

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
ESCOLA DE CIÊNCIAS MÉDICAS E DA VIDA
GRADUAÇÃO EM BIOMEDICINA



TESTE GENÉTICO PRÉ-IMPLANTACIONAL: REVISÃO LITERÁRIA

REBECA PRATA DO AMARAL

GOIÂNIA

2024

REBECA PRATA DO AMARAL

TESTE GENÉTICO PRÉ-IMPLANTACIONAL: REVISÃO LITERÁRIA

Trabalho de conclusão de curso apresentado à Escola de Ciências Médicas e da Vida da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Bacharelado em Biomedicina.

Orientadora: Ms. Bárbara Mariotto Bordin Dourado

GOIÂNIA

2024

REBECA PRATA DO AMARAL

TESTE GENÉTICO PRÉ-IMPLANTACIONAL: REVISÃO LITERÁRIA

Este Trabalho de Conclusão de Curso julgado adequado para obtenção do título de Bacharel em Biomedicina, e aprovado em sua forma final pela Escola de Ciências Médicas e da Vida, da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, em ____/____/_____.

Nome do coordenador(a) de TCC

Coordenador(a) de Trabalho de Conclusão de Curso

Banca examinadora:

Orientadora: Profa. Ms. Bárbara Mariotto Bordin
Dourado

Profa. Dra. Kátia Karina Verolli De O. Moura

Prof. Ms. Flávia Martins Nascente

GOIÂNIA

2024

RESUMO

As técnicas de reprodução assistida, como os testes genéticos pré-implantacionais (PGT), são importantes para a medicina reprodutiva porque podem diminuir o risco de transmissão de doenças genéticas de pais para filhos. O PGT é uma tecnologia que pode identificar e selecionar embriões geneticamente saudáveis antes da transferência para o útero da mãe, aumentando assim as chances de uma gravidez bem-sucedida e prevenindo doenças genéticas graves nos bebês. O objetivo deste estudo é apresentar as técnicas utilizadas atualmente em PGT e sua importância como uma opção de tratamento para casais com histórico de doenças genéticas. Existem diferentes tipos de PGT, incluindo o PGT-A, que analisa aneuploidia cromossômica, o PGT-M, que identifica genes associados a doenças hereditárias, e o PGT-SR que analisa alterações muito pequenas nos cromossomos. Mesmo com o desenvolvimento de tecnologias avançadas, como a amplificação do genoma completo (WGA), análises como hibridação comparativa do genoma (CGH), *Array* (aCGH), polimorfismo de nucleotídeo único (SNP), sequenciamento de próxima geração (NGS) e reação em cadeia da polimerase quantitativa em tempo real (RT-qPCR), estas tecnologias apresentam alguns desafios que devem ser considerados, como os custos, complexidade e questões éticas. O aconselhamento genético apropriado é fundamental para ajudar os casais a tomar decisões sobre o uso de PGT.

Palavras-chave: PGT; PGT-A; PGT-M; PGD; pré-implantação, teste.

ABSTRACT

Assisted reproduction techniques, such as preimplantation genetic testing (PGT), are important in reproductive medicine because they can reduce the risk of transmitting genetic diseases from parents to children. PGT is a technology that can identify and select genetically healthy embryos before transfer to the mother's uterus, thus increasing the chances of a successful pregnancy and preventing serious genetic diseases in babies. The aim of this study is to present the techniques currently used in PGT and their importance as a treatment option for couples with a history of genetic diseases. There are different types of PGT, including PGT-A, which analyzes chromosomal aneuploidy, PGT-M, which identifies genes associated with hereditary diseases, and PGT-SR, which analyzes very small chromosomal alterations. Despite the development of advanced technologies such as whole genome amplification (WGA), analyses such as comparative genomic hybridization (CGH), arrays (aCGH), single nucleotide polymorphism (SNP), next-generation sequencing (NGS), and real-time quantitative polymerase chain reaction (RT-qPCR), these technologies present some challenges that must be considered, such as costs, complexity, and ethical issues. Appropriate genetic counseling is essential to help couples make decisions about the use of PGT.

Keywords: PGT; PGT-A; PGT-M; PGD, pre-implantation; testing.

LISTA DE SIGLAS

aCGH = Hibridização Genômica Comparativa por *Array*

ADO = Abandono de Alelos

ARTs = Técnicas de Reprodução Assistida

CCS = Triagem Cromossômica

CGH = Hibridação Comparativa Do Genoma

CP = Corpos Polares

DMD = Distrofia Muscular De Duchenne

DOP-PCR = PCR de Primer de Oligonucleotídeo Degenerado

FISH = Hibridização *In Situ* Por Fluorescência

FIV = Fertilização *In Vitro* Convencional

HLA = Antígeno Leucocitário Humano

ICSI = Injeção Intracitoplasmática de Espermatozoides

MALBAC = Amplificação Baseada em Looping

MDA = Amplificação de Deslocamento Múltiplo

NGS = Sequenciamento De Próxima Geração

PCR = Reação Em Cadeia Da Polimerase

PEP-PCR = PCR de Pré-Amplificação de Extensão de Primer

PGD = Diagnóstico Genético Pré-Implantacional

PGDIS = Sociedade Internacional de Diagnóstico Genético Pré-implantacional

PGT = Teste Genético Pré-Implantacional

PGT-A = Teste Genético Pré-Implantacional para Aneuploidias

PGT-M = Teste Genético Pré-Implantacional para Defeitos Monogênicos/ de gene único

PGT-SR = Teste Genético Pré-Implantacional para Rearranjos Estruturais Cromossômicos

RT-Qpcr = Reação Em Cadeia Da Polimerase Quantitativa em Tempo Real

SNP = Polimorfismo De Nucleotídeo Único

TE = Biópsia Externa de Trofotoderma

WGA = Amplificação do Genoma Completo

SUMÁRIO

| | | |
|------------|---|----|
| 1 | INTRODUÇÃO | 7 |
| 2 | METODOLOGIA | 8 |
| 3 | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 9 |
| 3.1 | Indicações e contraindicações para o PGT | 9 |
| 3.1.1 | PGT-M..... | 9 |
| 3.1.2 | PGT-A | 10 |
| 3.1.3 | PGT-SR | 11 |
| 3.1.4 | Contraindicações | 12 |
| 3.2 | Etapas e aplicações do PGT na fertilização <i>in vitro</i> | 13 |
| 3.3 | Limitações técnicas do PGT | 16 |
| 3.4 | O PGT em relação a outras técnicas de diagnóstico pré-natal..... | 17 |
| 4 | CONSIDERAÇÕES FINAIS | 18 |
| | REFERÊNCIAS | 19 |

1 INTRODUÇÃO

As técnicas de reprodução assistida (ARTs), como o diagnóstico genético pré-implantacional (PGD), são de grande importância para a área da medicina reprodutiva. Através dele, é possível reduzir os riscos de transmissão de doenças hereditárias de pais para filhos¹. O termo diagnóstico genético pré-implantacional foi substituído pelo teste genético pré-implantacional (PGT), sendo utilizado para análise de aneuploidias (PGT-A), defeitos monogênicos ou de gene único (PGT-M) e para rearranjos estruturais cromossômicos (PGT-SR)².

Durante o PGT é realizada a biópsia, de uma ou de um número reduzido de células, de oócitos ou embriões, para verificar a presença de alterações genéticas que podem causar alguma anormalidade cromossômica, permitindo a seleção de embriões saudáveis para serem transferidos ao útero materno^{3,4}.

Este estudo visa apresentar as técnicas utilizadas atualmente em PGT e sua importância como uma opção de tratamento para casais com histórico de doenças genéticas. Pois o potencial promissor do PGT para melhorar as chances de sucesso da implantação é evidente considerando os resultados reprodutivos obtidos. Mesmo que diversos fatores possam influenciar os resultados, incluindo sexo e idade, ele tem se mostrado ser especialmente eficaz em mulheres de idade avançada⁵.

2 METODOLOGIA

Este estudo consiste em uma revisão integrativa de literatura que adota uma abordagem qualitativa, focalizando a importância do Teste Genético Pré-implantacional (PGT) como uma alternativa de tratamento para casais em risco de transmitir doenças hereditárias aos seus descendentes. O escopo desta revisão abrange as indicações clínicas, técnicas empregadas, métodos de diagnóstico utilizados e a precisão do PGT.

Para compilar a base bibliográfica, foi realizado um levantamento nas seguintes bases de dados: PubMed, Lilacs, Scielo, Biblioteca Virtual em Saúde (BVS Brasil), Google Acadêmico e ScienceDirect. As palavras-chave utilizadas na pesquisa incluíram termos como: “PGT”, “PGT-A”, “PGT-M”, “PGD”, “pré-implantação”, “teste”, em português e/ou inglês. Os critérios de inclusão adotados para essa pesquisa compreenderam artigos e revisões bibliográficas com acesso completo e livre, predominantemente publicados nos últimos cinco anos (2018-2023), com o objetivo de fornecer uma revisão atualizada sobre o tema. No total, foram selecionados 54 artigos que serviram como base para fundamentar este levantamento.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Indicações e contraindicações para o PGT

3.1.1 PGT-M

O teste genético pré-implantacional para defeitos de gene único (PGT-M) é utilizado em embriões fertilizados *in vitro* para a pesquisa de alterações gênicas, principalmente, ligadas ao cromossomo X, distúrbios autossômicos dominantes e recessivos, nos genes mitocondriais e para tipagem de antígeno leucocitário humano (HLA)³. A maioria dos casais que realizam o PGT-M são capazes de conceber naturalmente, entretanto, apresentam antecedentes familiares de doenças hereditárias ou têm um filho já afetado. Existem mais centenas de indicações para a realização do PGT-M, as quais variam conforme a frequência das doenças monogênica na comunidade local, podendo ser influenciadas pela etnia e pela região geográfica⁶.

A maior parte das análises são realizadas para doença de Huntington, cânceres hereditários, síndrome do X-frágil, distrofia miotônica tipo 1, fibrose cística, síndrome de Marfan, neurofibromatose, beta talassemia e distrofia muscular de Duchenne (DMD)⁷. As mutações genéticas que causam doenças autossômicas dominantes apresentam um risco de 50% de serem transmitidas aos descendentes, como ocorre na doença de Huntington ou em cânceres hereditários. Em doenças autossômicas recessivas, essa chance é de 25%, como é o caso da beta talassemia, e em distúrbios ligados ao X, como a hemofilia e síndrome do X-frágil, afetam 50% dos homens, enquanto 50% das mulheres podem ser portadoras dessas condições⁸.

O DNA mitocondrial é encontrado em múltiplas cópias no interior da mitocôndria, e em caso de mutação de algumas dessas cópias, elas podem coexistir com as cópias normais em uma célula, condição chamada de heteroplasmia. O PGT-M pode ser realizado para selecionar embriões com carga mutacional abaixo do limite de expressão, evitando a transmissão de doenças mitocondriais graves transmitidas pela mãe⁹.

O PGT-M pode ser aplicado como um teste de exclusão/não divulgação em casais com histórico familiar de doenças de início tardio, como a doença de Huntington, evitando a necessidade de realizar testes pré-sintomáticos. Os resultados dos testes não são compartilhados com o casal, independentemente de serem afetados ou não pela condição, mas é selecionado um embrião não afetado pela doença para implantação¹⁰.

Em algumas situações, em que casais já possuem um filho afetado por alguma doença hematológica ou imunológica que necessita de transplante de células-tronco hematopoiéticas,

o PGT pode ser usado para a tipagem do HLA. Selecionando assim, embriões geneticamente livres da doença e compatíveis com o irmão afetado, possibilitando um futuro transplante¹¹.

Com a utilização de PGT-M, casais com histórico de doenças monogênicas na família podem submeter os embriões a uma avaliação antes da implantação. Evitando a concepção de uma gravidez sem essa avaliação, na qual os pais poderiam transmitir doenças genéticas graves aos filhos. Além disso, elimina a necessidade de procedimentos invasivos de diagnóstico pré-natal, evitando o dilema de interrupção da gravidez se o feto for afetado por uma doença genética¹².

3.1.2 PGT-A

O PGT-A, teste genético pré-implantacional para aneuploidia, é utilizado em embriões fertilizados *in vitro* para a pesquisa de aberrações cromossômicas, detectando e selecionando embriões livres de alterações cromossômicas numéricas, prevenindo complicações na gravidez, como falhas na implantação, abortos e o nascimento de crianças afetadas por anomalias cromossômicas¹³.

A fertilidade humana segue uma curva em forma de U invertido, com taxas reduzidas de fertilidade em mulheres jovens (< 20 anos) e em mulheres com idade materna avançada. Isso se deve principalmente às aneuploidias meióticas, resultantes de problemas como não disjunção na meiose I e separação precoce das cromátides irmãs¹⁴. Grande parte das aneuploidias que tem sua origem no processo de divisão celular feminino se torna ainda mais frequente em mulheres com idade materna avançada, principalmente após os 35 anos de idade. A prevalência frequente de aneuploidias cromossômicas em gametas e embriões é um dos principais fatores contribuintes para a falta de sucesso na fertilização *in vitro*¹².

Por sua vez, o mosaicismismo se manifesta quando ocorrem falhas durante as divisões mitóticas do embrião, incluindo atrasos na fase de anáfase, não disjunção cromossômica e divisão celular prematura. A extensão do efeito nas células depende da fase de clivagem em que a mutação ocorre. Nessa condição genética, o indivíduo apresenta uma mistura de células normais e células com alterações cromossômicas¹⁵. A probabilidade de um bebê nascer vivo e saudável dependerá da taxa de mosaicismismo e do tipo de aneuploidia. Portanto, o PGT-A faz uma seleção quantitativa das alterações nos embriões, classificando-os de acordo com os níveis de aberrações cromossômicas, desde os normais, com baixo nível de mosaicismismo e os intransferíveis¹⁶.

O PGT-A tem sido amplamente utilizado em situações em que há um elevado risco de aneuploidia dos embriões, incluindo casos de recorrentes falhas de implantação, casais com cariótipos normais que sofreram aborto espontâneo recorrente e infertilidade grave por fator masculino¹⁷. Os abortos espontâneos, que envolvem a ausência de batimentos cardíacos fetais, são mais frequentes durante o primeiro trimestre da gravidez, muitas vezes relacionados a aneuploidias. A utilização do PGT-A tem o potencial de melhorar as taxas de sucesso na implantação, especialmente em mulheres de idade avançada, mesmo quando há poucos embriões disponíveis para transferência, pois reduz o risco de aborto espontâneo¹⁸.

As aneuploidias em espermatozoides também podem resultar em baixa implantação e altas taxas de aborto. Em homens inférteis, a oligozoospermia (menos de 15 milhões de espermatozoides/mL de amostra) está ligada a aumento de ocorrência de dissomia (presença de dois cromossomos provenientes de apenas um progenitor) nos cromossomos sexuais, 18 e 21, e espermatozoides diploides. Já o aumento das aneuploidias em cromossomos sexuais, está principalmente relacionado aos espermatozoides de testículos afetados pela azoospermia (ausência de espermatozoides) não obstrutiva e de homens com microdeleções no cromossomo Y¹⁹.

Apesar dos benefícios do PGT-A, especialmente para mulheres de idade avançada devido ao aumento da incidência de aneuploidia, é fundamental realizar uma avaliação individualizada de cada paciente para garantir que a recomendação deste teste seja eficaz e economicamente viável²⁰.

3.1.3 PGT-SR

O teste genético pré-implantacional para rearranjos estruturais (PGT-SR) é capaz de analisar anormalidades cromossômicas muito pequenas, sendo utilizada para avaliar a presença de alterações nos cromossomos, como inversões, translocações, duplicações e/ou deleções²¹. Rearranjos cromossômicos estruturais como as translocações balanceadas, alteram a disposição dos segmentos cromossômicos, mas não resultam em alterações no número de cópias, não resultando em manifestações fenotípicas em seus portadores. As translocações que envolvem cromossomos acrocêntricos são chamadas de Robertsonianas, e as que ocorrem troca de segmentos de dois cromossomos não homólogos são chamadas de recíprocas²².

Na meiose de indivíduos que possuem essas alterações, a recombinação dos cromossomos pode resultar na produção de gametas com um número anormal de cópias cromossômicas. Isso pode levar a desequilíbrios nos óvulos e/ou espermatozoides, diminuindo

a fertilidade, aumentando a probabilidade de falhas de implantação e de abortos espontâneos. Em casos de nascimentos bem-sucedidos, a criança pode apresentar deficiências físicas e mentais²³.

A técnica de PGT-SR possibilita a identificação e escolha de embriões euploides balanceados ou normais para transferência, com o propósito de reduzir as probabilidades de abortos espontâneos e, ao mesmo tempo, aumentar as perspectivas de uma gravidez bem-sucedida em casais que apresentam translocações balanceadas²⁴.

3.1.4 Contraindicações

O PGT não é oferecido em cenários onde um diagnóstico genético preciso da doença não é alcançado, ou onde informações sobre o local do gene causador da doença são inconclusivas. Da mesma forma, não são realizados em situações em que ocorre a seleção de características não relacionadas à doença, como aparência física, altura e cor da pele. Tais restrições também se aplicam em circunstâncias onde as leis, regulamentos ou considerações éticas locais limitam a utilização do PGT²⁵.

3.2 Etapas e aplicações do PGT na fertilização *in vitro*

A técnica de fertilização *in vitro* (FIV) mais indicada pré-PGT é a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), uma vez que essa abordagem previne o acúmulo de espermatozoides residuais ligados à zona pelúcida, o que é comum na FIV convencional⁶.

Na técnica tradicional de ICSI, são utilizadas micropipetas afiladas e pontiagudas para penetrar na membrana do oócito, enquanto simultaneamente aspiram uma pequena quantidade de citoplasma para dentro da micropipeta, permitindo a injeção do espermatozoide no interior do oócito²⁶. Após a inseminação, os oócitos são cultivados em meio especializado contendo os nutrientes necessários ao desenvolvimento do embrião, que são então incubados para controle das variáveis ambientais. A confirmação da fertilização ocorre algumas horas depois, mediante a presença de dois pró-núcleos e a extrusão do segundo corpúsculo polar. O desenvolvimento do embrião é avaliado e a seleção é baseada na morfologia e nas taxas de clivagem^{27,28}.

A biópsia do embrião e sua análise podem ser realizadas em três estágios diferentes de seu desenvolvimento: biópsia do primeiro e segundo corpúsculo polar (DNA de oócitos), blastômeros em estágio de clivagem e células trofoblásticas de blastocistos. Em todos esses estágios, é necessário romper a zona pelúcida do embrião para que seja possível remover as células necessárias²⁹. Os corpos polares (CP) resultam do processo de meiose do oócito e podem ser removidos sem comprometer a integridade embrionária, sendo importante observar que 90% dos erros meióticos em embriões têm origem materna. Uma desvantagem é a falta de avaliação de potenciais anormalidades paternas, além da impossibilidade de detectar anormalidades que possam surgir em estágios posteriores, como o mosaicismo^{30,31}.

Por muitos anos, a biópsia de blastômero em estágio de clivagem tem sido amplamente aplicada, embora seja um procedimento mais invasivo. Porém apresenta algumas limitações, como a disponibilidade limitada de DNA para testes e os efeitos adversos decorrentes da retirada de células embrionárias^{32,3}. A biópsia externa de trofotoderma (TE) é realizada em embriões no estágio de blastocisto e é menos invasiva, permitindo a análise de um maior número de células, já que essas células têm a função de formar a placenta e membranas extra-embrionárias. Essa maior quantidade de material genético não apenas amplia a capacidade de análise, mas também contribui para aprimorar a precisão e a confiabilidade do teste^{33,34}.

Inicialmente, a avaliação genética era realizada com Hibridização *in situ* por Fluorescência (FISH), mas essa abordagem analisa um número bastante limitado de cromossomos. Novas abordagens foram elaboradas para possibilitar uma avaliação mais

abrangente, incluindo Hibridização Genômica Comparativa por *Array* (aCGH), o Sequenciamento de Próxima Geração (NGS) e a Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa em Tempo Real (qPCR)⁴.

O desenvolvimento da amplificação do genoma completo (WGA) permitiu que quantidades limitadas de DNA disponíveis, de uma ou algumas células, fossem replicadas e gerassem quantidade suficiente de DNA para análises genômicas mais abrangentes. Esse método é realizado com o uso de primers aleatórios ou parcialmente aleatório, para amplificar o genoma inteiro, sem foco específico em regiões particulares³⁵. A WGA pode ser baseada na reação em cadeia da polimerase (PCR), como é o caso da PCR de Pré-Amplificação de Extensão de Primer (PEP-PCR) e PCR de Primer de Oligonucleotídeo Degenerado (DOP-PCR). Além disso, existem tecnologias de amplificação isotérmica, como Ciclos Múltiplos de Recozimento e Amplificação Baseada em Looping (MALBAC), bem como Amplificação de Deslocamento Múltiplo (MDA)³⁶.

A DOP-PCR foi uma das primeiras abordagens de WGA desenvolvida, ela é baseada na PCR, e utiliza amplificação não seletiva para alcançar o sequenciamento completo do genoma. Seus primers possuem seis nucleotídeos aleatórios incorporados entre sequências curtas definidas nas duas extremidades. Ao longo do tempo, esse método passou por diversos aprimoramentos, envolvendo ajustes na quantidade de ciclos, alterações nas sequências de *primers* e variações nas polimerases de DNA utilizadas^{36,37}. O método MDA é uma tecnologia de WGA que utiliza amplificação isotérmica, não dependendo da PCR, permitindo a amplificação do material genético de uma única célula em até 10^6 vezes. Em comparação com as técnicas baseadas em PCR, este método apresenta uma cobertura genômica mais ampla e imparcial, característica extremamente vantajosa³⁸.

O MDA é preferencialmente usado para a detecção de mutações em genes únicos. Contudo, é essencial considerar as vantagens e desvantagens de cada método de WGA antes da aplicação, avaliando critérios como a uniformidade da cobertura genômica, a fidelidade nas sequências, a quantificação confiável de variações no número de cópias e a possível ocorrência de erros técnicos³⁹.

A técnica de qPCR é rápida, economicamente viável e fornece precisão na análise, sendo capaz de identificar aneuploidias cromossômicas completas. A principal vantagem desse método reside na amplificação direta do material, eliminando a necessidade de utilização de WGA⁴⁰. Embora o qPCR não seja capaz de identificar aneusomias (deleção ou duplicação de dois ou mais genes vizinhos), ela oferece taxas de implantação superior no contexto do PGT-

A. No entanto, o aCGH é um método superior ao qPCR e atualmente é amplamente empregado para detectar anormalidades segmentares e translocações não equilibradas⁴¹.

A técnica de CGH é uma abordagem molecular capaz de identificar diferenças no número de cópias de segmentos genômicos entre duas amostras de DNA, uma amostra de teste e uma amostra controle. Nesse método, há uma hibridização do DNA da amostra teste com a controle, e a análise comparativa pode ser categorizada como equilibrada, com cópias adicionais ou com cópia de arquivos em diversas regiões do genoma⁴². A técnica de aCGH combina a tecnologia da CGH com o uso de microarranjos, sendo muito utilizada na avaliação do número de cópias de todos os cromossomos. Este método surgiu como uma alternativa à técnica de FISH na maioria das análises para identificação de aneuploidias, possibilitando uma detecção rápida e eficaz de todas as aberrações cromossômicas desequilibradas^{42,43}.

Já a análise de conjuntos de SNPs é capaz de identificar a dissomia uniparental, determinar a origem parental de anormalidades cromossômicas e detectar triploidias. Essa técnica envolve a hibridização de DNA, microscopia de fluorescência e a captura de DNA em uma superfície sólida^{4,44}. Os procedimentos de microarranjo de SNP possibilitam a avaliação simultânea de cada cromossomo, embora apresentem um custo mais elevado. Algumas pesquisas evidenciam que, ao empregar a matriz de SNP para PGT-A, as taxas de gravidez demonstram um aumento significativo em comparação com as taxas obtidas por meio da técnica de FISH⁴⁵.

A tecnologia de NGS demonstra a capacidade de executar sequenciamento de alto rendimento e alta resolução por síntese, proporcionando uma detecção segura de aneuploidias em cromossomos completos, translocações desequilibradas, com uma taxa de mosaïcismo detectável entre 20% e 80%⁴⁶. O NGS oferece vantagens na detecção de pequenas deleções, duplicações cromossômicas e análise de haplótipos. Quando utilizado no PGT-A, apresenta taxas significativamente superiores de implantação e nascidos vivos em comparação com o aCGH, apesar de ambos os métodos demonstrarem consistência no diagnóstico. Devido à sua capacidade superior na detecção de mosaïcismo, a Sociedade Internacional de Diagnóstico Genético Pré-implantacional (PGDIS) recomenda o NGS como técnica preferencial para PGT-A^{41,47}.

Embora alguns laboratórios ainda utilizem aCGH para a análise de microarranjos, sua aplicação em PGT tem diminuído. Da mesma forma, as matrizes SNP também podem estar seguindo essa tendência, cedendo espaço para a ascensão da técnica de NGS⁴⁸.

3.3 Limitações técnicas do PGT

Apesar do avanço das tecnologias, estabelecer protocolos para o PGT é um processo complexo que está sujeito a várias falhas potenciais. Estas incluem problemas como falhas na amplificação, contaminação do DNA materno ou paterno, falhas nas sondas ou *primers*, mosaicismos e abandono de alelos (ADO). A ocorrência de ADO é comum em testes de PCR em células únicas e pode comprometer a confiabilidade do teste. Taxas ideais de ADO são geralmente inferiores a 10%, embora taxas mais altas possam ser toleradas quando se utilizam protocolos baseados em WGA e um número maior de marcadores é empregado⁴⁹.

A precisão do PGT pode ser influenciada por diversos fatores biológicos e técnicos, como células com desequilíbrio de DNA que podem resultar em falsos positivos após a replicação do material genético. Além disso, a presença de células apoptóticas na amostra e técnicas inapropriadas de biópsia podem aumentar a taxa de mosaicismo. No PGT-M, a presença de variantes patogênicas relacionadas a sequências repetitivas longas ou pseudogenes semelhantes podem não ser detectáveis diretamente²⁵.

A técnica de aCGH detecta com confiança mosaicismos que afetam pelo menos 50% das células analisadas, enquanto tecnologias mais sensíveis, como o NGS, podem identificar níveis mais baixos, a partir de 20%. O emprego dessas técnicas mais recentes tem o potencial de aprimorar os resultados clínicos, possibilitando uma seleção de embriões mais precisa⁵⁰.

Devido às complexidades envolvidas, é fundamental que os pais recebam aconselhamento genético antes de iniciar um ciclo clínico. Esse aconselhamento é essencial para fornecer informações cruciais sobre o tratamento, tais como as taxas de sucesso, os riscos de diagnóstico falso-negativo, os possíveis riscos associados à transferência de embriões com mosaico cromossômico, orientações sobre testes pré-natais após o PGT, além de abordar questões relacionadas ao destino dos embriões que não são geneticamente viáveis para transferência⁵¹.

3.4 O PGT em relação a outras técnicas de diagnóstico pré-natal

Pacientes sem histórico conhecido de fatores de risco genético, mas que durante a gravidez têm um achado anormal inesperado em exames de sangue de rotina ou ultrassonografias pré-natais, são indicados para testes pré-natais para diagnóstico⁵². Durante os primeiros dois trimestres de gravidez, os testes de diagnóstico oferecem aos pacientes uma extensa quantidade de dados genéticos pré-natais sobre o feto. Procedimentos invasivos ou diagnósticos pré-natais, podem ser utilizados para examinar as informações genéticas presentes no tecido placentário como a amostragem de vilosidades coriônicas, e presentes no líquido amniótico como a amniocentese, a fim de determinar os cariótipos e as características genéticas do feto⁵³.

O PGT oferece a oportunidade de evitar a transferência de embriões portadores de alterações genéticas ao identificar e transferir embriões saudáveis, é possível evitar a interrupção da gravidez e o risco de aborto associado a esses procedimentos pré-natais⁵⁴.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos o PGT tem sido objeto de avanços contínuos que têm possibilitado a identificação de uma gama cada vez mais ampla de alterações genéticas, como aneuploidias, translocações e doenças monogênicas, no DNA embrionário. O propósito principal dessa evolução é selecionar embriões com maior probabilidade de serem saudáveis para implantação, prevenindo doenças genéticas graves nos bebês e aumentando as chances de sucesso dos tratamentos de fertilidade.

Um dos principais benefícios do PGT é a capacidade de oferecer uma análise detalhada do DNA embrionário antes da transferência, o que é particularmente importante para casais portadores de anomalias genéticas e para mulheres com idade avançada ou histórico de abortos recorrentes. Essa análise prévia permite a identificação precoce de mutações que podem afetar a saúde do bebê, garantindo que apenas embriões geneticamente saudáveis sejam selecionados para a transferência, aumentando assim as chances de uma gestação bem-sucedida e um bebê saudável.

No entanto, apesar dos benefícios promissores, as técnicas de PGT não estão isentas de limitações. Ainda há o risco de falhas no diagnóstico, que podem resultar em embriões saudáveis sendo descartados erroneamente ou em embriões portadores de doenças genéticas sendo selecionados para implantação. Além disso, os custos associados ao PGT são altos, o que limita seu acesso para muitos casais que desejam utilizar a reprodução assistida como uma opção para conceber um filho.

Diante desses desafios, é crucial que sejam realizadas novas pesquisas visando aprimorar as técnicas de PGT, tornando-as mais precisas e confiáveis, e, ao mesmo tempo, buscando maneiras de reduzir os custos envolvidos. Somente assim o PGT poderá se tornar uma opção mais acessível e amplamente disponível para casais que enfrentam dificuldades para conceber naturalmente, contribuindo assim para o avanço da medicina reprodutiva e o alcance de melhores resultados para os pacientes.

REFERÊNCIAS

1. VLAJKOVIC, T. et al. Day 5 versus day 3 embryo biopsy for preimplantation genetic testing for monogenic/single gene defects. **Cochrane Database Syst Rev**, v. 2022, n. 11, p. 1-29, Nov. 2022.
2. ZEGERS-HOCHSCHILD, F. et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. **Fertil Steril**, v. 108, n. 3, p. 393-406, Sep. 2017.
3. DE RYCKE, M.; BERCKMOES, V. Preimplantation Genetic Testing for Monogenic Disorders. **Genes**, v. 11, n. 8, p. 871-886, Jul. 2020.
4. GRECO, E. et al. Preimplantation Genetic Testing: where we are today. **Int J Mol Sci**, v. 21, n. 12, p. 4381, Jun. 2020.
5. DOROFTEI, B. et al. A Mini-Review Regarding the Clinical Outcomes of *In Vitro* Fertilization (IVF) Following Pre-Implantation Genetic Testing (PGT)-Next Generation Sequencing (NGS) Approach. **Diagnostics**, v. 12, n. 8, p. 1911-1927, Ago. 2022.
6. ZANETTI, B. et al. Preimplantation genetic testing for monogenic diseases: a Brazilian ivf centre experience. **JBRA Assist Reprod**, v. 23, n. 2 p. 99-105, Apr. 2019.
7. SPINELLA, F. et al. ESHRE PGT Consortium data collection XXI: PGT analyses in 2018. **Hum Reprod Open**, v. 2023, n. 2, p. 1-9, Apr. 2023.
8. PARIKH, F. R. et al. Evolution and utility of preimplantation genetic testing for monogenic disorders in assisted reproduction - A narrative review. **J Hum Reprod Sci**, v. 14, n. 4, p. 329-339, Oct 2021.
9. JI, D. et al. Preimplantation genetic diagnosis for a carrier with m.3697G > A mitochondrial DNA mutation. **J Assist Reprod Genet**, v. 38, n. 12, p. 3251-3260, Dec. 2021.
10. CARVALHO, F. et al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the organisation of PGT. **Hum Reprod Open**, v. 2020, n. 3, p. 1-12, May 2020.
11. KAKOUROU, G. et al. The clinical utility of PGD with HLA matching: a collaborative multi-centre eshre study. **Hum Reprod**, v. 33, n. 3, p. 520-530, Mar. 2018.
12. DESAI, S. K.; MANGOLI V. S. Chromosomal Analysis of Pre-implantation Embryos: Its Place in Current IVF Practice. **J Obstet Gynaecol India**, v. 70, n. 6, p. 417-424, Nov. 2020.
13. CAPALBO, A. et al. On the reproductive capabilities of aneuploid human preimplantation embryos. **Am J Hum Genet**, v. 109, n. 9, p. 1572-1581, Set. 2022.
14. GRUHN, J. R. et al. Chromosome errors in human eggs shape natural fertility over reproductive life span. **Science**, v. 365, n. 6460, p. 1466-1469, Set. 2019.
15. SPINELLA, F. et al. Extent of chromosomal mosaicism influences the clinical outcome of *in vitro* fertilization treatments. **Fertil Steril**, v. 109, n. 1, p. 77-83, Jan. 2018.
16. HARPER, J. C. et al. Recent developments in genetics and medically assisted reproduction: from research to clinical applications. **Eur J Hum Genet**, v. 26, n. 1, p. 12-33, Jan. 2018.
17. COONEN, E. et al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of structural and numerical chromosomal aberrations. **Hum Reprod Open**, v. 2020, n. 3, p. 1-20, May 2020.
18. SACCHI, L. et al. Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy Improves Clinical, Gestational, and Neonatal Outcomes in Advanced Maternal Age Patients Without

- Compromising Cumulative Live-Birth Rate. **J Assist Reprod Genet**, v. 36, n. 12, p. 2493-2504, Nov. 2019.
19. RUBIO, C. et al. Clinical application of embryo aneuploidy testing by next-generation sequencing. **Biol Reprod**, v. 101, n. 6, p. 1083-1090, Feb. 2019.
 20. SORDIA-HERNANDEZ, L. H. et al. The Effects of Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidy (PGT-A) on Patient-Important Outcomes in Embryo Transfer Cases: a meta-analysis. **J Reprod Infertil**, v. 23, n. 4, p. 231-249, Oct. 2022.
 21. GARCÍA-PASCUAL, C. M. et al. Optimized NGS Approach for Detection of Aneuploidies and Mosaicism in PGT-A and Imbalances in PGT-SR. **Genes**, v. 11, n. 7, p. 724, Jun. 2020.
 22. BARTELS, C. B. et al. *In vitro* fertilization outcomes after preimplantation genetic testing for chromosomal structural rearrangements comparing fluorescence in-situ hybridization, microarray comparative genomic hybridization, and next-generation sequencing. **F S Rep**, v. 1, n. 3, p. 249-256, Dec. 2020.
 23. VIOTTI, M. Preimplantation Genetic Testing for Chromosomal Abnormalities: aneuploidy, mosaicism, and structural rearrangements. **Genes**, v. 11, n. 6, p. 602-638, May 2020.
 24. NAKANO, T. et al. Analysis of clinical outcomes and meiotic segregation modes following preimplantation genetic testing for structural rearrangements using aCGH/NGS in couples with balanced chromosome rearrangement. **Reprod Med Biol**, v. 21, n. 1, p. 1-12, Jan. 2022.
 25. XU, C. et al. Preimplantation genetic testing guidelines of International Society of Reproductive Genetics. **RDM**, v. 7, n. 1, p. 3-11, Mar. 2023.
 26. COSTA-BORGES, N. et al. First babies conceived with Automated Intracytoplasmic Sperm Injection. **Reprod Biomed Online**, v. 47, n. 3, p. 1-12, Set. 2023.
 27. SIMOPOULOU, M. et al. Considerations Regarding Embryo Culture Conditions: from media to epigenetics. **In Vivo**, v. 32, n. 3, p. 451-460, May 2018.
 28. VAN DUIJN, L. et al. The Impact of Culture Medium on Morphokinetics of Cleavage Stage Embryos: an observational study. **Reprod Sci**, v. 29, n. 8, p. 2179-2189, May 2022.
 29. HARPER, J. Preimplantation genetic screening. **J Med Screen**, v. 25, n. 1, p. 1-5, Mar. 2018.
 30. SCHENK, M. et al. Impact of polar body biopsy on embryo morphokinetics—back to the roots in preimplantation genetic testing? **J Assist Reprod Genet**, v. 35, n. 8, p. 1521-1528, May 2018.
 31. VERPOEST, W. et al. Preimplantation genetic testing for aneuploidy by microarray analysis of polar bodies in advanced maternal age: a randomized clinical trial. **Hum Reprod**, v. 33, n. 9, p. 1767-1776, Sep. 2018.
 32. LAMMERS, J. et al. Modification of late human embryo development after blastomere removal on day 3 for preimplantation genetic testing. **Syst Biol Reprod Med**, v. 67, n. 2, p. 121-126, Nov. 2020.
 33. FRAGOULI, E.; WELLS, D. Current status and future prospects of noninvasive preimplantation genetic testing for aneuploidy. **Fertil Steril**, v. 110, n. 3, p. 408-409, Ago. 2018.
 34. HE, H. et al. Neonatal outcomes of live births after blastocyst biopsy in preimplantation genetic testing cycles: a follow-up of 1,721 children. **Fertil Steril**, v. 112, n. 1, p. 82-88, Jul. 2019.
 35. VOLOZONOKA, L.; MISKOVA, A.; GAILITE, L. Whole Genome Amplification in Preimplantation Genetic Testing in the Era of Massively Parallel Sequencing. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 9, p. 4819-4843, Abr. 2022.

36. WANG, X. et al. Recent advances and application of whole genome amplification in molecular diagnosis and medicine. **Medcomm**, v. 3, n. 1, p. 1-16, Fev. 2022.
37. JÄGER, R. New Perspectives for Whole Genome Amplification in Forensic STR Analysis. **Int J Mol Sci**, v. 23, n. 13, p. 7090-7105, Jun. 2022.
38. FU, Y. et al. Preimplantation Genetic Testing for Monogenic Disease of Spinal Muscular Atrophy by Multiple Displacement Amplification: 11 unaffected livebirths. **Int J Med Sci**, v. 16, n. 9, p. 1313-1319, 2019.
39. CARVALHO, F. et al. ESHRE PGT Consortium good practice recommendations for the detection of monogenic disorders. **Hum Reprod Open**, v. 2020, n. 3, p. 1-18, May 2020.
40. GRIFFIN, D.; OGUR, C. Chromosomal analysis in IVF: just how useful is it?. **Reproduction**, v. 156, n. 1, p. 29-50, Jul. 2018.
41. SHI, W. et al. Different Strategies of Preimplantation Genetic Testing for Aneuploidies in Women of Advanced Maternal Age: a systematic review and meta-analysis. **J Clin Med**, v. 10, n. 17, p. 3895-3907, Ago. 2021.
42. PIYAMONGKOL, W. Pre-implantation Genetic Testing for Aneuploidy (PGT-A). **Thai J Obstet Gynaecol**, v. 28, n. 3, p. 130-135, Jul. 2020.
43. KOWALCZYK, K. et al. Application of array comparative genomic hybridization (aCGH) for identification of chromosomal aberrations in the recurrent pregnancy loss. **J Assist Reprod Genet**, v. 39, n. 2, p. 357-367, Jan. 2022.
44. OU, Z. et al. High concordance between next-generation sequencing and single-nucleotide polymorphism array in preimplantation genetic testing for aneuploidy. **Clin. Exp. Obstet. Gynecol**, v. 49, n. 1, p. 1-7, Jan. 2022.
45. NIU, W. et al. Improved clinical outcomes of preimplantation genetic testing for aneuploidy using MALBAC-NGS compared with MDA-SNP array. **BMC Pregnancy Childbirth**, v. 20, n. 1, p. 388-397, Jul. 2020.
46. FRIEDENTHAL, J. et al. Next generation sequencing for preimplantation genetic screening improves pregnancy outcomes compared with array comparative genomic hybridization in single thawed euploid embryo transfer cycles. **Fertil Steril**, v. 109, n. 4, p. 627-632, Apr. 2018.
47. CHEN, D. et al. The inconsistency between two major aneuploidy-screening platforms—single-nucleotide polymorphism array and next-generation sequencing—in the detection of embryo mosaicism. **BMC Genomics**, v. 23, n. 1, p. 62-75, Jan. 2022.
48. DU, R. et al. A review of pre-implantation genetic testing technologies and applications. **RDM**, v. 7, n. 1, p. 20-31, Mar. 2023.
49. VOLOZONOKA, L. et al. Performance comparison of two whole genome amplification techniques in frame of multifactor preimplantation genetic testing. **J Assist Reprod Genet**, v. 35, n. 8, p. 1457-1472, Abr. 2018.
50. COLL, L. et al. Transition from blastomere to trophectoderm biopsy: comparing two preimplantation genetic testing for aneuploidies strategies. **Zygote**, v. 26, n. 3, p. 191-198, May 2018.
51. DE RYCKE, M. et al. PREIMPLANTATION GENETIC TESTING: clinical experience of preimplantation genetic testing. **Reproduction**, v. 160, n. 5, p. 45-58, nov. 2020.
52. CARIATI, F; D'ARGENIO, V; TOMAIUOLO, R. Innovative technologies for diagnosis and screening of genetic diseases in antenatal age. **J Lab Precis Med**, v. 5, n.6 p. 1-10, Jan. 2020.

53. MORGAN, T. K. et al. Determinant of Prenatal Diagnostic Testing among Women with Increased Risk of Fetal Aneuploidy and Genetic Disorders. **Am J Perinatol**, v. 41, n. 04, p. 470-477, Dec. 2021.
54. MADERA, I. V. **Reproducción humana e infertilidad**. Quito: Creativa, 2002. 475 p.