genético Pré-Implantacional (PGT) (CORREIA, 2015). Constitui um procedimento que permite detectar em células embrionárias diferentes anomalias genéticas nos embriões antes de serem transferidos para a cavidade uterina, identificando aneuploidias, translocações, inversões, duplicações, deleções e doenças monogênicas (POMPEU; VERZELETTI, 2015), este procedimento é realizado durante a FIV e a ICSI (CORREIA, 2015).

O PGT é classificado em PGT-A (Teste Genético para Aneuploidia), PGT-M (Teste Genético para Desordem Monogênica) e PGT-SR (Teste Genético para Rearranjos Estruturais) (BUTLER *et al.*, 2019; PASCUAL *et al.*, 2020), e para cada doença investigada é aplicado uma análise genética, que pode ser Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH); Reação em Cadeia da Polimerase (PCR); Hibridação Genômica Comparativa (CGH); Sequenciamento de Nova Geração (NGS) e EMBRACE (MENDES; COSTA, 2013; PASCUAL *et al.*, 2020; RUBIO *et al.*, 2020).

Dessa forma, este trabalho teve como objetivo identificar as técnicas e procedimentos realizados no Teste de Diagnóstico Genético Pré-Implantacional e sua aplicabilidade na Reprodução Humana Assistida.

2 METODOLOGIA

O presente estudo consiste em uma revisão bibliográfica de natureza qualitativa e exploratória. As pesquisas bibliográficas foram executadas no período de abril a novembro de 2020, nas bases de dados científicos como Periódicos CAPES

(Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), SciELO (Scientific *Electronic Library Online*), BVS-Bireme (Biblioteca Virtual em Saúde) e PUBMED (*National Library of Medicine and The National Institute of Health*), bem como em sites oficiais, livros, manuais e dissertações.

Os descritores utilizados na pesquisa foram: “teste de diagnóstico pré-implantacional” “reprodução humana assistida”, “fatores de infertilidade feminina e masculina”, “alterações genéticas e cromossômicas”. Foram selecionados trabalhos em português e inglês, no período de 2002 a 2020.

3 DESENVOLVIMENTO

3.1 INFERTILIDADE E ALTERAÇÕES GENÉTICAS

Diversos fatores justificam a infertilidade masculina e feminina. Na mulher, a idade avançada é um fator determinante, dado que, a reserva ovariana diminui ao decorrer da sua vida, aumentando a incidência de anormalidades genéticas e o risco de abortos repetidos, a infertilidade também pode estar associada à distúrbios uterinos e ovulatórios, patologias nas tubas uterinas (ROUPA *et al.*, 2009). Nos homens, as causas da infertilidade podem ser encontradas na concentração e/ou motilidade e morfologia dos espermatozoides, assim como na deficiência e qualidade do sêmen (KUMAR; SINGH, 2015). Esses fatores podem comprometer a capacidade do espermatozoide de fecundar o óvulo, impossibilitando a criação de um embrião (RODRIGUES, 2017).

Apesar dos tratamentos de fertilização *in vitro* serem eficazes em sua grande maioria, o processo se torna ineficiente devido aos fatores genéticos, que além de dificultar o desenvolvimento do embrião são identificados como os causadores da infertilidade masculina e feminina (PASQUALOTTO, 2007; TREFF; ZIMMERMAN, 2017). Aproximadamente metade dos embriões produzidos através da FIV possuem o número de cromossomos alterados, as aneuploidias nos cromossomos 13,14,15,16,18,21,22, X e Y são responsáveis por cerca de 50-70% dos abortos espontâneos (FRANASIAK *et al.*, 2014; PASCUAL *et al.*, 2020).

As anormalidades são divididas em mutações cromossômicas, que podem afetar a nível numérico, constituindo as aneuploidias ou poliploidias (perda/ganho de um cromossomo), ou a nível estrutural (translocações/inversões; deleções/duplicações), e mutações gênicas, alterações em um ou mais genes, devido a mudança das bases nitrogenadas (HELENO, 2014).

3.2 TESTE DE DIAGNÓSTICO GENÉTICO PRÉ-IMPLANTACIONAL (PGT)

Somente com a FIV e a ICSI não é possível identificar as alterações do embrião e eventualmente os resultados destas técnicas geram embriões com rearranjos cromossômicos e aneuploidias (PIZZATO *et al.*, 2017). Portanto, o Teste de Diagnóstico Genético Pré-implantação (PGT) é realizado juntamente com a FIV e a ICSI, e é recomendado realizar a ICSI para todos os casos de PGT para reduzir os riscos de uma possível poliespermia pelos espermatozoides aderidos a zona pelúcida durante a FIV (BASILLE *et al.*, 2009). O PGT tem como objetivo identificar anormalidades cromossômicas e genéticas, estudar o genótipo dos embriões e selecionar os que apresentam melhor qualidade, impedindo a implantação de embriões portadores de doenças genéticas no útero materno (FIGURA 1) (ELER, 2019).

FIGURA 1: Representação do procedimento realizado no PGT.



Fonte: Disponível em: <https://bit.ly/3fWQ4E0> Acesso em: 09 set. 2020.

Este procedimento, permite que casais consigam gerar um filho saudável, sem enfrentar técnicas invasivas com risco de interromper a gravidez (BASILLE *et al.*, 2009), por essa razão, as técnicas de PGT são mais atrativas e surgiram como alternativa para os exames pré-natais tradicionais invasivos, como a amniocentese, cordocentese e coleta de amostras das células das vilosidades coriônicas (MENDES; COSTA, 2013).

O PGT evita a decisão de interrupções ou continuidade da gestação em caso de resultados positivos para alterações genéticas, pois seleciona apenas embriões sem nenhuma desordem para serem implantados (BICK; LAU, 2006; LUNA, 2004).

Conforme estabelecida a alteração a ser investigada, o PGT possui suas variantes. O PGT-A tem por objetivo melhorar as taxas de implantação por transferência e diminuir as taxas de abortos espontâneos, indicado principalmente para mulheres com idade materna avançada. É possível diagnosticar aneuploidias uniformes, pequenas deleções, duplicações e mosaicismo (PASCUAL *et al.*, 2020).

O PGT-M tem por objetivo identificar durante a FIV os embriões que possuem genes para doenças graves de início de infância (COMITÊ DE ÉTICA DA SOCIEDADE AMERICANA DE MEDICINA REPRODUTIVA, 2018), e é procurado por pacientes férteis que possuem alguma doença genética hereditária, e que não desejam transmiti-las para sua descendência (BUTLER *et al.*, 2019; PRINER *et al.*, 2019).

O PGT-SR tem por objetivo detectar desequilíbrios menores, em embriões cujo um dos pais é portador de translocações e/ou inversões equilibradas (PASCUAL *et al.*, 2020).

3.2.1 Principais Indicações

As principais indicações para o PGT são casais portadores de doenças genéticas; casais que possuem histórico de abortos por distúrbios genéticos do feto; mulheres com idade materna avançada; fator masculino severo; casais que tiveram falhas nos ciclos de FIV ou ICSI e para casos de doenças específicas na família (CORREIA, 2015; DAHDOUH *et al.*, 2015; ELER, 2019; POMPEU; VERZELETTI, 2015), como câncer de mama, câncer de ovários, câncer de próstata, distrofias de Duchenne e Becker, Talassemia, entre outros (DANTAS *et al.*, 2009; FIGUEIRA *et al.*,

2012; MAYANA, 2002).

A idade da mulher é um dos fatores de risco mais importantes de uma gestação, segundo Munné e colaboradores (2007), a porcentagem de embriões aneuploides aumenta devido a idade materna, chegando a 40% dos casos de mulheres com mais de 40 anos. Além disso, a taxa de implantação pela FIV diminui para 6% em mulheres com mais 40 anos (MUNNÉ, 2012).

O PGT também é indicado para casais que já possuem uma criança afetada por uma doença genética. Caso essa criança necessite de transplante e não encontre doador compatível, os pais podem, por meio de RHA, gerar novos embriões. O PGT pode selecionar os embriões saudáveis e compatíveis com o filho enfermo. Neste caso, os embriões são chamados de “bebês-medicamentos” (ELER; RAMOS; OLIVEIRA, 2019; KULIEV *et al.*, 2005; MENDES; COSTA, 2013). O PGT para teste de HLA foi apresentado como um método alternativo para criação compatível de células e tecidos ao irmão doente, e sua principal vantagem são as informações sobre o embrião antes da implantação, sendo assim, é possível garantir apenas embriões compatíveis para serem transferidos ao útero materno (DEVOLDER, 2004).

3.3 TÉCNICAS E MÉTODOS DO TESTE GENÉTICO PRÉ-IMPLANTACIONAL (PGT)

3.3.1 Técnicas de Biópsia

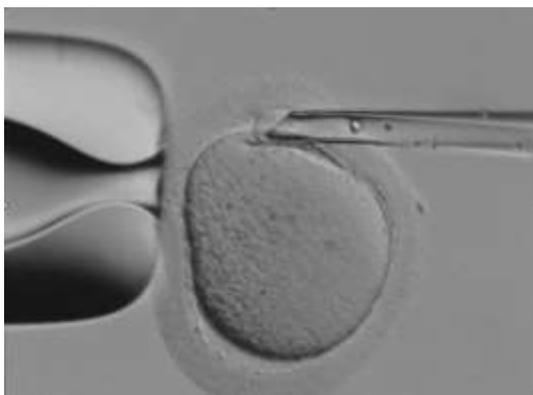
Para o teste de diagnóstico, primeiro é necessário realizar a biópsia dos oócitos ou dos embriões para obter material para a análise genética, com o objetivo de escolher o embrião ou oócito cromossomicamente normal (AQUINO; MARTINHAGO; MARTINHAGO, 2013). Podem ser utilizados três tipos celulares na biópsia e são classificados de acordo com seu desenvolvimento embrionário: biópsia do corpúsculo polar (CP); biópsia dos blastômeros D3 (realizado no dia 3 de desenvolvimento embrionário) e biópsia das células do trofoectoderma (D5) (POMPEU; VERZELETTI, 2015).

Para realizar a biópsia é necessário romper a zona pelúcida (ZP) do oócito ou do embrião, este procedimento pode ser feito de forma mecânica, química ou a laser. A

laser é o método mais utilizado para causar o enfraquecimento da ZP, e não atrapalha o desenvolvimento embrionário (AQUINO; MARTINHAGO; MARTINHAGO, 2013).

A biópsia do corpúsculo polar (CP) (FIGURA 2) consiste na coleta do primeiro CP ou do segundo CP, logo após a fertilização. Este método é o menos utilizado por permitir identificar apenas alterações de origem materna, exclui doenças autossômicas dominantes e translocações paternas (SAPÚLVEDA; PORTELLA, 2012).

FIGURA 2: Biópsia do corpúsculo polar, logo após a fertilização (D1).

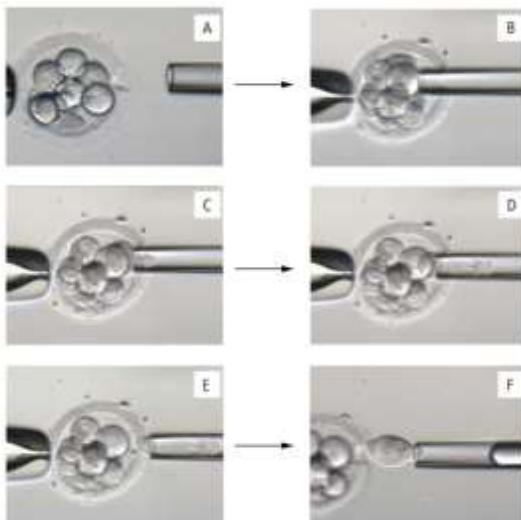


Fonte: <https://bit.ly/2KPsFsE> Acesso em: 18 set. 2020

A biópsia dos blastômeros (FIGURA 3) é feita no estágio de clivagem, o embrião apresenta cerca de seis a oito células e são retiradas para biópsia uma ou duas células (AQUINO; MARTINHAGO; MARTINHAGO, 2013).

A biópsia dos blastômeros é muito utilizada para investigar aberrações cromossômicas e são avaliados quanto à morfologia (KANAVAKIS; TRAEGER, 2002). Entretanto, este procedimento está sendo substituído pela biópsia do trofoectoderma, por possuir um número menor de células no momento da extração pode interferir com o desenvolvimento do embrião, assim como, apresentar falsos positivos para doenças genéticas, pois erros da mitose ocorrem nos três primeiros dias após a fertilização (FAID, 2020).

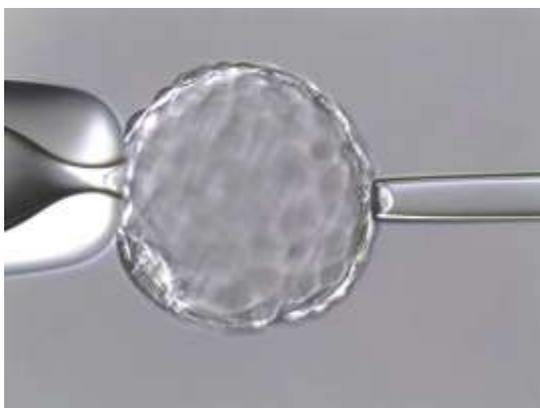
FIGURA 3: Biópsia dos blastômeros na fase de mórula (D3).



Fonte: <https://bit.ly/37nz1qN> Acesso em: 18 set. 2020

A biópsia de blastocisto (TE) (FIGURA 4) é atualmente a técnica mais utilizada nos laboratórios, e a que causa menos impacto no embrião devido a maior quantidade de células presentes no blastocisto, trazendo melhores resultados no diagnóstico (AQUINO; MARTINHAGO; MARTINHAGO, 2013; FAID, 2020). Contudo, é a técnica que exige uma cautela maior, pois, este é o último estágio em que o embrião pode ser analisado, mas pelo blastocisto possuir de 32 a 64 células os riscos são menores, nesta etapa até dez células podem ser analisadas (POMPEU; VERZELETTI, 2015).

FIGURA 4: Biópsia do trofoectoderma na fase de blastocisto (D5).



Fonte: <https://bit.ly/2KPsFsE> Acesso em: 18 set. 2020

3.3.2 Análise Genética

A necessidade da utilização dos testes genéticos pré-implantação surgiu para minimizar o número de embriões aneuploides implantados pela RMA (FRANASIAK *et al.*, 2014). Após o desenvolvimento e aplicação das técnicas como a Hibridação Fluorescente *in situ* (FISH) foi visto a necessidade de desenvolver novas tecnologias para realizar os testes, visto que a técnica de FISH possuía limitações no número de cromossomos que poderiam ser analisados (RUBIO *et al.*, 2009). Deste modo, com o desenvolvimento de técnicas como Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), Hibridação Genômica Comparativa (CGH) e o mais recente, Sequenciamento de Nova Geração (NGS) foi possível analisar os 23 pares de cromossomos (RUBIO *et al.*, 2019).

3.3.2.1 Hibridação Fluorescente *in situ* – FISH

Na técnica de FISH é possível detectar a presença ou ausência das sequências de DNA a partir da utilização de sondas para marcação fluorescente, ocorre a fusão da sonda (sequências de DNA marcadas com fluorocromos) com o material genético que será analisado em microscópio de fluorescência (CHANG *et al.*, 2011; PRAJIANTE; BUSSO, 2013). A FISH é realizada em quatro etapas, a primeira é a fixação da amostra, a segunda é a hibridização da sonda por aquecimento, a terceira consiste na lavagem da lâmina para remover as sondas em excesso, a quarta e última etapa é a detecção de alterações pelo microscópio de fluorescência (PIZZATO *et al.*, 2016).

É indicado para diagnosticar embriões aneuploides, entretanto, é incapaz de diagnosticar translocações balanceadas (POMPEU; VERZELETTI, 2015).

Este procedimento possui suas limitações, apenas cinco a doze dos vinte e três pares de cromossomos podem ser avaliados, e existe a possibilidade de ocorrer falhas no processo de hibridização e sobreposição dos sinais fluorescentes, dificultando a avaliação e podendo gerar diagnósticos equivocados (BASILLE *et al.*, 2009). Como consequência, a geração de resultados falsos pode levar ao descarte de embriões normais ou a transferência de embriões anormais (CHANG *et al.*, 2011).

3.3.2.2 Reação em Cadeia da Polimerase – PCR

De acordo com Mendes e Costa (2013), a PCR consiste na amplificação das sequências de DNA e é utilizada principalmente no diagnóstico de heranças monogênicas autossômicas e ligadas ao cromossomo X. Há duas formas de realizar a análise molecular, pode ser feito pela amplificação *in vitro* direta da sequência da mutação genética, averiguando se a mutação está presente ou não, e também pela amplificação indireta, usando marcadores de segregação alélica (BASILLE *et al.*, 2009).

A PCR pode ser aplicada na identificação de mutações em doenças relacionadas a um único gene, na detecção de doenças hereditárias, no diagnóstico de microdeleções e na identificação de agentes patogênicos (POMPEU; VERZELETTI, 2015; WOLFF; MARTINHAGO; UENO, 2009). Entretanto, as dificuldades de realizar a PCR são as falhas na amplificação dos alelos, devido a pouca quantidade de DNA disponível e pela possibilidade de contaminação de DNA externo (GERAEDTS; DE WERT, 2009).

3.3.2.3 Hibridação Genômica Comparativa – CGH

A Hibridação Genômica Comparativa (Comparative Genomic Hybridization – CGH) é uma técnica da citogenética aplicada no PGT, que permite a análise dos 23 pares de cromossomos simultaneamente, portanto, determina todas as aneuploidias cromossômicas (ALMEIDA; FILHO; SOARES, 2013). É indicado para detectar aneuploidias, translocações desequilibradas e rearranjos múltiplos, portanto, esta técnica é mais eficiente do que a técnica de FISH (PIZZATO *et al.*, 2016). Contudo, não é possível realizar o diagnóstico de embrião mosaico, pois sua capacidade depende do número de células aneuploides na biópsia do trofoectoderma (COMITÊ DE PRÁTICA DA SOCIEDADE AMERICANA PARA MEDICINA REPRODUTIVA, 2018).

É feito a amplificação do genoma da célula biopsiada, logo depois é realizada a marcação fluorescente e hibridização com cromossomos normais em uma lâmina de microscópio (ALMEIDA; FILHO; SOARES, 2013). Posteriormente, a amostra do DNA

analisado é comparado a um DNA controle por meio da amplificação de um software apropriado, WGA (Amplificação Genômica Completa) (POMPEU; VERZELETTI, 2015). Existem duas variantes do CGH, a Hibridização Genômica Comparativa com *arrays* (aCGH) e Hibridização Genômica Comparativa em metáfase (mCGH) (SOEIRO, 2012). A desvantagem do aCGH é o processo ser demorado, cerca de 72 horas de trabalho em bancada de laboratório e o tempo para análise dos dados. Em compensação, no mCGH a análise é automatizada e o processo é feito em 24 horas, permitindo a transferência dos embriões rapidamente sem a necessidade de criopreservá-los (ALMEIDA; FILHO; SOARES, 2013).

3.3.2.4 Sequenciamento de Nova Geração – NGS

O Sequenciamento de Nova Geração (NGS) é uma técnica recente que possui vantagens significativas comparado ao CGH, além de ser mais econômico, possui menos tempo prático e sua tecnologia dispõe de uma melhor resolução (COMITÊ DE PRÁTICA DA SOCIEDADE AMERICANA PARA MEDICINA REPRODUTIVA, 2018).

Esta técnica é aplicada no diagnóstico de aneuploidias, deleções e duplicações, sua principal diferença para as outras técnicas é a capacidade de diagnosticar mosaicismos (HADDAD *et al.*, 2015).

Os protocolos NGS atuais consistem em (a) amplificação do genoma completo (WGA) e código de barras; (b) preparação, purificação e modelagem da biblioteca; (c) carregamento e sequenciamento; (d) alinhamento de leituras sequenciadas para um genoma de referência humano; e, finalmente, (e) análise de dados e relatórios (PASCUAL *et al.*, 2020, p. 2).

Portanto, as vantagens oferecidas pelo NGS comparada com a técnica de CGH incluem, preparação automatizada da biblioteca de sequenciamento, minimizando erros humanos e de trabalho manual (FIORENTINO *et al.*, 2014); apresenta um potencial maior de resolução, podendo detectar aneuploidias parciais e segmentares com maior eficiência; redução do custo devido ao alto rendimento das técnicas de sequenciamento e a possibilidade de sequenciar mais de uma amostra por teste; e a detecção de mosaicismos em amostras multicelulares (PIZZATO *et al.*, 2017).

Segundo Fiorentino e colaboradores (2014), NGS é uma metodologia pronta para uso clínico, por possuir alto rendimento e precisão na detecção de aneuploidias.

3.3.2.5 EMBRACE – Análise do Meio de Cultura Embrionária

EMBRACE (*Embryo Analysis of Culture Environment*) é uma nova análise genética não invasiva desenvolvida pela IGENOMIX (laboratório especializado em genética reprodutiva e biotecnologia), com objetivo de identificar os embriões saudáveis sem necessidade de biópsia (IGENOMIX, 2020).

A análise genética é feita a partir da liberação do DNA livre-circulante (cfDNA) no meio de cultura embrionário entre os dias quatro e seis. A análise pode ser feita pelo sequenciamento de nova geração (NGS), para calcular o número de cromossomos de um blastocisto sem a necessidade de realizar a biópsia embrionária (RUBIO *et al.*, 2020).

O estudo realizado pela IGENOMIX em oito centros de reprodução assistida, comparou os resultados dos estudos de cfDNA obtidos pelo meio de cultura e de amostras de células biopsiadas do trofoectoderma, os resultados da análise mostraram que o cfDNA possui uma alta taxa de concordância com os resultados da biópsia do trofoectoderma. Portanto, concluíram que a análise não invasiva pode prevenir biópsias e reduzir custos, porém, é necessário mais estudos sobre o cfDNA e seus mecanismos (RUBIO *et al.*, 2020).

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Foi visto que, o teste de diagnóstico genético pré implantacional é um conjunto de técnicas e procedimentos aplicados na reprodução humana assistida, que permite aos casais com diversos fatores de infertilidade, a concretizar o desejo de serem pais, e para aqueles com predisposição de transmitir doenças genéticas para seus filhos, de obter o nascimento de bebês saudáveis e para a cura de filhos doentes. A seleção e transferência de embriões não afetados na FIV ou ICSI, evita interrupções gestacionais e abortos espontâneos.

Embora exista muito conhecimento sobre o PGT, ainda são necessários muitos estudos para total compreensão e melhoria de suas técnicas de diagnóstico, que apesar de eficientes ainda apresentam algumas limitações. Entretanto, mesmo com limitações, as técnicas de biópsia e de análise genética apresentaram resultados significativos para a medicina reprodutiva, dentre elas, destaca-se a Biópsia do Trofoectoderma, que realiza a análise genética do embrião sem trazer complicações futuras na implantação e no desenvolvimento embrionário, como ocorre na biópsia de blastômeros, pois oferece maior quantidade de DNA. Assim como, o Sequenciamento de Nova Geração, é uma técnica de alta tecnologia, que além de ser precisa, reconhece embrião mosaico. E EMBRACE, que realiza a análise dos embriões sem necessidade de biópsia, mas que ainda necessita muitos estudos.

Portanto, a biópsia do trofoectoderma e o Sequenciamento de Nova Geração são as técnicas mais aplicadas nos laboratórios de Reprodução Assistida que dispõem desta tecnologia. São técnicas mais seguras, apresentam menor margem de erro, oferecendo resultados confiáveis para os pacientes.

Dessa forma, é importante reforçar e atualizar a comunidade médica da aplicação destas técnicas e procedimentos nas clínicas de Reprodução Humana Assistida.

ABSTRACT

Assisted Human Reproduction (RHA) makes it possible, through the techniques of In Vitro Fertilization (IVF) and Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI), to perform the Preimplantation Genetic Test (PGT), aiming to diagnose genetic and chromosomal diseases in embryonic cells before transfer embryos to the uterine cavity. The present study aimed to identify the main techniques performed in PGT and their applicability in Assisted Human Reproduction, as well as the indications for performing such a procedure. This is a review of the literature in the scientific databases SciELO, BIREME, CAPES, PUBMED, official websites, books and dissertations. Works from the English and Portuguese medical literature published between 2002 and 2020 were selected. PGT is classified into PGT-A (Genetic Test for Aneuploidy), PGT-M (Genetic Test for Monogenic Disorder) and PGT-SR (Genetic Test for Structural Rearrangements). It is possible to identify aneuploidies, translocations, inversions, duplications, deletions, monogenic diseases and select only normal embryos for implantation. For genetic tests, biopsies of embryo cells are performed. The analysis methods vary according to the investigated disease, therefore, in the genetic analysis the Fluorescent Hybridization in

situ (FISH) can be applied; Polymerase Chain Reaction (PCR); Comparative Genomic Hybridization (CGH); Next Generation Sequencing (NGS) and EMBRACE. It was possible to conclude that the Trofoectoderma Biopsy, New Generation Sequencing and EMBRACE techniques are the most used in the RHA laboratories, as they provide better results in the embryos that will be transferred.

Keywords: Preimplantation genetic diagnosis. Biopsy. Fertilization *in vitro*. Embryos. Infertility.

REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, P. B. L; DUARTE, O. B. F; SOARES, J. B. Perspectivas de uso da hibridização genômica comparativa como rastreamento pré-implantacional em biópsias de embrião humano no estágio de blastocisto. **Reprodução e Climatério**, São Paulo, v. 28, n. 2, p. 74-79, 2013.
- AQUINO, A. C; MARTINHAGO, A. C. N; MARTINHAGO, C. D. Biópsia embrionária: qual a melhor escolha? **Reprodução e Climatério**, São Paulo, v. 28, n. 3, p. 122-129, 2014.
- BASILLE, C *et al.* Preimplantation genetic diagnosis: state of the art. **European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology**, Amsterdã, v. 145, n. 1, p. 9-13, 2009.
- BICK, D. P; LAU, E.C. Preimplantation genetic diagnosis. **Pediatric Clinics of North America**, Filadélfia, v. 53, n. 4, p. 559-577, 2006.
- BUTLER, R *et al.* Analysis of PGT-M and PGT-SR outcomes at a canadian fertility clinic. **Prenatal Diagnosis**, Bathesda, v. 39, p. 866-870, 2019.
- CHANG, L. J *et al.* An update of preimplantation genetic diagnosis in gene diseases, chromosomal translocation, and aneuploidy screening. **Clinical and Experimental Reproductive Medicine**, Yatap-ro, Bundang-gu, Seongnam-si, Gyeonggi-do, Coreia, v. 38, n. 3, p. 126-134, 2011.
- CORRÊA, M. C. D; LOYOLA, M. A. Tecnologias de reprodução assistida no brasil: opções para ampliar o acesso. **Revista de Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 25, n. 3, p. 753-777, 2015.
- CORREIA, A. N. **Diagnóstico genético pré-implantacional**. 2015. 35f. Monografia (Especialização em Genética para Professores do Ensino Médio) - Universidade Federal do Paraná, 2015.
- DANTAS, E. L. R *et al.* Genética do câncer hereditário. **Revista Brasileira de Cancerologia**, Rio de Janeiro, v. 55, n. 3, p. 263-269, 2009.

DAHDOUH, E. M; BALAYLA, J. C; VELASCO, J. A. G. Impact of blastocyst and comprehensive chromosome screening technology on preimplantation genetic screening: a systematic review of randomized controlled trials. **Reproductive BioMedicine Online**, Filadélfia, v. 30, p. 281-289, 2015.

FREITAS, M; SIQUEIRA, A. A. F; SEGRE, C. A. M. Avanços em reprodução assistida. **Journal of Human Growth and Development**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 93-97, 2008.

DEVOLDER, K. Preimplantation HLA typing: having children to save our loved ones. **Journal of Medical Ethics**, Reino Unido, v. 31, p. 582-586, 2005.

ELER, K. C. G; RAMOS, K. P. M; OLIVEIRA, M. T. P. Diagnóstico genético pré-implantação (DGPI): uma eugenia mascarada?. **Revista Ibero Americana de Bioética**, Comillas, n. 09, p. 01-15, 2019.

ETHICS COMMITTEE OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE *et al.* Use of preimplantation genetic testing for monogenic defects (PGT-M) for adult-onset conditions: an ethics committee opinion. **Fertility and Sterility**, Alabama, v. 109, n. 6, p. 989-992, 2018.

FAID, Y. I. **Nuevos métodos de diagnóstico genético en reproducción asistida**. 2020. 56f. Trabalho de Conclusão de Curso (Graduação em Biologia) Faculdade de Ciências, Espanha, 2020.

FÉLIX, L. O. R. S; OLIVEIRA, M. A. F; BARBOSA, A. H. D. O Diagnóstico genético pré-implantacional na clínica biomédica. *In*: CONGRESSO BRASILEIRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE, 1., 2016, Campina Grande. **Anais...** Campina Grande: Centro de Convenções Raymundo Asfora Garden Hotel, 2016.

FIORENTINO, F *et al.* Application of next-generation sequencing technology for comprehensive aneuploidy screening of blastocysts in clinical preimplantation genetic screening cycles. **Human Reproduction**, Indianápolis, São Paulo, v.29, n.12, p. 2802-2813, 2014.

FIORENTINO, F *et al.* Development and validation of a next-generation sequencing–based protocol for 24-chromosome aneuploidy screening of embryos. **Fertility and Sterility**, Alabama, v. 101, n. 5, p. 1375-1382, 2014.

FIGUEIRA, R. C. S *et al.* Preimplantation diagnosis for β -thalassemia combined with HLA matching: first “savior sibling” is born after embryo selection in Brazil. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Alabama, v. 29, p. 1305-1309, 2012.

FRANASIAK, J. M *et al.* Aneuploidy across individual chromosomes at the embryonic level in trophectoderm biopsies: changes with patient age and chromosome structure. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Alabama, v. 31, p. 1501-1509, 2014.

FRANASIAK, J. M *et al.* The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophoctoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. **Fertility and Sterility**, Alabama, v.101, n.3, p.656-663, 2014.

GERAEDTS, J. P. M; DE WERT, G. M. W. R. Preimplantation genetic diagnosis. **Clinical Genetics**, Nova Jersey, EUA, v. 76, n. 4, p. 315–325, 2009.

GONÇALVES, G. P *et al.* Implicações do diagnóstico genético pré-implantação na análise dos erros inatos do metabolismo na prática clínica. **Revista Educação em Saúde**, Anápolis, v. 7, n. 1, p. 311-316, 2019.

HADDAD, G *et al.* Assessment of aneuploidy formation in human blastocysts resulting from donated eggs the necessity of the embryos for aneuploidy screening. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Alabama, v. 32, p. 999-1006, 2015.

HELENO, S. S. A. **Fatores genéticos e cromossomais na perda gestacional**. 2014. 31f. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Universidade do Porto, 2016.

IGENOMIX. **Embrace** – Análise do meio de cultura embrionário. São Paulo (online). Disponível em: <https://www.igenomix.com.br/genetic-solutions/embrace-non-invasive-pgt-a/>. Acesso em: 13 out. 2020.

KANAVAKIS, E; TRAEGER, J. S. Preimplantation genetic diagnosis in clinical practice. **Journal of Medical Genetics**, Nova York, v. 39, n. 1, p. 6-11, 2002.

KULIEV, A. *et al.* Preimplantation genetics improving access to stem cell therapy. **Annals of the New York Academy of Sciences**, Nova York, v. 1054, p. 223–227, 2005.

KUMAR, N; SINGH, A.K. Trends of male fator infertility, and importante cause of infertility: a review of literature. **Journal of Human Reproductive Sciences**, Índia, v. 8, n. 4, p. 191-196, 2015.

LUNA, N. Embriões geneticamente selecionados: os usos do diagnóstico genético pré-implantação e o debate antropológico sobre a condição de pessoa. **Revista de Ciências Sociais**, Ceará, n. 20, p. 61-79, 2004.

LUNA, N. Natureza humana criada em laboratório: biologização e genetização do parentesco nas novas tecnologias reprodutivas. **História, Ciências, Saúde-Manguinhos**, Rio de Janeiro, v. 12, n. 2, p. 395-417, 2005.

MAYANA, Z. A biologia molecular contribuindo para a compreensão e a prevenção das doenças hereditárias. **Ciência e Saúde Coletiva**, Rio de Janeiro, v. 7, n. 1, p. 85-99, 2002.

- MENDES, M. C; COSTA, A. P. P. Diagnóstico genético pré-implantacional: prevenção, tratamento de doenças genéticas e aspectos ético legais. **Revista de Ciências Médicas e Biológicas**, Bahia, v. 12, n. 3, p. 374-379, 2013.
- MUNNÉ. S *et al.* Substandard application of preimplantation genetic screening may interfere with its clinical success. **Fertility and Sterility**, Alabama, v. 88, n. 4, p. 781-784, 2007.
- MUNNÉ. S. Preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy and translocations using array comparative genomic hybridization. **Current Genomics**, França, v. 13, n. 6, p. 463-470, 2012.
- NOGUEIRA, J. P. F. **Resultados das técnicas de reprodução medicamente assistida de segunda linha, FIV e ICSI, na unidade de medicina reprodutiva do CHCB**. 2016. 36f. Dissertação (Mestrado em Medicina) - Universidade da Beira interior, 2016.
- PASCUAL, C. M. G *et al.* Optimized NGS approach for detection of aneuploidies and mosaicism in PGT-A and imbalances in PGT-SR. **Genes**, Amsterdã, v. 724, n. 11, p. 1-11, 2020.
- PASQUALOTTO, F. F. Investigation and assisted reproduction in the treatment of male infertility. **Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetrícia**, São Paulo, v. 29, n. 2, p. 103-112, 2007.
- PIZZATO, B. R *et al.* Revisão das técnicas de biologia molecular aplicadas no diagnóstico genético pré-implantacional e uma reflexão ética. **Reprodução e Climatério**, São Paulo, v. 32, n. 1, p. 7-14, 2017.
- POLIS, C. P *et al.* Estimating infertility prevalence in low-to-middle-income countries: an application of a current duration approach to demographic and health survey data. **Human Reproduction**, Indianápolis, v. 32, n. 5, p. 1064-1074, 2017.
- POMPEU, T. N; VERZELETTI, F. B. Diagnóstico genético pré-implantacional e sua aplicação na reprodução humana assistida. **Reprodução e Climatério**, São Paulo, v. 30, n. 2, p.83-89, 2015.
- PRACTICE COMMITTEES OF THE AMERICAN SOCIETY FOR REPRODUCTIVE MEDICINE *et al.* The use of preimplantation genetic testing for aneuploidy (PGT-A): a committee opinion. **Fertility and Sterility**, Alabama, v. 109, n. 3, p. 429-436, 2018.
- PRAJIANTE. F, M; BUSSO, N. E. O uso do diagnóstico genético pré-implantacional em pacientes com aborto de repetição: revisão do uso da técnica de array-CGH. **Reprodução e Climatério**, São Paulo, v. 8, n. 1, p.36-40, 2013.
- PRINER, S *et al.* The effect of repeated biopsy on pre-implantation genetic testing

for monogenic diseases (PGT-M) treatment outcome. **Journal of Assisted Reproduction and Genetics**, Alabama, v. 36, p. 159-164, 2019.

RODRIGUES, A.L.G. **Time-lapse e o uso da morfocinética para a monitorização do desenvolvimento de embriões humanos**. (Relatório de mestrado apresentado a Faculdade de Ciências da Universidade de Porto em Biologia Celular e Molecular). 146f, 2017.

ROUPA, Z *et al.* Causes of infertility in women at reproductive age. **Health Science Journal**, Londres, v. 3, n. 2, p. 80-87, 2009.

RUBIO, C *et al.* Clinical application of embryo aneuploidy testing by next-generation sequencing. **Biology of Reproduction**, Nova York, v.101, n.6, p.1083-1090, 2019.

RUBIO, C *et al.* Multicenter prospective study of concordance between embryo cell-free DNA and trophectoderm biopsies from 1,301 human blastocysts. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, Amsterdã, v. 223, n. 5, p. 751.e1-751.e13, 2020.

RUBIO, C *et al.* The importance of good practice in preimplantation genetic screening: critical viewpoints. **Human Reproduction**, Indianápolis, v.24, n.8, p.2045-2047, 2009.

SAPÚLVEDA, S; PORTELLA, J. Diagnóstico genético preimplantacional: alcances y límites. **Revista Peruana de Ginecología y Obstetricia**, Lima, v. 58, p. 207-211, 2012.

SOEIRO, C. A. S. P. **Diagnóstico genético pré-implantação**. 2012. 27f. Dissertação (Mestrado em Medicina) – Universidade do Porto, 2012.

TREFF, N. R; ZIMMERMAN, R. S. Advances in preimplantation genetic testing for monogenic disease and aneuploidy. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, Califórnia, v. 18, p. 189-200, 2017.

WHO. World Health Organization. **Infertility**. 14.7.2020. Disponível em: <https://redlara.com/images/arquivo/Infertility.pdf>. Acesso em: 01 dez. 2020.

WOLFF, P; MARTINHAGO, C. D; UENO, J. Diagnóstico genético pré-implantacional: uma ferramenta importante para a rotina de fertilização in vitro? **Femina**, Rio de Janeiro, v. 37, n. 6, p. 297-303, 2009.