

CENTRO UNIVERSITÁRIO SÃO CAMILO

Curso de Biomedicina

Sophia Costa Araújo

**TESTE GENÉTICO PRÉ-IMPLANTACIONAL PARA ANEUPLOIDIAS
(PGT-A) E SUA UTILIZAÇÃO NA REPRODUÇÃO ASSISTIDA**

São Paulo

2019

Sophia Costa Araújo

**TESTE GENÉTICO PRÉ-IMPLANTACIONAL PARA ANEUPLOIDIAS
(PGT-A) E SUA UTILIZAÇÃO NA REPRODUÇÃO ASSISTIDA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Curso de Biomedicina do Centro Universitário São Camilo, orientado pelo Prof. Ms. Rodrigo Alessandro Riemma Vela, como requisito parcial para obtenção do título em Bacharel em Biomedicina.

São Paulo

2019

Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Padre Inocente Radrizzani

Araujo, Sophia Costa

Teste genético pré-implantacional para aneuploidias (PGT-A) e sua utilização na reprodução assistida / Sophia Costa Araujo. -- São Paulo: Centro Universitário São Camilo, 2019.

57 p.

Orientação de Rodrigo Alessandro Riemma Vela.

Trabalho de Conclusão de Curso de Biomedicina (Graduação), Centro Universitário São Camilo, 2019.

1. Aneuploidia 2. Diagnóstico pré-implantação 3. Direitos sexuais e reprodutivos 4. Fertilização in vitro 5. Testes genéticos I. Vela, Rodrigo Alessandro Riemma II. Centro Universitário São Camilo III. Título

CDD: 573.21

Sophia Costa Araújo

**TESTE GENÉTICO PRÉ-IMPLANTACIONAL PARA ANEUPLOIDIAS
(PGT-A) E SUA UTILIZAÇÃO NA REPRODUÇÃO ASSISTIDA**

Professor Orientador Rodrigo Vela

Professor Examinador Sandro Soares de Almeida

São Paulo

2019

Dedico esse trabalho à minha mãe Denise e meu padrasto Orlando, que sempre me apoiaram em toda a minha trajetória pessoal e profissional.

Aos meus antigos companheiros de trabalho da Igenomix e os atuais colegas de trabalho do Instituto Ideia Fértil de Saúde Reprodutiva.

Às minhas amigas da faculdade, Amanda, Ana, Nadine, Luiza, Aline e Viviane que sempre me deram forças para continuar.

Ao meu namorado, Guilherme, que sempre me incentivou em todos os meus passos.

*“Só é digno do pódio quem usa as derrotas para alcançá-lo.
Só é digno da sabedoria quem usa as lágrimas para irrigá-la.
Os frágeis usam a força; os fortes, a inteligência.
Seja um sonhador, mas una seus sonhos com disciplina,
Pois sonhos sem disciplina produzem pessoas frustradas.
Seja um debatedor de ideias. Lute pelo que você ama.”
Augusto Cury*

RESUMO

O teste genético pré-implantacional para aneuploidias surgiu como uma ferramenta necessária para acompanhar as mudanças que ocorreram nos últimos anos na reprodução assistida. Uma dessas mudanças foi que, com o avanço da sociedade, que permitiu que as mulheres trabalhassem e vivessem suas vidas de forma mais independente, as mulheres começaram a ter seus filhos em uma idade mais avançada. Essa mudança acarretou uma maior procura de mulheres com idade avançada por centros de reprodução assistida. Porém, é fato de que mulheres com idade avançada tem a maior probabilidade de formação de embriões aneuploides. Com isso, crescem as probabilidades também de abortos, falhas de implantação e nascimento de bebês com alterações cromossômicas. O teste genético pré-implantacional é capaz de analisar alterações cromossômicas nos 24 cromossomos, selecionando apenas os embriões viáveis e geneticamente saudáveis para transferência, fazendo com que diminua taxa de abortos e diminua a quantidade de ciclos de fertilização *in vitro* que a paciente precisa realizar para conseguir uma gravidez segura. Essa análise pode ser realizada em oócitos, zigotos (fase de fertilização) ou embriões cultivados *in vitro* em ciclos de Reprodução Assistida (em estágio de clivagem ou blastocisto), antes que os embriões sejam transferidos para o útero materno. As principais indicações da técnica são: casais com histórico familiar de alterações cromossômicas, idade materna avançada, fator masculino grave, perda gestacional recorrente e falhas repetidas de fertilização *in vitro*. Esse trabalho tem como objetivo associar o PGT-A com o aumento nas taxas de implantação nas fertilizações *in vitro*, assim como abordar as principais causas de aborto, e discutir as técnicas de biópsia e de biologia molecular realizadas. Foi realizado um levantamento bibliográfico entre os anos de 1976 e 2019, onde a partir dele pode-se concluir que a técnica é uma ferramenta importante no auxílio dos procedimentos de reprodução assistida, aumentando a probabilidade do sucesso desses procedimentos e proporcionando chances melhores de uma gestação saudável para a paciente.

Palavras-chave: Aneuploidia. Fertilização *in vitro*. Reprodução humana. Diagnóstico genético pré-implantacional. Teste genético. Sequenciamento de Nova Geração (NGS).

ABSTRACT

The preimplantation genetic testing for aneuploidies has surged as a necessary tool in order to follow the latest advances in assisted reproduction. One of these advances was that as society developed, it allowed women to work and live more independently, so they started motherhood at later age. This change increased the later-aged women search in assisted reproduction centers. In the other hand, it is a fact that later-aged women are more likely to have aneuploid embryos. With that, also increases the abortion probability, implantation failures and birth of genetically-altered babies. The preimplantation genetic testing is able to analyse the chromosomal alterations in all 24 chromosomes, selecting only the viable embryos and genetically healthy to transfer, making both the abortion rate and the number of *in vitro* fertilization cycles needed to get a safe pregnancy decrease. This analysis can be made in oocytes, zygotes (fertilization fase) or in-vitro cultivated embryos in assisted reproduction cycles (either cleavage or blastocyst stage), before the embryos are transferred to the maternal uterus. The main indications for this technique are: couples with familiar historical of chromosomal alterations, maternal later age, severe male factor, recurrent miscarriages and repeated in-vitro fertilization failure. This assignment has the purpose to associate PGT-a with the increase of in-vitro fertilization implantation rate, and discuss the biopsy and molecular biology techniques realized. A bibliographical survey between the years of 1976 and 2019 was carried out, and from it can be concluded that this technique is an important tool to assist assisted reproduction procedures, increasing the success probability of them and guaranteeing greater chances of a healthy pregnancy to the patient.

Keywords: Aneuploidy. In-vitro fertilization. Human reproduction. Preimplantation genetic diagnosis. Genetic test. New Generation Sequencing (NGS).

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Número de folículos em comparação com o avanço da idade materna.....	20
Figura 2 - Perda da qualidade dos fusos meióticos de acordo com o avanço da idade materna.....	22
Figura 3 - Representação de um oócito maduro e suas principais estruturas.....	25
Figura 4 - Demonstração da captação de um espermatozoide utilizando uma micropipeta injetora e técnica de Injeção intracitoplasmática de espermatozoide em um oócito maduro.....	27
Figura 5 - Desenvolvimento do embrião desde o dia da captação oocitária até o sexto dia de desenvolvimento embrionário.....	29
Figura 6 - Blastocisto com massa celular interna (MCI) e trofotoderma (TRF) devidamente identificados.....	30
Figura 7 - Representação dos três tipos de biópsias mais realizados.....	34
Figura 8 - Comparação entre as taxas de implantação sustentada após biópsia em estágio de clivagem e em estágio de blastocisto.....	35
Figura 9 - Técnica de FISH aplicada ao Teste Genético Pré-implantacional para Aneuploidias.....	37
Figura 10 - Representação de um laudo de PGT-A nas plataformas de CGH-array e NGS. Observa-se o maior nível de detalhes captados pelo NGS.....	39
Figura 11 - Comparativo de porcentagem de casos de PGT-A com ao menos um embrião euplóide de acordo com o avanço da idade materna.....	41
Figura 12 - Porcentagem de blastocistos aneuplóides de acordo com o aumento da idade materna.....	41
Figura 13 - Porcentagem de gestação em curso com transferência de um único blastocisto após fertilização <i>in vitro</i> associadas ou não com PGT-A.....	42
Figura 14 - Comparação do tempo levado para chegar a uma gravidez (em semanas) utilizando apenas a FIV e quando associado a FIV com PGT-A.....	44

Figura 15 - Diferentes tipos de mosaicismo e possibilidades de resultados pós-biópsia.....**45**

LISTA DE ABREVIATURAS

- aCGH** – Hibridação genômica comparativa
- ALICE** – Análise de endometrite crônica infecciosa
- CCO** – Complexo cumulus oophorus
- CP** – Corpúsculo polar
- D1** – Primeiro dia de desenvolvimento embrionário
- D2** – Segundo dia de desenvolvimento embrionário
- D3** – Terceiro dia de desenvolvimento embrionário
- D4** – Quarto dia de desenvolvimento embrionário
- D5** – Quinto dia de desenvolvimento embrionário
- D6** – Sexto dia de desenvolvimento embrionário
- D7** – Sétimo dia de desenvolvimento embrionário
- DNA** – Ácido desoxirribonucléico
- EMMA** – Análise metagenômica do microbioma endometrial
- ERA** – Análise da receptividade endometrial
- FISH** – Hibridização Fluorescente *in situ*
- FIV** – Fertilização *in vitro*
- HLA** – Antígeno leucocitário humano
- IA** – Inseminação artificial
- ICSI** – Injeção intracitoplasmática de espermatozoide
- IU** – Inseminação intrauterina
- IMA** – Idade materna avançada
- ISCA** – Infertilidade sem causa aparente
- MCI/IC** – Massa celular interna

MDNA – Ácido desoxirribonucleico mitocondrial

MESA – Aspiração microcirúrgica de espermatozoides do epidídimo

MI – Metáfase I

MII – Metáfase II

NGS – Sequenciamento de nova geração

NI-PGTA – Teste genético pré-implantacional para aneuploidias não invasivo

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação em cadeia da polimerase

PESA – Aspiração percutânea de espermatozoides do epidídimo

PGD – Diagnóstico genético pré-implantacional

PGS – Screening genético pré-implantacional

PGTA – Teste genético pré-implantacional para aneuploidias

PGTM – Teste genético pré-implantacional para doenças monogênicas

PGTSR – Teste genético pré-implantacional para translocações

PN – Pronúcleo

PZD - Dissecção parcial da zona pelúcida

QPCR – Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RA – Reprodução assistida

SNP ARRAY – Polimorfismos de nucleotídeo único

SOP – Síndrome do ovário policístico

TE/TRF – Trofotoderma

TESA – Aspiração Percutânea de espermatozóides do testículo

TESE – Extração de espermatozóides do testículo

VG – Vesícula germinativa

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 OBJETIVOS.....	17
3 METODOLOGIA.....	18
4 DESENVOLVIMENTO	19
4.1 Infertilidade feminina, masculina e conjugal.....	19
4.2 Aneuploidia e idade materna	21
4.3 Técnicas de reprodução assistida.....	23
4.4 Biópsia embrionária.....	32
4.5 Teste Genético Pré-Implantacional para Aneuploidias.....	36
4.5.1 Histórico.....	36
4.5.2 Indicações, resultados e perspectivas futuras.....	39
4.6 Mosaicismo.....	44
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	48
REFERÊNCIAS.....	49

1 INTRODUÇÃO

A reprodução assistida se faz muito presente na medicina atual com técnicas que permitem que casais inférteis possam ter seus filhos. A demanda da medicina reprodutiva aumentou nos últimos anos, pois uma das principais causas da diminuição da taxa de sucesso gestacional é a idade materna. Dados já comprovam que as mulheres estão deixando para ter seus filhos cada vez mais em uma idade avançada, preferindo trabalhar e se estabilizar financeiramente antes de construir uma família. Com isso, quando os pais decidem ter seus filhos mais tardiamente, há uma maior necessidade de um acompanhamento por uma clínica de reprodução humana (FÉLIS; ALMEIDA, 2016).

O acompanhamento por especialistas em casais com idade mais avançada se deve ao fato, principalmente, de que em mulheres com idade mais avançada a taxa de aborto aumenta em até três vezes e as taxas de implantação após os tratamentos de reprodução assistida apresentam importante redução. Isso ocorre, pois, mulheres após os 37 anos possuem maiores chances de desenvolver um embrião incompatível com a vida, sendo impossibilitada a continuidade de uma futura gestação (GOMES et al., 2009). Essa incompatibilidade com a vida se deve ao fato de que nessas mulheres há uma maior incidência de embriões que apresentam aneuploidias, ou seja, embriões com alteração no número de cromossomos, e muitas dessas aneuploidias tornam o embrião não viável. Embriões com alguns tipos de aneuploidias são compatíveis com a vida, porém, estes embriões podem desenvolver algumas síndromes, sendo as mais conhecidas: Síndrome de Down, Patau e Edwards. Isso também se deve ao fato de que mulheres acima dos 40 anos apresentam prejuízo na qualidade oocitária e diminuição na reserva ovariana, fazendo com que nessa idade, seja realmente aconselhável um acompanhamento para uma desejável gestação (NAKADONARI; SOARES, 2006).

A fertilização *in vitro* (FIV), conhecida popularmente como “bebê de proveta”, é uma das técnicas mais utilizadas atualmente. Em 25 de julho de 1978, Louise Joy Brown, o primeiro bebê derivado de uma FIV nasceu na Inglaterra após 9 anos de tentativas por seus pais, Lesley e John Brown. Nessa técnica, o processo de fertilização é realizado manualmente em laboratório e, posteriormente, embriões são

transferidos para o útero (POMPEU, 2015). As etapas da FIV consistem em: estimulação da oocitação com medicamentos, aspiração folicular via vaginal, e dependendo do histórico da paciente, pode ser realizada a FIV convencional, onde os espermatozoides são colocados ao redor do oócito, ou a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), onde um único espermatozoide previamente selecionado é introduzido dentro do oócito. Depois desse processo, as próximas etapas são de transferência embrionária e congelamento dos embriões excedentes (AZAMBUJA, 2017).

A FIV é geralmente indicada para casos onde as pacientes possuem a função de uma ou ambas as tubas uterinas prejudicadas, casos de endometriose profunda, idade materna avançada ou infertilidade sem causa aparente. A ICSI é realizada principalmente em casos de fator masculino grave ou baixa concentração de espermatozoides. Além da FIV e da ICSI, que são consideradas técnicas de alta complexidade, outra técnica muito utilizada em clínicas de reprodução humana é a inseminação artificial (IA) ou intrauterina (IIU). A inseminação artificial, no entanto, é considerada uma técnica de baixa complexidade, uma vez que a fertilização dos gametas ocorrerá na própria tuba uterina. Neste procedimento, também é induzida oocitação por meio de medicamentos. Será coletado o sêmen do parceiro, que será previamente processado pelo laboratório e depois transferido para o interior do útero, onde os espermatozoides deverão seguir seu caminho natural. A IA é muito utilizada em casos de pacientes com alterações leves no sêmen e distúrbios na oocitação, dentre eles, o caso mais comum é a síndrome dos ovários policísticos. Ademais, mulheres que querem engravidar por produção independente e casais femininos homoafetivos são grande parte do público que buscam por uma inseminação artificial, utilizando sêmen de um doador (POMPEU, 2015).

Embora os procedimentos em medicina reprodutiva sejam muito utilizados, nem sempre eles obtêm êxito. Sendo às vezes necessário que as pacientes repitam o processo de fertilização *in vitro* e/ou inseminação, causando um significativo estresse psicológico e frustração para o casal, além de altos gastos financeiros, que podem levar à desistência pelo procedimento. Um dos fatores mais recorrentes para a falha na implantação e o não sucesso de uma gestação após a transferência de um embrião em uma clínica de fertilidade, é o conteúdo cromossômico deste embrião. Embriões aneuploides podem falhar o processo de implantação. Na população em

geral, 20% de toda a gestação clínica termina em aborto e cerca de metade destes são cromossomicamente anormais. Para as mulheres que se encontram perto dos quarenta anos, o risco de anomalias cromossômicas se eleva para cerca de 60-80% (GOMES et al., 2009).

Nos últimos anos, o único modo para inferir se o embrião era viável para a transferência, era a avaliação morfológica do mesmo. Porém, estudos mostram que a análise morfológica não reflete com precisão a viabilidade e o potencial de implantação do embrião, mas sim a análise citogenética. Levando em consideração que um dos fatores para obter sucesso na FIV, é a transferência de um embrião viável, testes genéticos foram desenvolvidos para o processo pré-implantacional (PIZZATO, 2017).

A primeira ideia de um teste genético pré-implantacional surgiu em 1967, quando Edwards e Gardner determinaram o sexo de embriões de coelhos através da análise das células de blastocistos. A partir deste momento, foram se aprimorando as técnicas, até que os primeiros ciclos do chamado diagnóstico genético pré-implantacional (PGD) foram descritos em 1989 por Handyside et al. Nesses primeiros ciclos, sequências específicas do cromossomo Y foram amplificadas com a reação em cadeia da polimerase (PCR) para determinar o sexo dos embriões originados de casais com risco de transmissão de doenças ligadas ao X (PIZZATO, 2017).

O então chamado diagnóstico genético pré-implantacional (PGD), sofreu modificações em sua nomenclatura juntamente com as modificações em suas técnicas. Atualmente, o PGD passa a ser tratado por todos como teste genético pré-implantacional (PGT), podendo ser chamado de PGT-A, PGT-M ou PGT-SR de acordo com o tipo de diagnóstico genético em questão. É chamado de PGT-A quando o diagnóstico viabiliza a identificação de aneuploidias no embrião. O PGT-M é indicado para casais onde existem casos de doenças monogênicas hereditárias na família, como a Anemia Falciforme. E por fim, o PGT-SR, que se trata do teste genético pré-implantacional para rearranjos estruturais, especialmente indicado para casais com cariótipo alterado (PIZZATO, 2017).

O PGT-A é utilizado em conjunto com a FIV para detectar aneuploidias antes da transferência, já que estas são observadas com frequência nos embriões e resultam em gestações com complicações, abortos espontâneos e falhas de implantação.

Portanto, o PGT-A diminui o risco de uma gestação geneticamente anormal e diminui as tentativas de FIV para o casal, aumentando as probabilidades de uma FIV bem-sucedida. Já que após o diagnóstico genético do embrião, não são recomendados para transferência aqueles que possuem anormalidades em seu conteúdo genético que podem afetar o desenvolvimento do embrião e a saúde do futuro indivíduo, sendo apenas recomendados para transferência aqueles que tem um maior potencial de implantação. Esse teste é geralmente indicado para pacientes com idade materna avançada (acima de 38 anos), falha de implantação (acima de duas falhas na FIV), aborto recorrente (mais que dois abortos), fator masculino severo (baixa contagem de espermatozoides e DNA espermático fragmentado) e cariótipo alterado (POMPEU, 2015).

2 OBJETIVOS

Objetivo geral

Associar o Teste Genético Pré-Implantacional para aneuploidias (PGT-A) com o aumento das taxas de implantação nas fertilizações *in vitro*.

Objetivos específicos

- Abordar as principais causas de falha de implantação e abortos.
- Discutir as vantagens e limitações da técnica.
- Comparar biópsia de blastômero e blastocisto para análise genética do embrião.
- Apresentar o histórico da técnica de PGT-A, bem como seu avanço e perspectivas futuras.

3 METODOLOGIA

Foi realizada uma revisão narrativa da literatura e um levantamento retrospectivo de dados entre os anos de 1976 e 2019. Utilizando as bibliografias nos idiomas português, inglês e espanhol nas bases de dados: LILACS (Literatura Latino Americana e do Caribe em Ciências Sociais e da Saúde), PubMed, Bireme e ScienceDirect, no portal de revista eletrônica Scielo (Scientific Electronic Library Online) e em livros relacionados com os temas envolvendo Diagnóstico Genético Pré-implantacional nos tratamentos de Fertilização *In Vitro*. Para a pesquisa foram utilizados os seguintes descritores: fertilização *in vitro* (*in vitro* fertilization), reprodução humana (human reproduction), diagnóstico genético pré-implantacional (PGD), screening genético pré-implantacional (PGS), teste genético pré-implantacional (PGT-A), Sequenciamento de Nova Geração (Next-Generation Sequencing).

4 DESENVOLVIMENTO

4.1 Infertilidade feminina, masculina e conjugal

São muitas as possíveis causas para um casal ter dificuldades em chegar à uma gestação, e futuramente um filho. Infertilidade, esterilidade e fatores sociais são algumas dessas causas. É comum confundir infertilidade e esterilidade, porém são conceitos que devem ser definidos e diferenciados corretamente. Esterilidade se entende como a impossibilidade de um indivíduo, ou casal, em gerar um filho. A infertilidade é a dificuldade em chegar à uma gestação (FÉLIS et al., 2016).

A infertilidade pode ser classificada como primária ou secundária. É chamada de primária quando a mulher apresenta um quadro de infertilidade e não houve uma gestação anterior. É considerada secundária a que ocorre quando a mulher teve uma ou mais gestações em seu histórico, mesmo que essa gravidez tenha se encaminhado para um aborto ou sido ectópica. O percentual de infertilidade tem aumentado com o passar dos anos principalmente pelo adiamento da maternidade, o sedentarismo, obesidade, consumo de tabaco e do álcool e a poluição urbana, que são fatores que podem alterar a fertilidade masculina e feminina (FÉLIS et al., 2016).

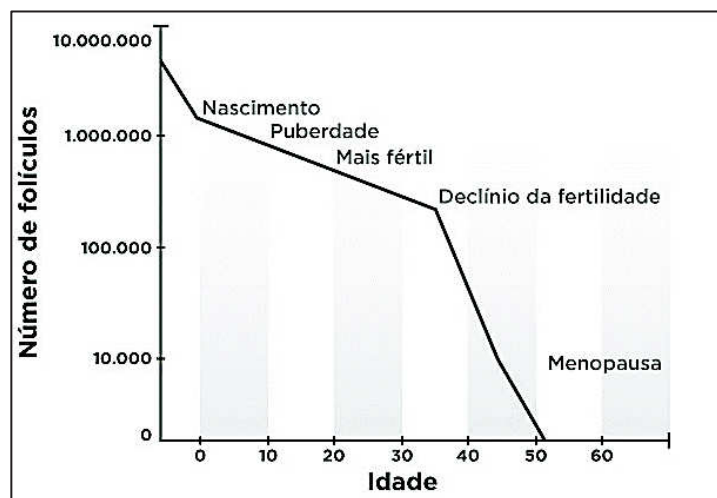
Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), a infertilidade conjugal é definida pela ausência de gravidez após o período de um ano de tentativas com relações sexuais frequentes, sem o uso de meios contraceptivos e em mulheres na idade reprodutiva. As causas da infertilidade se compõem 30% de fatores femininos, 30% de fatores masculinos, 30% de fatores femininos e masculinos em conjunto e 10% causas idiopáticas. Por esse motivo, quando um casal procura o auxílio de uma clínica de Reprodução Humana, a investigação dos motivos pelos quais está havendo uma certa dificuldade reprodutiva, é realizada tanto no homem quanto na mulher (FÉLIS et al., 2016).

Ao chegar na clínica, para dar início ao diagnóstico da infertilidade, são solicitados exames comuns aos casais. Para as mulheres são solicitados exames de disfunção ovariana (história menstrual e dosagens de hormônios), avaliação do útero (ultrassonografia transvaginal), das tubas uterinas (histerossalpingografia) e se sob suspeita, avaliação de endometriose (exames de sangue e de ultrassonografia com preparo intestinal). Para os homens, é solicitado o espermograma, onde serão

avaliados aspectos macroscópios e microscópios do sêmen, como morfologia e motilidade dos espermatozóides. A avaliação do sêmen é obrigatoriamente pedida na primeira consulta, pois a investigação básica é simples, não invasiva e de baixo custo (FARINATI; RIGONI; MÜLLER, 2006).

Ao decorrer dos anos a fertilidade masculina pode ser prejudicada por diferentes fatores, como idade, traumatismos nos testículos, distúrbios na ejaculação ou penetração, baixa contagem ou pouca motilidade de espermatozóides, deficiência nos hormônios folículo estimulante, luteinizante e testosterona, aumento da temperatura escrotal, uso de finasterida, sedentarismo, estresse, álcool, fumo e drogas. Além de doenças como caxumba, varicocele, infecções do trato urogenital, anomalias genéticas, doenças sexualmente transmissíveis, anomalias urogenitais congênitas ou adquiridas e fatores imunológicos. Exposição ocupacional a substâncias químicas também pode afetar a fertilidade, como pesticidas, metais e compostos de cloro (FÉLIS et al., 2016).

Figura 1 – Número de folículos em comparação com o avanço da idade materna.



Fonte: Adaptado de AZAMBUJA, 2017

Além dos fatores que podem afetar a fertilidade no homem, também podem prejudicar a fertilidade feminina o consumo excessivo de tabaco, álcool e drogas. Também podem alterar a fertilidade feminina um histórico de abortos provocados, história de endometriose pessoal ou familiar, anorexia, apendicite supurada, disfunção tubária, fator cervical, insuficiência luteínica, ovários policísticos e distúrbios hormonais. Um dos fatores considerados mais preponderantes no sucesso gestacional é a idade materna, já que a partir dos 35 anos se inicia uma queda

progressiva da fertilidade com a redução da reserva ovariana, diminuição da qualidade dos oócitos, diminuindo a chance de gravidez e aumentando o índice de abortos espontâneos e anomalias cromossômicas (Figura 1) (FÉLIS et al., 2016).

4.2 Aneuploidia e idade materna

Em mulheres acima de 40 anos as aneuploidias são mais frequentes, fazendo com que a idade materna seja um fator importante na fertilidade feminina. As aneuploidias são alterações cromossômicas numéricas e são consideradas recorrentes em embriões humanos, geralmente como consequência de uma falha no mecanismo de divisão celular. Essas alterações são as principais responsáveis pelos abortos espontâneos, falhas na implantação e defeitos congênitos (DEMKO, 2016).

As alterações no número de cromossomos totais do embrião podem ser tanto para ganho, como para perda de material genético. A perda de uma das cópias do cromossomo é chamada de monossomia. Quando se trata de uma monossomia em cromossomos autossomos, elas são em regra geral, incompatíveis com a vida, levando à um aborto ou uma falha de implantação do embrião. A única monossomia conhecida compatível com a vida, é a monossomia em cromossomo sexual X, chamada de Síndrome de Turner. Na Síndrome de Turner as afetadas são as mulheres, sendo caracterizada pela falta do segundo cromossomo sexual, apresentando apenas 45 cromossomos e o cariótipo representado por 45 X. A frequência de Turner é de 1 caso a cada 3.000 nascimentos, isso se deve ao fato de que a maioria dos casos de Turner se encaminham para o aborto (DEMKO, 2016).

Quadro 1 – Quadro comparativo entre idade materna, chances de gravidez, risco de abortamento e risco de alterações cromossômicas.

Idade da mãe	Chances gravidez	Risco de abortamento	Risco de alterações cromossômicas
-30	25%	14%	1/380
+35	15%	19%	1/212
40	10%	40%	1/66
45	menos de 8%	até 60%	1/21

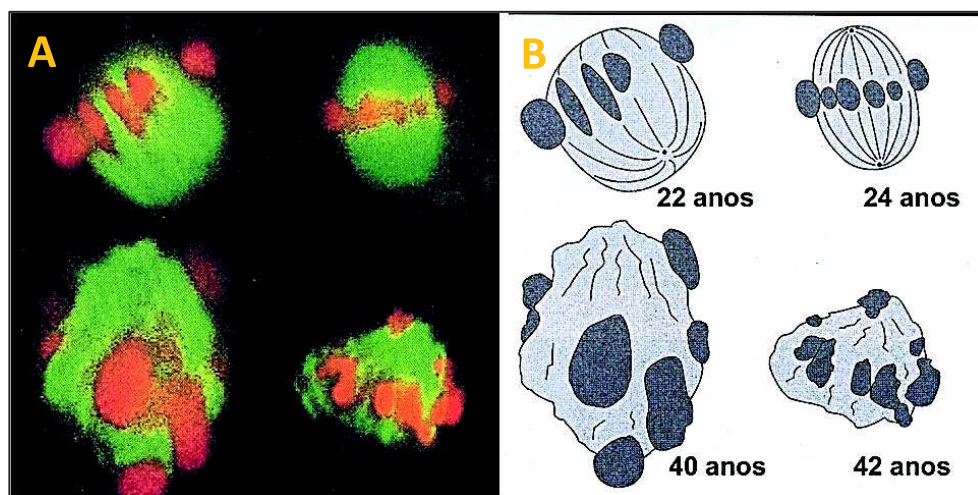
Fonte: Adaptado de RIBOLDI, 2016

A maior parte das aneuploidias são resultantes de erros meióticos durante a geração do oócito. Esses erros se tornam cada vez mais frequentes a medida em que

a idade materna aumenta, e isso se deve ao envelhecimento dos oócitos. Diferentemente do gameta masculino, as mulheres já nascem com todos os oócitos formados. Até a primeira oocitação, essas células permanecem estagnadas na prófase I da meiose, e em cada ciclo menstrual, um ou mais oócitos primários irão retomar a meiose e finalizar o processo de maturação, e esse processo se repetirá até a chegada da menopausa. Sendo assim, se uma mulher tem 35 anos, seus oócitos também têm 35 anos. Já no homem, todo o processo de espermatogênese leva 64 dias e ocorre diversas vezes durante sua vida (NAKADONARI, 2006).

O envelhecimento dos oócitos é prejudicial, já que nos “oócitos velhos” há uma maior deterioração das fibras cromossômicas e dos centrômeros, prejudicando o alinhamento cromossômico (Figura 2). Com o alinhamento cromossômico afetado, a probabilidade de uma divisão errônea dos cromossomos é grande, podendo resultar em embriões com material genético a mais ou a menos, que possuem alto potencial para abortamentos. Somando-se ao fato de que mulheres em idade avançada tem uma maior incapacidade em abortar espontaneamente os embriões alterados, as chances de nascimentos de indivíduos com defeitos congênitos também são maiores (Quadro 1) (GOMES, 2009).

Figura 2 – Perda da qualidade dos fusos meióticos de acordo com o avanço da idade materna.



A- Microscopia de fluorescência de um oócito durante a divisão celular no momento de metáfase. Coradas em verde estão as fibras do fuso e em vermelho o DNA. Imagem demonstra que ao aumentar da idade, as fibras do fuso vão perdendo sua qualidade e a capacidade de alinhar corretamente o material genético.

B- Desenho esquemático da imagem apresentada em A.

Fonte: Adaptado de TONK, 2011

De acordo com a literatura, as trissomias ocorrem em até 3% das gestações clinicamente reconhecidas em mulheres na faixa dos 20 anos, porém em mulheres acima de 40 anos esse número se eleva para cerca de 35%. Lembrando que existem outras anormalidades cromossômicas além de trissomias, em mulheres acima de 38 anos, 85% dos embriões apresentam anormalidades cromossômicas em geral. Como consequência de uma alta significância clínica da relação entre idade materna e aneuploidias, a idade materna é o principal fator de indicação para o teste genético pré-implantacional para aneuploidias (PGT-A), já que essa técnica permite selecionar os embriões cromossomicamente viáveis para transferência, diminuindo a ocorrência dos abortos e defeitos congênitos (NAKADONARI, 2006).

4.3 Técnicas de reprodução assistida

A amostra utilizada na análise de PGT-A são células biopsiadas do embrião. Portanto, para que seja possível a realização do PGT-A, primeiramente é necessário que o casal realize técnicas de reprodução assistida de alta complexidade para a obtenção de um embrião para a análise (POMPEU, 2015).

As técnicas de reprodução assistida são divididas em técnicas de alta complexidade e baixa complexidade. As de baixa complexidade, ou também chamadas de não invasivas, são aquelas em que não é necessária a aspiração de oócitos. E as de alta complexidade, ou invasivas, são as que incluem a aspiração de oócitos. As principais técnicas de baixa complexidade são a relação sexual programada e a inseminação intrauterina (IIU), também chamada de inseminação artificial (IA). Essas técnicas são normalmente indicadas quando os pacientes possuem um caso menos complexo, sendo necessário que o homem possua pelo menos 5 milhões de espermatozoides móveis e que a mulher possua pelo menos uma tuba uterina viável. Esses procedimentos são normalmente escolhidos por possuírem um baixo custo em relação as demais, e menor complexidade. Porém, caso o casal possua indicação para a realização do PGT-A, essas técnicas são inviáveis, pois para a análise genética é necessário o embrião em laboratório para a retirada de células (AZAMBUJA, 2017).

Nos dias atuais, as principais técnicas de alta complexidade são a fertilização *in vitro* convencional (FIV) e a injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI).

A principal indicação para a ICSI é o fator masculino, como baixa concentração de espermatozoides e poucos espermatozoides móveis. Já a FIV, geralmente é indicada em casos de infertilidade sem causa aparente, endometriose e tuba uterina prejudicada. As etapas em comum de FIV e ICSI são a estimulação da oocitação com medicamentos e a aspiração folicular via vaginal. A partir dessa última etapa, dependendo da indicação, deve-se proceder com os procedimentos específicos de cada técnica (ALVARENGA, 2017).

Após o diagnóstico da infertilidade, o tratamento tem início com a estimulação ovariana. A estimulação é feita por meio de medicações hormonais injetáveis que devem ser aplicadas diariamente, durante aproximadamente doze dias. Durante esse período, periodicamente (pelo menos de três em três dias), o ovário da paciente é avaliado por meio do ultrassom para acompanhar o tamanho e o número dos folículos. Quando os folículos atingem cerca de 18-20 milímetros é aplicado outro fármaco fazendo com que os oócitos terminem a sua maturação, e após trinta e seis horas deve ser realizada a punção para a captação dos oócitos (ALVARENGA, 2017).

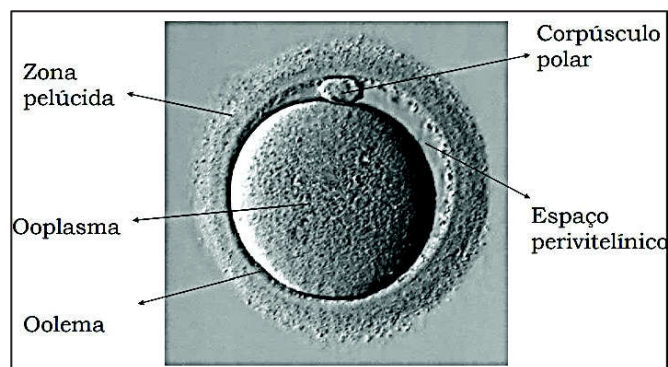
A aspiração dos oócitos é realizada através de uma punção ovariana guiada por um ultrassom, na ponta dele é acoplada uma agulha que realizará a sucção do líquido folicular. O procedimento é realizado em um centro cirúrgico e com sedação. Após a obtenção do líquido folicular, a amostra é passada imediatamente aos embriologistas para a avaliação desse líquido, onde por meio de um microscópio, será analisado o conteúdo dessa amostra e a presença ou não de oócitos (ALVARENGA, 2017).

Após a punção ovariana, os oócitos são classificados de acordo com sua morfologia. Na classificação oocitária são avaliadas principalmente as células do complexo *cumulus oophorus* (CCO) e da *corona radiata* em grau de dispersão, além da presença de núcleo e corpúsculo polar, e tamanho do espaço perivitelínico. Eles podem ser classificados como imaturos (Grau 1), quando possuem as células da *corona* e do CCO bem aderidas ao oócito e possuem uma estrutura nuclear chamada vesícula germinativa (VG). Nesse grau de maturação, o oócito ainda se encontra em prófase da meiose I (MANCEBO, 2017).

No momento em que as células da corona continuam bem aderidas ao oócito, porém as células do CCO já apresentam um grau maior de dispersão, o oócito pode

ser classificado como intermediário (Grau 2). Além disso, nesse grau de maturação, não se observa mais a VG, e ainda não é possível a visualização do corpúsculo polar. Ademais, o espaço perivitelínico é mínimo e a célula se encontra na metáfase da meiose I. O oócito adequado para a fertilização é o oócito maduro (Grau 3), nele as células do CCO estão expandidas, porém as células da *corona* continuam aderidas ao oócito. Já se pode notar a presença do primeiro corpúsculo polar no espaço perivitelínico, e nessa etapa a célula se encontra em metáfase da meiose II. É o estágio ideal para a fertilização, pois liberou no primeiro corpúsculo polar metade do material genético, portanto quando houver a fertilização, terá a quantidade de material genético adequado. Na figura 3 podemos observar o oócito maduro após a denudação, ou seja, sem as células do CCO e da *corona radiata* (MANCEBO, 2017).

Figura 3 – Representação de um oócito maduro e suas principais estruturas.



Fonte: Adaptado de AZAMBUJA, 2017

O oócito pós-maduro (Grau 4) apresentam as células do CCO como uma massa gelatinosa escurecida ao redor do oócito e possui o ooplasma com aspecto granular e escurecido. O atrésico, ou de Grau 5, possui poucas células do CCO ou ausência total, e apresentam morfologia disforme. Ambos os graus de maturação estão além do esperado para um oócito adequado, e não possuem bom prognóstico de fertilização (MANCEBO, 2017).

Após a classificação da maturidade dos oócitos aspirados, aqueles com o grau de maturação adequado (MII, Grau 3) serão guardados em uma placa de Petri em uma incubadora. Caso seja realizada a FIV convencional, o procedimento deverá ser iniciado 2 horas após a captação dos oócitos. Nesse intervalo de tempo, o sêmen deverá ser coletado e processado. Existem diversas formas de obtenção do sêmen, porém a mais comum é a coleta por masturbação. Dependendo do caso e da condição

do paciente, também podem ser realizados os procedimentos de vibroestimulação (caso o paciente seja cadeirante e tenha perdido a sensibilidade, por exemplo), TESE/TESA, MESA e PESA. Os três últimos são procedimentos cirúrgicos onde os espermatozoides serão retirados diretamente do epidídimo ou do testículo por meio de biópsia ou aspiração (MANCEBO, 2017).

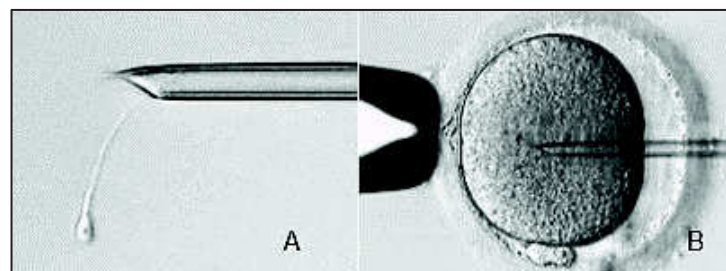
Na fertilização *in vitro* convencional, cada oócito é incubado em meio de cultivo com cerca de 50.000 a 100.000 espermatozoides previamente capacitados no laboratório de andrologia. As células que rodeiam o oócito irão liberar sinais químicos que atrairão os espermatozoides. No momento em que um dos espermatozoides conseguir penetrar na zona pelúcida, o oócito irá reagir bloqueando a entrada de outros espermatozoides, esse evento é chamado de reação cortical. A reação cortical ocorre para evitar uma polispermia, que levaria à um zigoto poliploide, condição normalmente incompatível com a vida (AZAMBUJA, 2017).

A injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) é uma técnica que revolucionou a área da reprodução assistida, pois nela, pacientes com fator masculino grave começaram a ter uma maior chance de sucesso. Isso se deve ao fato de que na ICSI, apenas um espermatozoide é escolhido (Figura 4) após técnicas de seleção realizadas no laboratório de andrologia. Portanto, não é necessário que o sêmen possua uma concentração boa de espermatozoides e nem que os espermatozoides sejam móveis progressivos (características desejadas para uma fecundação natural e para a FIV), já que um único espermatozoide será inserido no oócito com o auxílio de uma agulha injetora (AZAMBUJA, 2017).

A técnica é igualmente satisfatória para pacientes que não possuem espermatozoides no ejaculado, como pacientes azoospermicos e vasectomizados, já que esses espermatozoides podem ser retirados por meio de biópsia e/ou aspiração do testículo ou do epidídimo para a realização do procedimento. Além disso, a ICSI pode ser indicada para pacientes com oligoastenoteratozoospermia (com pouca concentração de espermatozoides, morfologia alterada e motilidade alterada), em casos de pacientes que querem usar um sêmen que foi criopreservado previamente, pacientes com distúrbios ejaculatórios e pacientes com ejaculação retrógrada (GOMES, 2009).

Diferentemente da FIV, para a ICSI é necessária a realização de um procedimento chamado denudação dos oócitos, antes da injeção do espermatozoide. Essa técnica consiste na retirada de células do complexo cumulus-corona, e é realizado a fim de poder classificar corretamente a maturação dos oócitos capturados, já que a visualização do oócito com as células do complexo é imprecisa e apenas injetaremos os oócitos maduros. Além disso, a denudação é necessária para que também seja possível a visualização da posição do corpúsculo polar, pois para a injeção do espermatozoide, o corpúsculo deve ser posicionado as 6 ou 12 horas. Esse posicionamento é necessário, pois alinhado ao corpúsculo polar fica localizado o material genético do oócito, com o posicionamento correto, temos uma maior segurança de que o material genético não será afetado com a injeção do espermatozoide (FÉLIS, 2016).

Figura 4 - A- Demonstração da captação de um espermatozoide utilizando uma micropipeta injetora. B- Técnica de Injeção intracitoplasmática de espermatozoide em um oócito maduro.



Fonte: Adaptado de UNC FERTILITY, 2018.

De 16 a 18 horas após a FIVc ou a ICSI, deve ser checada a fecundação. A fertilização é evidenciada no microscópio pela presença de dois corpúsculos polares (CP) e dois pronúcleos (PN), um masculino e um feminino. O zigoto deve ser esférico e os dois pronúcleos devem ser de tamanhos semelhantes e estarem justapostos. Caso ocorra uma fertilização anormal (por exemplo, com 3 PN ou oócitos degenerados), estes são descartados de imediato. Caso a fertilização tenha sido normal (2 PNs e 2 CPs), os zigotos são levados para incubadora onde serão mantidos em condições que simulam o fisiológico, como temperatura, nutrientes e componentes atmosféricos (Figura 5) (FIGUEIRA, 2017).

As retiradas do embrião da incubadora para checagem e visualização do seu desenvolvimento são realizadas, normalmente, no primeiro dia de desenvolvimento

para a checagem da fertilização (D1), no terceiro dia de desenvolvimento (D3), no quinto (D5) e no sexto dia (D6), e caso haja necessidade, no sétimo dia (D7). Esse fluxo é normalmente realizado em todos os laboratórios, já que a retirada do embrião da incubadora todos os dias para a checagem seria inviável, já que o embrião seria retirado de um ambiente considerado ideal (a incubadora) durante os minutos da checagem. Portanto, esses embriões são retirados para análise em momentos cruciais do seu desenvolvimento e em que devem ser tomadas decisões baseadas no desenvolvimento desse embrião (FIGUEIRA, 2017).

No D3, o ideal é que o embrião esteja com 8 blastômeros de tamanhos parecidos, com um núcleo em cada um, e o mínimo de fragmentação possível. Na rotina, são considerados *top qualities* (embriões de qualidade desejada) embriões com 6 a 10 blastômeros e com classificação A e B de fragmentação. Quando classificado com letra A, entende-se que o embrião possui nenhuma, ou quase nenhuma fragmentação em seus blastômeros; classificação B, é um embrião bom; e classificação C, um embrião regular de acordo com a sua fragmentação. Portanto, na classificação embrionária de D3, o embrião será classificado com um número (quantidade de células) e uma letra (grau de fragmentação), por exemplo, o embrião ideal seria o 8A (FIGUEIRA, 2017).

No terceiro dia de desenvolvimento, condutas diferentes podem ser tomadas. Nos últimos anos, muitos embriões eram transferidos em D3, porém atualmente, o mais realizado é o cultivo prolongado desse embrião para transferência em blastocisto (D5 e D6). Em D3, também pode ser feita a vitrificação desse embrião de acordo com o protocolo médico realizado. A vitrificação consiste em um congelamento ultra-rápido que, ao contrário do congelamento tradicional que era realizado anteriormente, impede a formação de cristais de gelo nas células, promovendo uma maior recuperação da viabilidade dos oócitos e embriões. No D4 é desejável que o embrião esteja em estado de mórula, com cerca de 12 a 32 blastômeros, nessa fase observa-se também maior interação entre as células, o que podemos chamar de compactação. No D4, assim como no D2, os embriões são mantidos na incubadora (FIGUEIRA, 2017).

A partir do quinto dia de desenvolvimento embrionário, se inicia a fase de blastulação, onde há a formação de uma cavidade interna chamada blastocelo e o embrião é chamado de blastocisto. As junções das células estão mais firmes e elas

começam a se diferenciar em massa celular interna e trofocotoderma. A massa celular interna formará o embrião propriamente dito e as células do trofocotoderma formarão a placenta (FIGUEIRA, 2017).

Figura 5 – Desenvolvimento do embrião desde o dia da captação oocitária até o sexto dia de desenvolvimento embrionário. Dia 0: visualização do primeiro corpúsculo polar. D1: visualização dos dois pronúcleos e primeira clivagem, com duas células. D2: Estágio de 4 células. D3: Estágio de 8 células. Dia 4: Início da compactação para formação de blastocisto. D5: Blastocisto expandido. D6: Blastocisto em estágio de extrusão pela zona pelúcida.



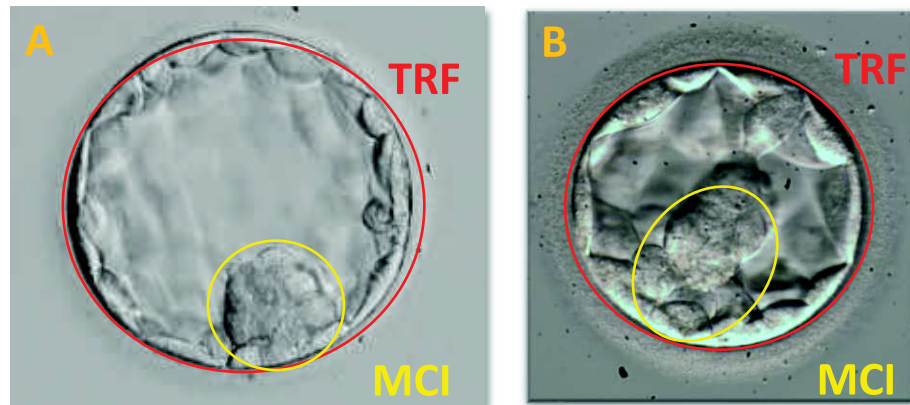
Fonte: Adaptado de TONK, 2011

Na fase de blastocisto já ocorreram diversas clivagens, diferenciações celulares, e ativação do genoma embrionário, portanto, aqueles embriões que conseguiram atingir o estágio de blastocisto, já são estruturas selecionadas naturalmente com potencial maior para implantação. Ademais, é a fase em que naturalmente ocorre o processo de implantação no endométrio, portanto, além de ser o grau embrionário que melhor pode fornecer informações importantes sobre a viabilidade embrionária, é o definido pela maioria o estágio ideal para transferência (FÉLIS, 2016).

Ao possuir mais de um embrião em estágio de blastocisto, a dúvida de qual embrião selecionar para transferência e qual deve possuir um potencial maior de implantação é uma discussão relevante. A maior parte dos laboratórios de reprodução humana utilizam a classificação morfológica do blastocisto como o principal critério de seleção. O sistema mais utilizado para a classificação morfológica é o de Garner, onde os principais parâmetros avaliados são o grau de expansão da blastocelule e

características da massa celular interna e do trofocotoderma (Figura 6) (FIGUEIRA, 2017).

Figura 6 – Blastocistos com massa celular interna (MCI) e trofocotoderma (TRF) devidamente identificados, onde A possui classificação morfológica de Gardner 4AA e B classificação 3AA.



Fonte: Adaptado de AZAMBUJA, 2017

Quadro 2 – Quadro comparativo com a classificação morfológica de blastocistos de acordo com a classificação de Gardner.

CLASSIFICAÇÃO DO BLASTOCISTO <i>Grau de expansão da blastocele</i>	
Grau 1	Blastocisto jovem, blastocele ocupa menos de 50% do volume do embrião
Grau 2	Blastocele ocupa metade ou mais do volume do embrião
Grau 3	Blastocisto completo, blastocele ocupa todo o volume do embrião
Grau 4	Blastocisto expandido, zona pelúcida de espessura fina
Grau 5	Blastocisto com parte do trofoectoderme eclodindo da zona pelúcida
Grau 6	Blastocisto com eclosão completa da zona pelúcida
CLASSIFICAÇÃO DA MASSA CELULAR INTERNA (MCI) <i>Para blastocistos de GRAU 3-6</i>	
Grau A	Muitas células fortemente agrupadas
Grau B	Algumas células dispersas
Grau C	Células escassas
CLASSIFICAÇÃO DO TROFOECTODERMA (TRF) <i>Para blastocistos de GRAU 3-6</i>	
Grau A	Muitas células formando um epitélio coesivo
Grau B	Poucas células formando um frouxo epitélio
Grau C	Células escassas e grandes

Fonte: Adaptado de AZAMBUJA, 2017

A classificação morfológica de blastocisto (D5 e D6), diferentemente da classificação em D3, é dada por um número e duas letras (Quadro 2). O número se refere ao grau de expansão da blastocele, onde o Grau 1 é um blastocisto jovem e pequeno, onde a blastocele ocupa menos de 50% do volume do embrião. Como podemos observar no quadro 2, a numeração vai até o número 6, onde este se refere ao maior grau de expansão, onde o blastocisto está completamente eclodido da zona pelúcida. A primeira letra que segue após o número se refere à massa celular interna (MCI), onde é nomeado A aquele blastocisto que possui as células da MCI fortemente agrupadas, B aquele que possui as células mais dispersas e C o que possui células da MCI escassas e mal delimitadas. A última letra da classificação diz respeito as características das células do trofotoderma (TRF), onde a classificação A se refere a um blastocisto que possui um epitélio coesivo e muitas células, B se refere a poucas células e um epitélio mais frouxo e C, células escassas e com tamanhos diferentes (AZAMBUJA, 2017).

Aqueles embriões de grau 3 a 6 e com classificação A em algum dos dois critérios, são os blastocistos mais desejados, são eles: 3AA, 3AB, 3BA, 4AA, 4AB, 4BA, 5AA, 5AB, 5BA, 6AA, 6AB, 6BA. Atualmente, a classificação morfológica em blastocisto é o principal fator de seleção do melhor embrião para transferência. Porém, muitos estudos provam a baixa correlação entre a qualidade morfológica e o potencial de implantação dos embriões, já que a morfologia não reflete necessariamente a qualidade genética (FANASCA, 2018).

Atualmente a maneira mais fidedigna de avaliar a qualidade genética dos embriões, e conseqüentemente, o potencial de implantação dos mesmos, é o teste genético pré-implantacional para aneuploidias (PGT-A). Porém, é inviável aplica-lo para todos os casos e pacientes como um procedimento padrão do laboratório, já que a avaliação genética ainda possui um custo alto e demanda profissionais muito bem treinados, pois para a análise é necessária a realização de uma biopsia no embrião para a análise das células. O processo de biópsia embrionária se feito de maneira errônea, pode comprometer a viabilidade do embrião. Por esses motivos, no protocolo da maioria dos laboratórios ainda é utilizada a classificação morfológica como maneira de definir a prioridade de transferência dos embriões (FIGUEIRA, 2017).

4.4 Biópsia embrionária

A retirada de células do embrião para a análise genética é um processo extremamente delicado e que passou por diversas mudanças em como e em qual estágio embrionário realizá-la durante os últimos anos. Como dito anteriormente, é necessário realizar uma técnica de reprodução assistida de alta complexidade para a obtenção do embrião em laboratório. Porém, é aconselhado pelos laboratórios de genética que a técnica laboratorial realizada seja a ICSI. Isso se deve ao fato de que, realizando a FIV convencional, por mais que seja pequena, há a chance de contaminação paterna na análise pela presença de espermatozoides aderidos a zona pelúcida ou espermatozoides não descondensados dentro dos blastômeros. Portanto, a análise mais confiável, seria a de um embrião proveniente de uma ICSI (GOMES, 2017).

A biópsia embrionária pode ser realizada em diferentes estágios de maturação do embrião. São elas: biópsia de corpúsculo polar (em D1), biópsia de blastômero (D3) e biópsia de trofotoderma (D5 e D6). Para qualquer uma dessas opções, é necessário realizar o rompimento da zona pelúcida para então, conseguir retirar o material de análise. Existem diferentes métodos para o rompimento da zona pelúcida para biópsia, nos dias de hoje é quase unânime a utilização de tiros de laser, porém, antes do surgimento do laser, muitas técnicas foram realizadas nos laboratórios (GOMES, 2017).

Uma das técnicas realizadas foi a mecânica de rompimento chamada dissecação parcial da zona (PZD). Esse procedimento consiste em utilizar uma micropipeta para perfurar a zona de modo a transfixá-la, realizando dois furos, e posteriormente friccionar a agulha até que se rompa a zona no espaço entre os dois furos realizados. É uma técnica de baixo custo, porém, consome muito tempo e altos riscos de danificar as células do embrião. Outro método é o químico com a utilização de ácido Tyrode localizado que dissolve as glicoproteínas da zona. Esse método também não possui um custo alto, porém também oferece riscos para as células do embrião, já que deve ser utilizada a quantidade exata do ácido para abrir o tamanho correto de abertura e ter cautela para não expor o embrião a excesso de ácido (DEMKO, 2016)

O método mais recente e o mais usado atualmente para a abertura da zona pelúcida é de um feixe de laser infravermelho acoplado ao microscópio e controlado por um computador. O laser tem como vantagem não ser descartável, ter uma boa reprodutibilidade, ser preciso e rápido. O uso do laser é prático e oferece maior controle e facilidade ao profissional, sendo apenas necessária a cautela da distância entre o laser e as células do embrião, mantendo uma distância segura para não causar sequelas devido a alta temperatura causada pelo feixe de laser (GOMES, 2017).

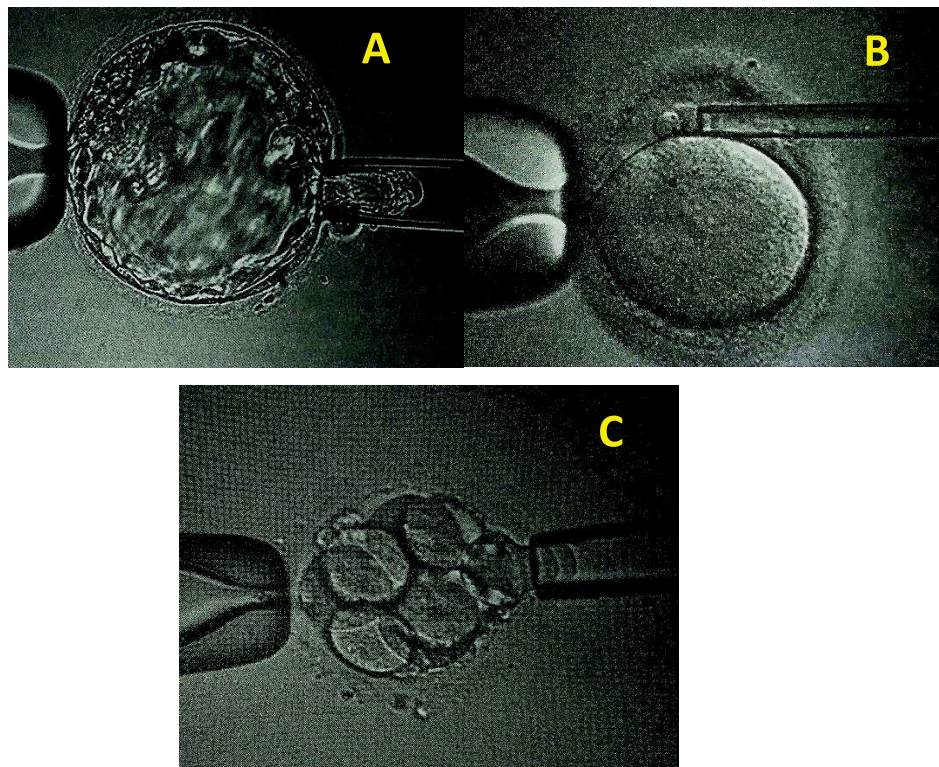
Além das diversas maneiras de realizar a abertura da zona, também foi sendo alterada e discutida ao longo do tempo o estágio mais apropriado do embrião para a realização da biópsia. Uma das técnicas mais antigas de biópsia foi a de corpúsculo polar (em D1) (Figura 7). Essa técnica já é considerada ultrapassada pela maioria, pois possui riscos de falha de amplificação e falso positivo/negativo. Essa imprecisão se deve ao fato de que apenas uma célula está sendo retirada para análise e essa célula ainda irá passar por diversas modificações. Estudos mostram a alta incidência de diagnósticos errados utilizando essa técnica. Além disso, é uma prática que exige a retirada de ambos os corpúsculos polares, portanto, demanda mais tempo e habilidade manual. Essa prática ainda é realizada em países em que não se permite por lei a biópsia de embrião, como na Índia, por exemplo (HARPER, 2010).

Após muitos estudos demonstrarem a imprecisão na biópsia de corpúsculo polar, outros métodos começaram a ser testados. Nos últimos 20 anos, a técnica mais utilizada foi a biópsia de blastômero em terceiro dia de desenvolvimento embrionário. Essa técnica por muito tempo foi considerada a mais adequada para análise genética, pois a partir dela os resultados em comparação com a técnica anterior, melhoraram. Além disso, foi possível investigar compatibilidade de antígeno leucocitário humano (HLA), rearranjos cromossômicos e aneuploidias, ademais, também proporcionou a identificação de contribuições materna e paternas em doenças monogênicas (GOMES, 2017).

Apesar de todas as melhoras com a biópsia de blastômero, alguns aspectos ainda eram insuficientes. No D3, o embrião ainda possui cerca de 6 a 10 células, e apesar de algumas teorias como a do “embrião totipotente” que diz que cada blastômero é capaz de desenvolver um organismo inteiro, estudos sobre a polaridade do embrião tem demonstrado que a retirada de uma célula afeta o desenvolvimento e potencial de implantação do embrião. Esses estudos sugerem que a distribuição de

proteínas e mitocôndrias reguladoras em cada blastômero é desigual e são necessárias para o período pré-implantacional, além disso, cada célula pode estar destinada a formar algo diferente, prejudicando o desenvolvimento desse organismo no futuro (HARDY, 1990).

Figura 7 – Representação dos três tipos de biópsias mais realizados. A- Biópsia de trofotoderma em estágio de blastocisto. B- Biópsia de corpúsculo polar no primeiro dia de desenvolvimento. C- Biópsia de blastômero em estágio de clivagem, no terceiro dia de desenvolvimento.



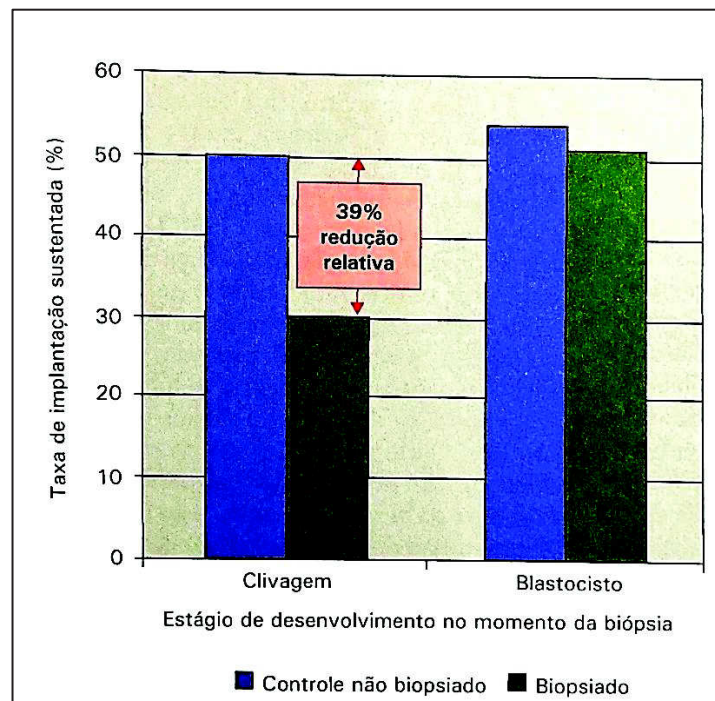
Fonte: Adaptado de GOMES, 2017

A partir da década de 1990, começou a ser utilizada a biópsia de blastocisto. Tal técnica consiste na retirada de células do trofotoderma. Essa técnica se baseia no fundamento de que as células do trofotoderma irão formar a placenta e as células da massa celular interna formarão o embrião propriamente dito. Portanto, retirando apenas algumas células do trofotoderma para análise e mantendo as células da massa celular interna intactas, não serão retiradas células fundamentais para o desenvolvimento e formação do embrião. Outro ponto positivo nessa técnica é que no estágio de blastocisto o embrião possui entre 100 a 120 células, logo acredita-se que a retirada de 5 a 10 células para análise não causariam tanto risco ao desenvolvimento

do embrião, além de fornecer mais células e, portanto, maior quantidade de DNA para análise genética (Figura 8) (GOMES, 2017).

A preferência pelo uso da técnica de biópsia de trofotoderma não foi imediata, para isso, as técnicas de criopreservação embrionária precisaram ser melhoradas, pois devido ao tempo de análise necessária, não era possível a transferência a fresco, sendo necessária a vitrificação desse embrião pós-biópsia. Além disso, as taxas de embriões que chegavam ao estágio de blastocisto eram muito baixas. Portanto, para viabilização e uso dessa técnica, os meios de cultivo prolongado tiveram que ser aprimorados para maior obtenção de embriões em blastocisto. Somando os avanços em fatores como vitrificação e nos meios de cultivo de blastocisto, a biópsia de trofotoderma começou a ser a mais utilizada pelos laboratórios nos últimos anos, apresentando maior precisão e taxas de implantação (GARDNER, 2000)

Figura 8 - Comparação entre as taxas de implantação sustentada após biópsia em estágio de clivagem e em estágio de blastocisto.



Fonte: Adaptado de AZAMBUJA, 2017

Independentemente da técnica de biópsia escolhida para a retirada de células do embrião, a integridade e potencial do mesmo deve ser mantida até a liberação do laudo de análise genética. Para isso, a maioria dos casos nos laboratórios realizam a criopreservação do embrião após a biópsia, e aqueles que forem euploides são

descongelados para então serem transferidos. Favorecendo assim a transferência apenas daqueles embriões que forem cromossomicamente saudáveis. Algumas clínicas também realizam a análise com transferência a fresco, onde o embrião é biopsiado no quinto dia de desenvolvimento e mantido em cultivo, a biópsia é enviada para análise, o laudo é pedido com urgência de até 24 horas, e tendo bons resultados, o embrião é transferido no sexto dia de desenvolvimento. Ambas as técnicas são válidas e não mostram resultados muito divergentes de implantação, porém com a transferência a fresco corre-se o risco de a paciente preparar o endométrio para a transferência acreditando que a mesma será realizada e, posteriormente, o laudo declarar que a paciente não possui embriões viáveis para transferência. Portanto, para também evitar frustrações das pacientes e uso de medicamento de preparo para transferência em vão, a técnica mais utilizada no momento é a de criopreservação pós-biópsia (GARDNER, 2000).

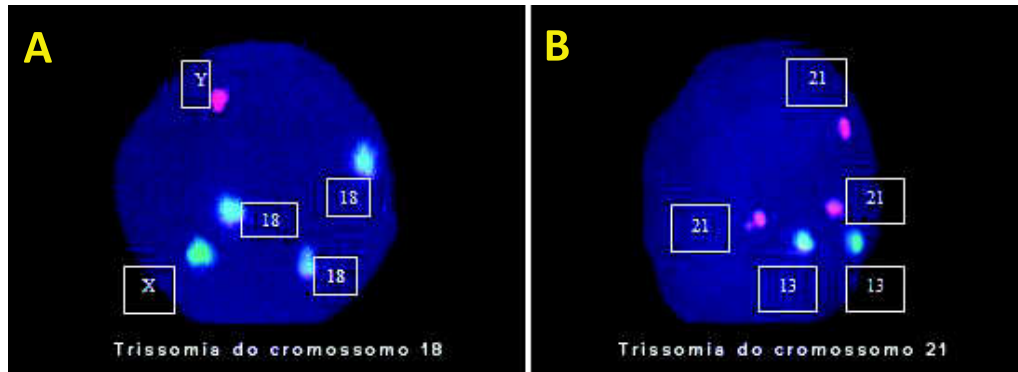
4.5 Teste Genético Pré-Implantacional para Aneuploidias

4.5.1 Histórico

Sabendo que a ideia de uma análise genética pré-implantacional surgiu quando as técnicas de biologia molecular e de reprodução assistida ainda precisavam ser aperfeiçoadas, a maneira com que o PGT-A vem sendo realizado se transformou durante os anos até chegar nos dias atuais (CECCHINO, 2018).

O PGT-A propriamente dito iniciou com a técnica de hibridização fluorescente *in situ*, mais conhecido como FISH, em 1995. Nessa época, a técnica de biópsia mais utilizada era a de blastômero em estado de clivagem, para transferência em blastocisto. A análise era feita com cerca de 1 a 2 blastômeros e não se conhecia muito acerca da possível perda de viabilidade do embrião com a retirada dessas células. Além disso, o laser ainda não era muito utilizado, tendo que se utilizar de maneiras alternativas para abertura da zona pelúcida, e ademais a técnica de FISH permitia avaliar alterações numéricas em apenas 12 cromossomos no máximo (Figura 9) (ALMEIDA, 2013).

Figura 9 – Técnica de FISH aplicada ao Teste Genético Pré-implantacional para Aneuploidias. A- Representação de um resultado revelando trissomia no cromossomo 18, indicativo de Síndrome de Edwards. B- Representação de um resultado revelando trissomia no cromossomo 21, indicativo de Síndrome de Down.



Fonte: Adaptado de TONK, 2011

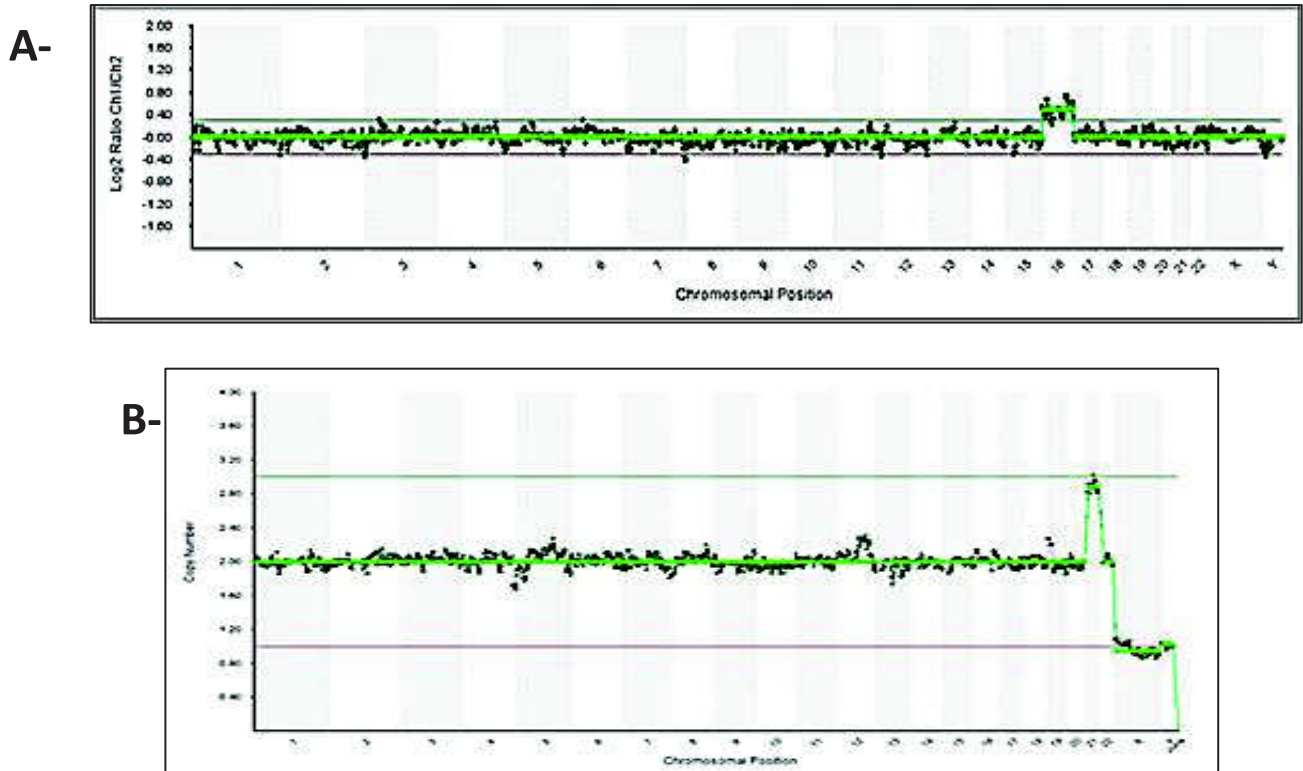
A técnica de FISH se baseia na utilização de marcadores, chamados de sondas. Essas sondas se ligam a regiões específicas dos cromossomos, emitindo fluorescência e indicando a ausência ou presença deles nas células retiradas do embrião. Por exemplo, caso o embrião tenha Síndrome de Edwards, serão identificadas três marcações fluorescentes para o cromossomo 18, e caso sejam identificadas três marcações no cromossomo 21, será indicativo de Síndrome de Down (Figura 9). O FISH foi muito utilizado e ainda é muito utilizado em outras áreas por possuir baixo custo, porém a sua especificidade, abrangência dos cromossomos e resolução é baixa, podendo apresentar muitos erros de diagnóstico. O diagnóstico também está associado a dúvidas quanto ao resultado de confiabilidade devido a problemas como fixação inadequada de blastômeros e falha na hibridação, além disso, o tempo necessário para a confecção da sonda específica é alto (FANASCA, 2018).

Próximo ao ano de 2008, a técnica de hibridização genômica comparativa (aCGH) começou a ser amplamente utilizada para fins de diagnóstico genético pré-implantacional. Essa técnica foi de grande avanço para a análise genética, pois com ela é possível analisar todos os 24 cromossomos. Como seu próprio nome diz, ela se baseia na comparação de uma amostra controle com genoma normal e a amostra teste proveniente da biópsia do embrião. Ademais, ela identifica translocações cromossômicas e anomalias cromossômicas em alta resolução que não seriam

detectadas por FISH. Além de todas as melhoras conquistadas pelo aCGH, ao mesmo tempo era melhorada a técnica de biópsia e sendo mais utilizada a biópsia de trofotoderma, oferecendo assim mais células e, portanto, mais material para a análise genética. Apesar de superar a principal limitação da técnica de FISH, ainda apresentava como principal restrição tempo necessário, de até 72 horas, para a hibridação (ALMEIDA, 2013).

Entre os anos de 2010 e 2012 também foram utilizadas as técnicas de polimorfismo de nucleotídeo único (SNP array) e reação em cadeia polimerase em tempo real quantitativa (qPCR), que foram aperfeiçoando e adequando o diagnóstico das aneuploidias. Até que próximo ao ano de 2013 a técnica de sequenciamento de nova geração (NGS) começou a ser a mais utilizada para realização do PGT-A, além de ser a mais recente empregada é também considerada mais completa e precisa. Apesar de não realizar o sequenciamento de todo o genoma, a técnica realiza o sequenciamento de segmentos estratégicos do DNA afim de detecção mais segura das alterações cromossômicas (MARTINHAGO, 2017).

Figura 10 – Representação de um laudo de PGT-A nas plataformas de CGH-array e NGS. Observa-se o maior nível de detalhes captados pelo NGS. A- Laudo de CGH-array indicando trissomia do cromossomo 16. B- Laudo de NGS indicando trissomia do cromossomo 21.



Fonte: Adaptado de FERTILITY, 2017

Além da acurácia do NGS, essa plataforma é capaz de identificar com maior precisão a presença de mosaïcismo nas células embrionárias. A técnica possui a sensibilidade de 99,98% e especificidade de 99,88%, além de possuir a capacidade de analisar até 96 amostras simultaneamente. A maior especificidade da técnica se deve ao fato de que diferentemente do aCGH que possuía um range de detecção de 14Mb (Figura 10), o NGS consegue detectar ganho e perda de material genético em um range de 3 a 5Mb, oferecendo maior precisão aos resultados (CUZZI, 2017).

4.5.2 Indicações, resultados e perspectivas futuras

O objetivo específico da técnica de PGT-A é a identificação de aneuploidias. Essa identificação é extremamente importante para grupos de risco que desejam engravidar. As aneuploidias estão presentes em mais de 60% de todos os embriões produzidos em laboratório e em mais de 50% dos abortos de primeiro trimestre. Isso se deve ao fato de que o desbalanço cromossômico é um dos principais entre os

múltiplos fatores que podem influenciar negativamente o desenvolvimento e o potencial de implantação de um embrião, seja ele *in vitro* ou *in vivo*. A maior parte dos embriões com aneuploidias são incompatíveis com a vida, todas as monossomias autossômicas e a maioria das trissomias e polissomias (GLEICHER, 2017).

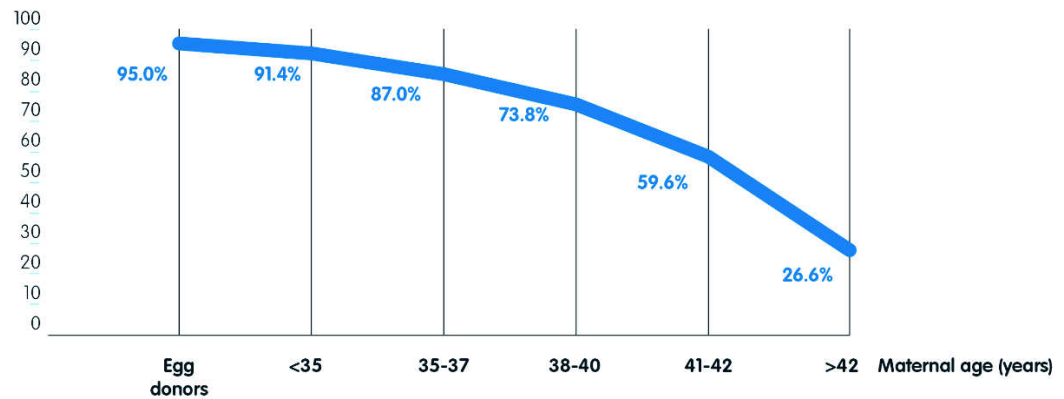
Relatos demonstram que casais inférteis e casais com dificuldade reprodutiva produzem maior proporção de embriões aneuploides, que tem altíssima probabilidade de não implantarem, resultar em um aborto ou em um nascimento de um bebê com malformação. Esses grupos de riscos são em sua maioria: mulheres acima de 37 anos, casais com algum dos membros com cariótipo alterado, falha de implantação em FIVs anteriores (acima de duas), aborto recorrente (acima de dois) e fator masculino severo (baixa contagem de espermatozoides, idade avançada e DNA espermático fragmentado). Esses grupos quando possuem dificuldade reprodutiva ou desejam passar por uma fertilização *in vitro* a fim de assegurar a vinda de um recém-nascido geneticamente saudável, passam por aconselhamento genético e são direcionados a realização do PGT-A (MARTINHAGO, 2017).

Existem outros fatores além dos cromossômicos que contribuem para falhas de implantação ou perdas gestacionais, e que não tem relação com a genética em si, e sim a fatores como: mitocondriais (mDNA), estresse oxidativo, dieta, microbioma endometrial, anatômicos, endometriose/varicocele, ocupacionais e/ou ambientais, imunológicos, obesidade, sedentarismo, alterações hormonais, idade, doenças infecciosas e sexualmente transmissíveis, do resultado de um procedimento cirúrgico ou pessoas submetidas a quimioterapia e radioterapia ou estar associada a anomalias dos gametas feminino e masculino. Esses fatores também são muito relevantes para o processo da infertilidade e devem ser analisados como um todo. Devem também ser preferencialmente diagnosticados antes do tratamento de alta complexidade (MARTINHAGO, 2017).

A idade materna é o principal fator de indicação para a realização do PGT-A. Soma-se também ao fato de que mulheres com idade avançada são cada vez o maior público entre as pacientes que desejam realizar um tratamento de reprodução assistida. O avanço da sociedade e a modernidade permitiram que a mulher também possa trabalhar e estudar, fazendo com que a prioridade na idade mais fértil de algumas mulheres não seja engravidar e ter filhos. Fazendo com que grande parte das mulheres comecem a pensar em ter filhos após os 30 anos, onde sua reserva

ovariana e qualidade dos oócitos já começou a cair (Figuras 11 e 12) (PELLESTOR, 2005).

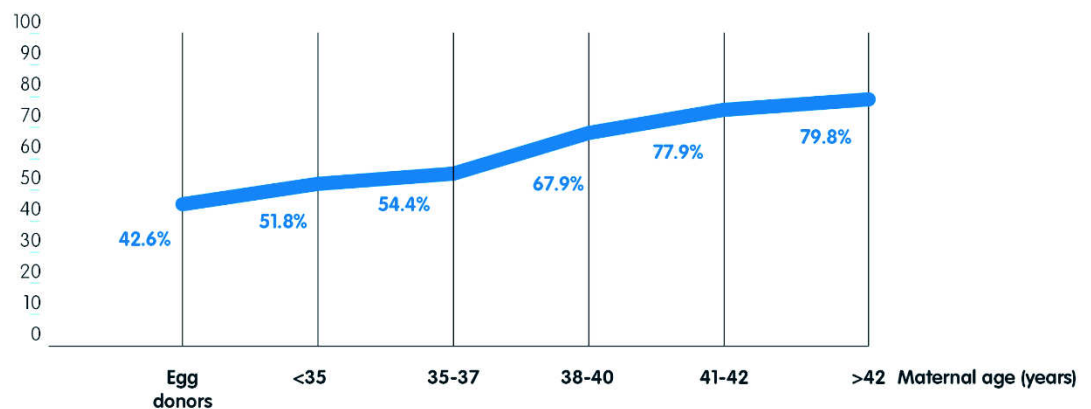
Figura 11 - Comparativo de porcentagem de casos de PGT-A com ao menos um embrião euplóide de acordo com o avanço da idade materna.



*Internal IGENOMIX data 2016 (N= 60,000 embryos)

Fonte: Adaptado de RIBOLDI, 2016

Figura 12 - Porcentagem de blastocistos aneuplóides de acordo com o aumento da idade materna.



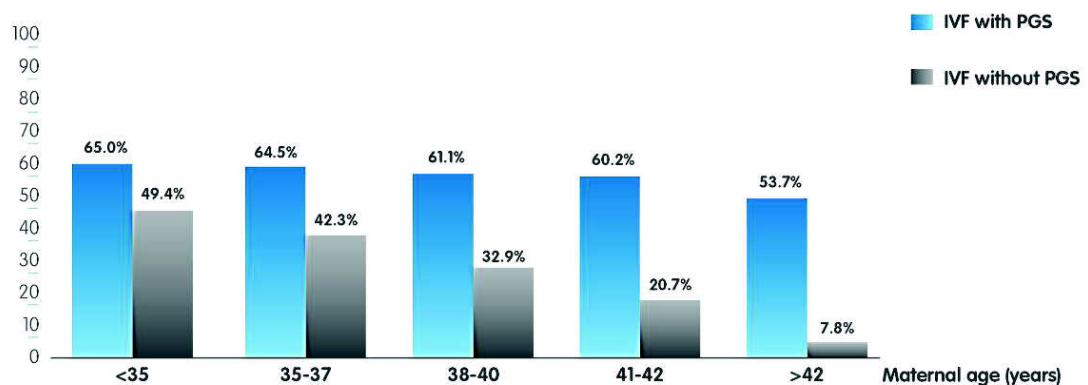
*Internal IGENOMIX data 2016 (N= 60,000 embryos)

Fonte: Adaptado de RIBOLDI, 2016

É indiscutível a importância da realização do teste para os grupos de risco. A técnica proporcionou uma grande diminuição no tempo e quantidade de ciclos de fertilização *in vitro* que as pacientes precisam realizar até conseguirem engravidar.

Isso se deve ao fato, de que selecionando apenas os embriões euploides e viáveis cromossomicamente, a probabilidade de sucesso de um ciclo de fertilização em mulheres acima de 40 anos aumenta em quase 50% (Figura 13). Para aumentar ainda mais a probabilidade de sucesso da FIV associada ao PGT-A, existem outros testes que também podem ser associados e que se referem aos outros fatores que podem causar uma falha na implantação (PRAJIANTE, 2013).

Figura 13 - Porcentagem de gestação em curso com transferência de um único blastocisto após fertilização *in vitro* associadas ou não com PGT-A.



*Internal IGENOMIX data 2016 based on outcomes and 2015 SART data

Fonte: Adaptado de RIBOLDI, 2016

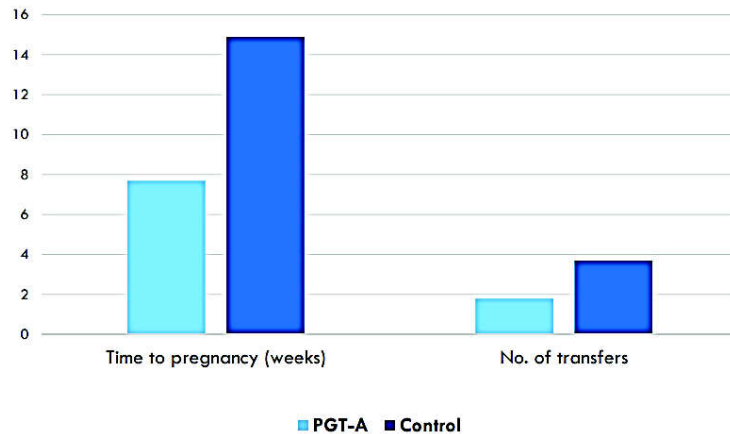
O mitoscore é um teste que mede a atividade mitocondrial do embrião, com base no fundamento de que quanto maior a atividade mitocondrial, menor potencial de implantação ele tem. O embrião com menor valor de mitoscore, é um embrião que não precisou de tanta energia para se desenvolver e teve mais energia poupada. Isso é benéfico, já que o processo que demanda mais gasto energético para o embrião é a implantação. Existem centros de genética que associam o PGT-A ao mitoscore, ajudando o médico e a paciente a escolherem o melhor embrião a ser transferido. Já que na presença de mais de um embrião euploide, a atividade mitocondrial é uma boa maneira de selecionar entre os euploides qual tem a maior probabilidade de implantação (ZEGERS-HOCHSCHILD, 2017).

O fator endometrial é o segundo mais importante, após a viabilidade cromossômica do embrião. Pois, não seria de muito valor transferir um embrião geneticamente saudável em um ambiente em que ele não conseguiria implantar. Para

isso, outros três testes que são muito associados ao PGT-A a fim de aumentar a probabilidade de implantação, são os testes que avaliam o ambiente endometrial. A análise de receptividade endometrial (ERA), analisa o momento exato em que a paciente tem a sua janela de implantação adequada. O teste avalia através do NGS os genes relacionados a receptividade endometrial e mostra em seu resultado quais seriam os melhores dias para realizar a transferência de acordo com a expressão desses genes (ZEGERS-HOCHSCHILD, 2017).

Além da receptividade endometrial, outros fatores como a microbiota uterina também podem influenciar a implantação de um embrião. A análise de metagenômica do microbioma endometrial (EMMA) e a análise de endometrite crônica infecciosa (ALICE) são testes que avaliam a microbiota uterina e tem a capacidade de identificar se o problema de falhas repetidas de implantação está sendo causado pelas bactérias presentes na cavidade uterina. O EMMA se baseia no princípio de que a presença de uma concentração adequada de lactobacilos no útero tem a capacidade de influenciar no prognóstico reprodutivo, sendo necessária uma maior concentração de lactobacilos e uma menor concentração de bactérias disbióticas. O ALICE permite a identificação de patógenos endometriais cultiváveis e não cultiváveis relacionados com a endometrite crônica, e afirma a sua importância no fato de que mais de 30% das mulheres inférteis são afetadas com essa condição. Quando identificadas essas alterações, o médico conseguirá tratar adequadamente e especificamente seu problema. Esses testes associados ao PGT-A, podem aumentar em mais de 60% a probabilidade de uma fertilização *in vitro* ter sucesso. Diminuindo o tempo, que na idade materna avançada é precioso, de alcançar uma gravidez saudável (Figura 14) (ZEGERS-HOCHSCHILD, 2017).

Figura 14 - Comparação do tempo levado para chegar a uma gravidez (em semanas) utilizando apenas a FIV e quando associado a FIV com PGT-A. Demonstra também a redução do número de transferências necessárias para chegar a uma gravidez quando associado o PGT-A ao tratamento.



Fonte: Adaptado de Rubio et al., Fertil Steril 2017

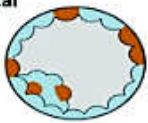













Com o avanço das técnicas utilizadas para realização do PGT-A, os resultados continuam melhorando. Porém, há de se pensar que a biópsia embrionária ainda é um procedimento muito invasivo ao embrião e quando realizado de maneira errada, pode prejudicar a viabilidade dele. Sendo essencial um profissional qualificado para a retirada da amostra necessária para realizar a técnica. Estudos e testes já vêm sendo realizados com uma nova técnica de PGT-A que revolucionará o tempo e a dificuldade de retirada de material genético do embrião para análise genética. A nova técnica se chama PGT-A não invasivo (ni-PGTA) e consiste na análise do meio de cultivo no qual o embrião se desenvolve. Ela se baseia no fato de que durante o seu desenvolvimento o embrião libera no meio DNA que contém uma representação completa de seu conteúdo cromossômico. Além de ser uma técnica que poderá ser realizada para todos as pacientes, e não só para os grupos de risco, já que não apresentará danos ao embrião, o custo dela será relativamente mais baixo (AZAMBUJA, 2017).

4.6 Mosaicismo

A principal limitação do PGT-A e dos outros testes pré-implantacionais que utilizam a biópsia como amostra, é o mosaicismo. Um indivíduo normal deve possuir a mesma quantidade de cromossomos em todas as células do corpo, já um indivíduo

mosaico é um indivíduo que possui dois tipos celulares distintos (Figura 15). Como na biópsia embrionária é retirada apenas algumas células do embrião, caso essas células possuam um material genético diferente do restante do embrião, o resultado não será fidedigno. O mosaicismo pode ser classificado em baixo grau (*low mosaic*) que corresponde a quando o embrião possui entre 30 e 50% de células aneuploides na biópsia, ou de alto grau (*high mosaic*), quando existem mais de 50 e menos de 70% de células aneuploides na biópsia (GRATI, 2018).

Figura 15 – Diferentes tipos de mosaicismo e possibilidades de resultados pós-biópsia.

Tipos de Mosaicismo	Possível Biópsia de Trofotoderma
Mosaico Total 	 Euplóide
	 Mosaico
	 Aneuplóide
Massa Intracelular Mosaico 	 Euplóide
Trofotoderma Mosaico 	 Euplóide
	 Mosaico
	 Aneuplóide
MIC/TE Mosaico Tipo I 	 Euplóide
MIC/TE Mosaico Tipo II 	 Aneuplóide

Fonte: Adaptado de RODRIGUEZ, 2017

Os fatores que podem contribuir para a formação do mosaicismo é incerto, podendo ser desde uma queda na temperatura durante seu desenvolvimento, até ao meio de cultivo utilizado. Os centros de reprodução humana possuem taxas de mosaicismo divergentes uns dos outros. Por isso, o mosaicismo ainda é um tema muito debatido em congressos e encontros de embriologia e um tema que precisa ser muito estudado para ser melhor entendido pelos profissionais e pacientes (AZAMBUJA, 2017).

Ao receber um laudo (Quadro 3) com ausência de embriões euploides, com apenas embriões aneuploides e mosaicos, o debate de transferir ou não o mosaico é importante. Para ajudar no esclarecimento sobre os riscos envolvidos em transferir um embrião mosaico, a PGDIS (Sociedade Internacional de Diagnóstico Genético) estabeleceu recomendações sobre cada cromossomo envolvido. O grupo de embriões que possuem mosaicismo nos cromossomos 13, 14, 16, 18 e 21 não é recomendada a transferência, já que alterações nesses cromossomos possuem grandes probabilidades de comprometimento fetal, aborto e dissomia uniparental. Embriões com mosaicismo nos cromossomos 2, 6, 7, 8, 9, 11, 15, 17, 20 e 22 estão no grupo em que a transferência pode ser recomendada apenas após aconselhamento genético e psicológico, já que o casal deve estar ciente dos riscos de uma possível não evolução da gravidez, aborto e comprometimento fetal. Embriões com mosaicismo nos cromossomos 1, 3, 4, 5, 10, 12 e 19 estão no grupo em que a transferência é geralmente considerada segura, já que não possuem muitas alterações que comprometem o desenvolvimento embrionário. Deve ser considerado também que o tipo de mosaicismo influencia, sendo o mosaicismo de baixo grau mais seguro para transferência do que mosaicismos de alto grau (GRATI, 2018).

Quadro 3 - Exemplo de um laudo de PGT-A contendo embriões mosaicos.

Resultados
Mosaico aneuplóide de baixo grau: -22
EUPLÓIDE
EUPLÓIDE
Aneuplóide: +22
Mosaico aneuplóide de alto grau: +1

Fonte: Adaptado de RIBOLDI, 2016

A biópsia de trofotoderma em blastocisto é a biópsia que apresenta menor porcentagem de mosaicismo (10%), contra 30% de taxa de mosaicismo em embriões em estágio de clivagem. Isso se deve ao fato de que um embrião em estado de clivagem possui seu genoma muito ativo e sofrendo constantes alterações, podendo ocorrer de que um mosaicismo no terceiro dia de desenvolvimento se autocorrija até a chegada do embrião em blastocisto. Portanto, caso a biópsia seja realizada em blastômero e o resultado seja mosaicismo em algum cromossomo não recomendado para a transferência, pode ser que se essa biópsia fosse realizada em blastocisto,

esse mosaicismismo poderia ter se autocorrigido e o resultado fosse um embrião euploide. Sendo assim, a paciente perdeu a oportunidade de transferir um embrião viável por causa de um diagnóstico equivocado. Esse é um outro ponto positivo importante e considerável para a biópsia de trofotoderma (AZAMBUJA, 2017).

Entre as técnicas existentes de PGT-A no mercado, o NGS é o mais acerto quando falamos de mosaicismismo e o único que consegue demonstrar com detalhes no laudo o nível do mosaicismismo, por essa razão é chamado de Smart PGT-A. Para poderem ser tomadas melhores decisões baseadas nos laudos, Munné em 2018, propôs que fossem divididos os embriões mosaicos em três categorias: (1) euploides, com alto potencial de implantação; (2) mosaico, com grande probabilidade de aborto e reduzido potencial de implantação; e (3) aneuploide, com altíssima probabilidade de falha de implantação, com risco significativamente elevado de aborto, potencial quase nulo de uma gestação a termo e alto risco para a saúde do feto e do bebê. O ni-PGT-A promete ser uma técnica precisa com as taxas de mosaicismismo, já que sua análise reflete o conteúdo do embrião como um todo, e não apenas poucas células. Com ele e com novas maneiras de classificar os mosaicismismos, a decisão de transferir ou não um embrião mosaico e quais seriam os seus riscos poderiam ser mais precisos (CUZZI, 2017).

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Atualmente a análise morfológica embrionária é a técnica mais empregada para classificar os embriões com melhor potencial de implantação para transferência. Porém, muitos estudos refletem a divergência entre morfologia embrionária e qualidade cromossômica. Como uma das principais causas de falha de implantação, abortos e comprometimento fetal é a aneuploidia, o PGT-A consegue prever de maneira correta quais são os embriões com viabilidade para implantar e seguir com uma gestação saudável. A biópsia de trofoblasto é a biópsia considerada mais adequada, pensando na quantidade de células que serão retiradas para a análise, nas taxas de mosaicismos apresentadas e no potencial de implantação apresentado nesse estágio celular.

A técnica de NGS foi capaz de fornecer maiores informações sobre mosaicismos, além de um resultado com maior resolução, precisão e exatidão que as outras técnicas. Além disso, o NGS diminuiu a incidência de falsos positivos e falsos negativos. Apesar de o PGT-A ser uma técnica que efetivamente beneficiou a área da reprodução assistida diminuindo o tempo de espera das pacientes para chegar a uma gestação saudável, ela ainda possui limitações, como o mosaicismos e a agressividade da técnica de biópsia embrionária. Além disso, é uma técnica cara e por isso, não pode ser aplicada na rotina à todas as pacientes.

Técnicas futuras como o ni-PGTA prometem a realização de um procedimento ainda mais preciso, sem a necessidade de realizar procedimentos invasivos no embrião e melhorar a avaliação de mosaicismos embrionários. Com isso, a partir de mais estudos, a técnica que já demonstrou resultados importantes para a melhoria dos procedimentos de reprodução assistida, demonstra também que continuará evoluindo para ajudar as pacientes à realizar seus sonhos de maneira mais rápida e segura.

REFERÊNCIAS

AITKEN, Robert J. et al. Oxidative stress and male reproductive health. *Asian Journal of Andrology*, v. 16, p.31–38, dez. 2013.

ALMEIDA, Pabline Barbosa Lima; DUARTE FILHO, Oscar Barbosa; SOARES, Jonathas Borges. Perspectivas de uso da hibridização genômica comparativa como rastreamento pré-implantacional em biópsias de embrião humano no estágio de blastocisto. **Reprodução & Climatério**, [s.l.], v. 28, n. 2, p.74-79, maio 2013.

ALVARENGA, Raquel de Lima Leite Soares; VIANA, Iara; PICINATO, Maria Cristina. Fertilização *in vitro* (FIV) e injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI). In: AZAMBUJA, Ricardo. **Reprodução Assistida: Técnicas de laboratório**. Porto Alegre: Age, 2017. Cap. 11. p. 141-152.

AQUINO, Aleister Crowley de; MARTINHAGO, Ana Carolina Nogueira; MARTINHAGO, Ciro Dresch. Biópsia embrionária: qual a melhor escolha?. **Reprodução & Climatério**, [s.l.], v. 28, n. 3, p.122-129, set. 2013.

AZAMBUJA, Ricardo; MANCEBO, Ana Cristina; PETERSEN, Claudia. **Reprodução Assistida: Técnicas de laboratório**. Porto Alegre: Age, 2017. 320 p.

BORGES, Nuno Costa. Trophectoderm biopsy of blastocysts using the Eppendorf TransferMan 4m micromanipulators assisted by a laser system. **Eppendorf**, n.351, p.1-7, mai.2016.

CAMARGOS, Maria das Graças Rocha de Santana. **Aspectos morfológicos e morfométricos de oócitos humanos pré e pós-vitrificação em procedimentos de fertilização *in vitro***. 2013. 103 f. Tese (Doutorado) - Curso de Medicina, Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2013.

CECCHINO, Gustavo Nardini et al. The role of mitochondrial activity in female fertility and assisted reproductive technologies: overview and current insights. **Reproductive**

Biomedicine Online, [s.l.], v. 36, n. 6, p.686-697, jun. 2018.

CHUANG, Chih-chi et al. Age is a better predictor of pregnancy potential than basal follicle-stimulating hormone levels in women undergoing *in vitro* fertilization. **Fertility And Sterility**, Taiwan, v. 79, n. 1, p.63-68, jan. 2003.

CORREA, Marilena C. D. V; LOYOLA, Maria Andrea. Tecnologias de reprodução assistida no Brasil: opções para ampliar o acesso. **Physis: Revista de Saúde Coletiva**, [s.l.], v. 25, n. 3, p.753-777, set. 2015.

CUZZI, Juliana F.; BARQUERO, Paula H. Lopes; HASSUN FILHO, Péricles Assad. Sequenciamento de última geração (NGS). In: AZAMBUJA, Ricardo. **Reprodução Assistida: Técnicas de laboratório**. Porto Alegre: Age, 2017. p. 242-248.

DAIN, Lena; AUSLANDER, Ron; DIRNFELD, Martha. The effect of paternal age on assisted reproduction outcome. **Fertility And Sterility**, [s.l.], v. 95, n. 1, p.1-8, jan. 2011.

DEMKO, Zachary P. et al. Effects of maternal age on euploidy rates in a large cohort of embryos analyzed with 24-chromosome single-nucleotide polymorphism–based preimplantation genetic screening. **Fertility And Sterility**, [s.l.], v. 105, n. 5, p.1307-1313, maio 2016.

FANASCA, Maythê Alves. **Teste genético pré-implantacional: uma importante ferramenta nos tratamentos de fertilização assistida**. 2018. 34 folhas. Trabalho de Conclusão de Curso- Aperfeiçoamento em Reprodução Humana Assistida – Módulo Laboratorial – Associação Instituto Sapientiae, São Paulo, 2018.

FARINATI, Débora Marcondes; RIGONI, Maisa dos Santos; MÜLLER, Marisa Campio. Infertilidade: um novo campo da Psicologia da saúde. **Estudos de Psicologia (campinas)**, [s.l.], v. 23, n. 4, p.433-439, dez. 2006.

FÉLIS, Keila Cristina; ALMEIDA, Rogério José de. Perspectiva de casais em relação

à infertilidade e reprodução assistida: uma revisão sistemática. **Reprodução & Climatério**, Goiânia, v. 31, n. 2, p.105-111, maio 2016.

FERTILITY. **PGD (Diagnóstico Genético Pré-Implantacional)**. 2017. Disponível em: <<https://fertility.com.br/tratamentos/pgd/>>. Acesso em: 6 jun. 2017.

FIGUEIRA, Rita de Cassia Savio. Morfologia do zigoto ao blastocisto. In: AZAMBUJA, Ricardo. **Reprodução Assistida: Técnicas de laboratório**. Porto Alegre: Age, 2017. p. 40-52.

GARDNER, David K et al. Blastocyst score affects implantation and pregnancy outcome: towards a single blastocyst transfer. **Fertility And Sterility**, [s.l.], v. 73, n. 6, p.1155-1158, jun. 2000.

GLEICHER, Norbert et al. Accuracy of preimplantation genetic screening (PGS) is compromised by degree of mosaicism of human embryos. **Reproductive Biology And Endocrinology**, [s.l.], v. 14, n. 1, p.1-5, 5 set. 2016.

GLEICHER, Norbert; ORVIETO, Raoul. Is the hypothesis of preimplantation genetic screening (PGS) still supportable? A review. **Journal Of Ovarian Research**, [s.l.], v. 10, n. 1, p.1-7, 27 mar. 2017.

GOMES, Luiz Mauro Oliveira et al. A idade como fator prognóstico nos ciclos de fertilização *in vitro*. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, Taubaté, v. 31, n. 5, p.230-234, maio 2009.

GOMES, Luiz Mauro O.; MOURA, Bernardo R. Lamounier de. Técnicas de biópsia embrionária. In: AZAMBUJA, Ricardo. **Reprodução Assistida: Técnicas de laboratório**. Porto Alegre: Age, 2017. p. 207-215.

GONÇALVES, Rozana Oliveira. **Alterações genéticas em casais com antecedentes de aborto recorrente no primeiro trimestre da gestação**. 2013. 102

f. Tese (Doutorado) - Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa, Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2013.

GRATI, Francesca Romana et al. An evidence-based scoring system for prioritizing mosaic aneuploid embryos following preimplantation genetic screening. **Reproductive Biomedicine Online**, [s.l.], v. 36, n. 4, p.442-449, abr. 2018.

HARDY, K; Handyside A.H. Biopsy of cleavage stage human embryos and diagnosis of single gene defects by DNA amplification. **Arch Pathol Lab Med**. v. 116, n. 4, p. 388-92, abr. 1992.

HARDY, Kate et al. Human preimplantation development *in vitro* is not adversely affected by biopsy at the 8-cell stage. **Human Reproduction**, [s.l.], v. 5, n. 6, p.708-714, ago. 1990. Oxford University Press (OUP).

HARPER, J. et al. What next for preimplantation genetic screening (PGS)? A position statement from the ESHRE PGD Consortium steering committee. **Human Reproduction**, [s.l.], v. 25, n. 4, p.821-823, 2 fev. 2010.

HOCHSCHILD, Fernando Zegers, et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care. **Fertility and Sterility**, jun. 2017.

HVIDMAN, H. W. et al. Individual fertility assessment and pro-fertility counselling; should this be offered to women and men of reproductive age? **Human Reproduction**, [s.l.], v. 30, n. 1, p.9-15, 17 nov. 2014.

KUSHNIR, Vitaly A. et al. Degree of mosaicism in trophectoderm does not predict pregnancy potential: a corrected analysis of pregnancy outcomes following transfer of mosaic embryos. **Reproductive Biology And Endocrinology**, Nova York, v. 16, n. 6, p.1-6, jan. 2018.

MANCIBO, Ana Cristina Allemand et al. Morfologia oocitária. In: AZAMBUJA, Ricardo. **Reprodução Assistida**: Técnicas de laboratório. Porto Alegre: Age, 2017. Cap. 2. p. 28-39.

MARTINHAGO, Ciro Dresch; MARTINHAGO, Ana Carolina Nogueira. Análise embrionária por microarray (SNP array + marcadores não polimórficos). In: AZAMBUJA, Ricardo. **Reprodução Assistida**: Técnicas de laboratório. Porto Alegre: Age, 2017. p. 227-241.

MORAES, Andréa Cristina de et al. Abordagem citogenética e molecular em material de abortos espontâneos. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, São Paulo, v. 27, n. 9, p.554-560, jan. 2005.

MUNNÉ, Santiago. Status of preimplantation genetic testing and embryo selection. *Reproductive Biomedicine Online*, [s.l.], v. 37, n. 4, p.393-396, out. 2018.

NAKADONARI, Elaine Keiko; SOARES, Andréia Assunção. Síndrome de Down: considerações gerais sobre a influência da idade materna avançada. **Arq Mudi.**, Maringá, v. 10, n. 2, p.5-9, jun. 2006

NUSSBAUM, R. L.; MCINNES, R. R.; WILLARD, H. F. **Thompson & Thompson**: genética médica. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2016.

OLIVEIRA, Ticiania Volpato; FREITAS, Gilberto da Costa; FRANCISCO, Luciana Semião. Diagnóstico genético pré-implantacional e seu valor prognóstico em tecnologia de reprodução assistida: revisão da literatura. *Femina*, São Paulo, v. 37, n. 12, p.649-654, dez. 2009.

ORVIETO, Raoul et al. Should pre-implantation genetic screening be implemented to routine clinical practice? *Gynecological Endocrinology*, [s.l.], v. 32, n. 6, p.506-508,

12 fev. 2016.

PRAJIANTE, Felipe de Melo; BUSSO, Newton Eduardo. O uso do diagnóstico genético pré-implantacional em pacientes com aborto de repetição: revisão do uso da técnica de array-CGH. *Reprodução & Climatério*, [s.l.], v. 28, n. 1, p.36-40, jan. 2013.

PELLESTOR, F.; ANAHORY, T.; HAMAMAH, S.. Effect of maternal age on the frequency of cytogenetic abnormalities in human oocytes. *Cytogenetic And Genome Research*, [s.l.], v. 111, n. 3-4, p.206-212, 2005.

PEREIRA, Thalita Mendes et al. Freqüência das Anormalidades Cromossômicas: Importância para o diagnóstico citogenético. *Arq Ciênc Saúde, Bauru*, v. 16, n. 1, p.31-33, jan. 2009

PIZZATO, Bianca Ribeiro et al. Revisão das técnicas de biologia molecular aplicadas no diagnóstico genético pré-implantacional e uma reflexão ética. *Reprodução & Climatério, Curitiba*, v. 32, n. 1, p.7-14, jan. 2017.

POMPEU, Tainã Naiara; VERZELETTI, Franciele Bona. Diagnóstico genético pré-implantacional e sua aplicação na reprodução humana assistida. *Reprodução & Climatério, Curitiba*, v. 30, n. 2, p.83-89, maio 2015.

RIBOLDI, Marcia. Infertilidade Humana. 2016. Disponível em: <<https://www.igenomix.com.br/news/infertilidade-humana-aumenta>>. Acesso em: 02 maio 2019.

RODINI, Elaine S. O. et al. Abortamentos espontâneos: estudos citogenéticos e riscos de recorrência. **Arq Ciênc Saúde**, Bauru, v. 11, n. 1, p.37-39, mar. 2004.

RODRIGUEZ, Maria Vera, Rubio, Carmen. Assessing the true incidence of mosaicism in preimplantation embryos: **Fertility and Sterility** 2017 May; Volume 107, (5): 1107-12.

ROLNIK, Daniel Lorber et al. Análise citogenética em material de abortamento espontâneo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, São Paulo, v. 56, n. 6, p.681-683, 2010.

RUBIO C, Bellver J, Rodrigo L, Castellón G, Guillén A, Vidal C, Giles J, Ferrando M, Cabanillas S, Remohí J, Pellicer A, Simón C. *In vitro* fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study. **Fertil Steril**. 2017 May;107(5):1122-1129

STEPTOE, P.c.; EDWARDS, R.g.. REIMPLANTATION OF A HUMAN EMBRYO WITH SUBSEQUENT TUBAL PREGNANCY. **The Lancet**, [s.l.], v. 307, n. 7965, p.880-882, abr. 1976.

SYNODINOS, Joanne Traeger. Pre-implantation genetic diagnosis. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, v. 39, p. 74-88, fev.2017.

TEIXEIRA, Aline C.z. et al. Estudo citogenético de abortos espontâneos. **Arq Ciênc Saúde**, Bauru, v. 16, n. 2, p.59-61, abr. 2009.

TONK, Vijay S.; WYANDT, Herman E.. **Human Chromosome Variation: Heteromorphism and Polymorphism**. [s.i.]: Springer, 2011.

TRAEGER-SYNODINOS, Joanne. Pre-implantation genetic diagnosis. **Best Practice & Research Clinical Obstetrics & Gynaecology**, [s.l.], v. 39, p.74-88, fev. 2017.

UNC Fertility. Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóides (ICSI). Disponível em: (<https://uncfertility.com/treatment-options/in-vitro-fertilization/intracytoplasmic-sperminjection/>). Visualizado em: 01/11/2018.

WISZNIEWSKA, Joanna et al. Combined array CGH plus SNP genome analyses in a single assay for optimized clinical testing. **European Journal Of Human Genetics**, Houston, v. 22, n. 1, p.79-87, 22 maio 2013.

WOLFF, Philip; MARTINHAGO, Ciro Dresch; UENO, Joji. Diagnóstico genético pré-implantacional: uma ferramenta importante para a rotina de fertilização *in vitro*? / Preimplantation genetic diagnosis: an important tool for the *in vitro* fertilization routine? **Lilacs**, São Paulo, v. 37, n. 6, p.297-303, jun. 2009.

WON, Se Yeon et al. Pre-implantation genetic diagnosis and pre-implantation genetic screening: two years experience at a single center. **Obstetrics & Gynecology Science**, Seoul, v. 61, n. 1, p.95-101, jan. 2018.

ZACHARY, P. Demko, et al. Effects of maternal age on euploidy rates in a large cohort of embryos analyzed with 24-chromosome single-nucleotide polymorphism–based preimplantation genetic screening. **Genetics**, v. 105, p. 1307–1313, mai. 2016.

ZEGERS-HOCHSCHILD, Fernando et al. The International Glossary on Infertility and Fertility Care, 2017. **Fertility And Sterility**, [s.l.], v. 108, n. 3, p.393-406, set. 2017.