Diagnóstico genético pré-implantacional e seu valor prognóstico em tecnologia de reprodução assistida: revisão da literatura

Preimplantation genetic diagnosis and its prognostic value in assisted reproduction technology: literature review

Ticiana Volpato Oliveira[1]
Gilberto da Costa Freitas[2]
Luciana Semião Francisco[3]

Palavras-chave
Diagnóstico pré-implantação
Rastreio genético de aneuploidias
FIV/ICSI

Keywords
Preimplantation genetic diagnosis
Preimplantation genetic screening
IVF/ICSI

Resumo O diagnóstico genético pré-implantacional, associado a técnicas de reprodução assistida como a fertilização *in vitro,* permite a seleção de pré-embriões euploides para transferência. Nos últimos anos, tem sido indicado visando o aumento nas taxas de sucesso de tratamento, na sua forma de rastreio de aneuploidias para um grupo de pacientes de alto risco reprodutivo como: idade materna avançada, aborto recorrente e falhas repetidas de tratamentos. O objetivo desta revisão é avaliar o valor prognóstico da realização do diagnóstico genético pré-implantação, associado às técnicas de fertilização *in vitro* e injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI), revisar as limitações da técnica e sua eficácia. Embora este grupo com elevado risco reprodutivo apresente alta taxa de aneuploidia, não foram encontrados dados consistentes na literatura a favor da realização do rastreio genético de aneuploidias; portanto, ainda são necessários estudos com grupos mais bem definidos para que o diagnóstico genético pré-implantacional possa ser confirmado como uma ferramenta para aumento de taxas ou como procedimento de rotina, até sua eficácia ser provada.

Abstract The preimplantation genetic diagnosis associated with assisted reproduction technology, as *in vitro f*ertilization, allows selecting euploid pre-embryos for transfer. In recent years, it has been performed as a screening tool for aneuploidy with the purpose of increasing reproductive rates in patient populations at high risk of aneuploidy, such as: advanced maternal age, recurrent pregnancy loss and repeated *in vitro* fertilization failures. The aim of this review is to evaluate the prognostic value of preimplantation genetic diagnosis, associated with *in vitro* fertilization and intracytoplasmic sperm injection (ICSI) techniques, to review technology's limitations and its effectiveness. Although this high risk population group presents high rate of aneuploidy, this review has not shown consistently data in the literature in favor of preimplantation genetic screening; therefore, more studies with well-defined groups are still needed in order that preimplantation genetic diagnosis may be confirmed as a tool for increasing rates or as a routine procedure, until technique's problems are solved and its effectiveness, proven.

Centro de Estudos e Pesquisas da Associação Instituto Sapientiae – São Paulo (SP), Brasil
[1] Pós-graduanda do programa de Reprodução Humana Assistida da Associação Instituto Sapientiae – São Paulo (SP), Brasil
[2] Doutor em Medicina pela Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (USP); Coordenador do Setor de Reprodução Humana do Centro de Referência da Saúde da Mulher; Diretor do Setor de Reprodução Humana da Maternidade Vila Nova Cachoeirinha – São Paulo (SP), Brasil
[3] Mestre em Ciências pela Universidade Federal de São Paulo (Unifesp); Embriologista do Centro de Fertilização Assistida – Fertility – São Paulo (SP), Brasil

Introdução

O diagnóstico genético pré-implantacional (PGD) é uma metodologia de indicação precoce, que visa à transferência seletiva de pré-embriões livres de doenças genéticas para os cromossomos ou genes estudados[1] (B). O procedimento pode ser realizado por técnicas como a aspiração do primeiro e segundo corpúsculo polar de oócitos fertilizados, remoção de um ou dois blastômeros de pré-embriões na fase precoce de clivagem, ou remoção das células do trofoblasto no estádio de blastocisto[2] (B).

Dois métodos principais são utilizados para analisar as células embrionárias, os quais são: reação em cadeia da polimerase (PCR), para diagnosticar doenças monogênicas; e hibridização fluorescente *in situ* (FISH) para diagnosticar doenças de origem cromossômicas[1] (B). Geralmente os cromossomos mais investigados são 13, 18, 21, X e Y[3] (A). Testes de PGD e PCR são utilizados com maior frequência para diagnóstico da fibrose cística, distrofia miotônica, doença de Huntington, beta talassemia e síndrome do X-frágil[4] (A).

O PGD pode ser dividido em duas categorias: PGD indicado para casais férteis com elevado risco de transmissão de doenças genéticas para a prole[3] (A), e rastreio genético pré-implantacional (PGS) indicado para a detecção de aneuploidias, em que o número de cromossomos selecionados está determinado, visando o aumento das taxas de gravidez em casais submetidos a tratamento de fertilização *in vitro* (FIV) ou injeção intracitoplasmática de espermatozoide (ICSI) e pacientes com mau prognóstico reprodutivo[5] (B).

Nos últimos anos o PGS tem sido sugerido e utilizado na tentativa de melhorar as taxas de gravidez em pacientes de idade materna avançada (IMA), aborto recorrente (AR) e falha repetida de implantação (FRI)[3,5] (A, B).

Segundo Ferraretti *et al.*, o PGS pode ser utilizado como uma ferramenta para ajudar no aconselhamento destes grupos de pacientes. Se pré-embriões euploides não estiverem disponíveis no primeiro ciclo de tratamento, as chances de estarem em um próximo estão reduzidas. Essas informações são importantes para os casais, podendo tanto incentivá-los a continuar o tratamento, se houver ao menos um pré-embrião euploide disponível, ou aconselhando-os à recepção de oócitos doados quando apenas pré-embriões aneuploides são encontrados[6] (B).

Com o objetivo de avaliar o valor prognóstico da realização do PGD, associado às técnicas de FIV/ICSI, realizou-se uma revisão da literatura. Foi considerada nos trabalhos a associação positiva da técnica de PGS ao aumento das taxas de implantação, gravidez e nascimentos vivos, a aplicabilidade da técnica a rotina da FIV/ICSI, sua eficácia e limitações na seleção dos pré-embriões.

Métodos

Realizou-se uma pesquisa bibliográfica utilizando como estratégias de busca as bases de dados Lilacs, *Medline*, Biblioteca Cochrane e pesquisa por meio do site de busca *Pubmed* pelas seguintes palavras-chaves: "*preimplantation genetic diagnosis*"; "*preimplantation genetic screening*".

Dentre os artigos consultados foram selecionadas metanálises, ensaios clínicos randomizados controlados e revisões da literatura. Foram definidos como critérios de inclusão: artigos empíricos de língua inglesa, abordando taxas de gravidez, implantação e transferência de pré-embriões. Os artigos foram selecionados a partir da leitura do resumo, formato *full text*, e com base nos aspectos metodológicos, relevância e aplicabilidade clínica.

Desenvolvimento

Em casais com boa resposta à estimulação hormonal e cariótipo normal, a probabilidade de gravidez, durante os três primeiros ciclos de fertilização *in vitro*, permanece inalterada[7] (B). No entanto, a taxa de nascimento é drasticamente reduzida quando as técnicas de reprodução assistida (TRA) são aplicadas em mulheres com insucesso em transferências prévias, ou em mulheres com IMA. O declínio da fecundidade pode ser explicado devido ao fato das aneuploidias desempenharem um papel importante na determinação da viabilidade do pré-embrião[8,9] (A,B).

Rubio *et al.*[10], em 2003, demonstraram que em mulheres jovens e saudáveis submetidas à FIV, 33% dos pré-embriões são cromossomicamente anormais para pelo menos um dos sete cromossomos testados (13, 16, 18, 21, 22, X e Y). Esta taxa duplica para pacientes com idade ≥37 anos e, na presença de problemas adicionais como AR ou translocações, essa taxa sobe para 70%[4] (A, B). As anomalias cromossômicas numéricas são muito frequentes em pré-embriões de pacientes com mau prognóstico (60 a 70%). Esses pré-embriões, quando transferidos, poderiam causar falha de implantação[8,11] (A).

O fator idade contribui significativamente para a diminuição das taxas de implantação, essas mulheres apresentam um substancial número de pré-embriões anormais (40,4 a 64,0%) e, aproximadamente, 25% dos pacientes não possuem pré-embriões normais para transferência[11-13] (A, B).

Portanto, se essa diminuição fosse causada somente por anomalias cromossômicas, após a realização do PGS deveria ocorrer um aumento considerável nas taxas de implantação,

contribuindo de forma significativa para alcançar maiores taxas de sucesso das TRA[9,10] (B).

Taxa de implantação

A implantação é um processo complexo que envolve a sincronização de fatores como a qualidade do pré-embrião, a receptividade endometrial e o sistema imunológico[4] (A). Estes elementos devem ser considerados na transferência de pré-embriões para minimizar a ocorrência de falhas. A falha recorrente na implantação é definida como três ou mais fracassos em ciclos de FIV, ou o fracasso de implantação após a transferência de dez ou mais pré-embriões de boa qualidade[4] (A). A taxa de implantação é a razão entre o número de sacos gestacionais com frequência cardíaca fetal e o número total de pré-embriões transferidos[8] (A).

Gianaroli *et al*.[8] e Munné *et al*.[9], em 1999, publicaram trabalhos que mostravam um aumento das taxas de implantação após a realização do PGS em pacientes de IMA, porém os valores obtidos não apresentaram significância estatística entre o grupo que realizou o PGS e o Grupo Controle, tanto para Gianaroli[8] (25,8 *versus* 14.3%) quanto para Munné[9] (18 *versus* 14%). Além disso, no estudo feito por Gianaroli[8] não houve uma randomização adequada dos grupos[8,9] (A, B).

Resultados semelhantes foram encontrados por Staessen *et al*. investigando o efeito da realização do PGS em casais ≥37 anos de idade em um total de 400 pacientes[11] (A). Os grupos de estudo foram combinados de modo semelhante em termos de anos de infertilidade, história de gravidez, etiologia da infertilidade, número total de oócitos recuperados, taxa de fertilização e taxa de desenvolvimento do pré-embrião. A média de idade no grupo de estudo foi 40,1±2,4 anos e no Grupo Controle foi de 39,9±2,4 anos.

As taxas de implantação após o PGS (17,1%) e o Grupo Controle (11,5%) foram similares e sem significância estatística. Entretanto, o número de pré-embriões transferidos foi significativamente maior no Grupo Controle (2,8±1,2) em relação ao grupo de estudo (2,0±0,9), o que poderia ter interferido nos resultados obtidos.

Recentemente, um grande estudo randomizado, controlado e duplo-cego avaliou 206 pacientes com idade ≥38,0 no grupo do PGS e 202 pacientes no Grupo Controle. Foram investigados os cromossomos 1, 13, 16, 17, 18, 21, X e Y. Os resultados apontaram para uma taxa de implantação de 11,7% para o grupo de estudo e 14,7% para o Grupo Controle, evidenciando uma diminuição da taxa de implantação. Estes resultados não corroboram com os valores de estudos anteriores. Neste estudo foram transferidos pré-embriões não biopsiados, pré-embriões biopsiados de forma inadequada em relação ao número total de células recomendado e pré-embriões sem um resultado de FISH, o que pode ter contribuído para uma redução global das taxas associadas ao grupo de estudo[14] (A). Os dados estão sintetizados na Tabela 1.

Taxa de gravidez/nascidos vivos

A gravidez clínica é definida pela presença do saco gestacional e feto com batimento cardíaco confirmado ao ultrassom a partir da sétima semana de gestação[15] (B).

Assim como nas taxas de implantação, as diferenças encontradas entre as taxas de gravidez nos estudos investigados não foram estatisticamente significantes (Tabela 2). Gianaroli *et al*., apesar de não encontrarem diferenças entre os grupos, ao dividir o pacientes em grupos por idade: 36-37 anos, 38-39 anos, e ≥40 anos, a taxa de gravidez mostrou uma diferença significante[8] (A).

Em relação à taxa de nascidos vivos (Tabela 3), todos os trabalhos investigados foram favoráveis à realização do PGS, mas apenas dois demonstraram significância estatística. Em um estudo comparativo para IMA, Werlin *et al*. relataram seis gestações para o grupo de estudo (PGS) e três para o Grupo Controle com uma taxa global de gravidez de 42,2% no grupo de estudo, e 31,2% no Grupo Controle. Porém, alguns dados importantes do estudo não foram colocados de forma clara ou foram omitidos. Os resultados não tiveram significância estatística e o número da amostra foi irrelevante[13] (B).

Munné *et al*.[16] obtiveram taxa de 20% de nascidos vivos no grupo de estudo e 14% no Grupo Controle, mas a dimensão

Tabela 1 - Comparação das taxas de implantação de acordo com os grupos de estudo

Estudo	Pacientes	Idade (anos)	Taxa de implantação (%)		Valor estatístico
			Grupo de estudo	Controle	
Rubio *et al.*[10]	AR	≥37	28	20,6	NS
Munné *et al.*[16]	AR (≥3)	≥35	31	38	NS
Gianaroli *et al.*[8]	IMA e FRI (≥3)	≥36	IMA 25,8; FIR 17,3	IMA 14,3; FIR 9,5	S
Munné *et al.*[9]	IMA	≥35	18	14	NS
Staessen *et al.*	IMA	≥37	17,1	11,5	NS
Stevens *et al.*[18]	IMA	≥35	44	32	NS
Mastenbroek *et al.*[14]	IMA	≥37	11,7	14,7	NS

IMA: idade materna avançada; FRI: falha recorrente de implantação; AR: aborto recorrente (valores entre parênteses significam o número de abortos anteriores); NS: não significativo; S: significativo (p<0,05).

Tabela 2 - Comparação das taxas de gravidez de acordo com os grupos de estudo

Estudo	Pacientes	Idade (anos)	Taxa de gravidez (%)		Valor estatístico
			Grupo de estudo	Controle	
Rubio *et al.*[10]	AR	≥37	34,3	29	NS
Werlin *et al.*[13]	IMA; AR (≥2) e FRI (>2)	≥38	IMA 43; AR 63.6; FRI 20	IMA 25; AR 37,5; FRI 0	NS
Gianaroli *et al.*[8]	IMA e FRI (≥3)	≥36	IMA 39; FRI 25	IMA 31; FRI 22	NS
Staessen *et al.*[11]	IMA	≥37	39	28	NS
Stevens *et al.*[18]	IMA	≥35	88,9	60	NS
Mastenbroek *et al.*[14]	IMA	≥37	25	37	S

IMA: idade materna avançada; FRI: falha recorrente de implantação; AR: aborto recorrente (valores entre parênteses significam o número de abortos anteriores); NS: não significativo; S: significativo (p<0,05).

Tabela 3 - Comparação das taxas de nascidos vivos de acordo com os grupos de estudo

Estudo	Pacientes	Idade (anos)	Taxa de nascidos vivos (%)		Valor estatístico
			Grupo de estudo	Controle	
Rubio *et al.*[10]	AR	≥37	56,5	66,7	NS
Munné *et al.*[16]	AR (≥3)	≥35	20	14	NS
Munné *et al.*[9]	IMA	≥35	16	11	S
Staessen *et al.*[11]	IMA	≥37	11	15	NS
Platteau *et al.*[15]	IMA	≥37	81,1	74	NS
Mastenbroek *et al.*[14]	IMA	≥37	24	35	S

IMA: idade materna avançada; FRI: falha recorrente de implantação; AR: aborto recorrente (valores entre parentêses significam o número de abortos anteriores); NS: não significativo; S: significativo (p<0,05).

da amostra (58 pacientes) também não possibilitou afirmações definitivas sobre essas taxas. Platteau *et al*.[15], assim como os outros grupos, encontram taxas de nascidos vivos em pacientes de IMA, 81,1% (grupo de estudo) e 74% no Controle, apesar do tamanho da amostra ser relevante os resultados não foram significativos[15,16] (B, A).

Em uma metanálise, incluindo dois estudos randomizados com pacientes de IMA, não foram encontradas diferenças na taxa de nascidos vivos, 11% no Grupo PGS *versus* 15% no Controle; *Odds Ratio* (OR): 0,65; intervalo de confiança (IC): 95%=0,36-1,19, e nem na taxa de gravidez clínica com 15% no Grupo PGS *versus* 22% no Controle; OR: 0,42; IC95%=0.12-1.51. Para Mastembroek *et al*.[14], o grupo de estudo novamente apresentou significativa redução das taxas, tanto de gravidez (25%, 52 de 206, *versus* 37%, 74 de 202; OR: 0,69; IC95%=0,51-0,93) quanto de nascidos vivos (24%, 49 de 206, *versus* 35%, 71 de 202; OR: 0,68; IC95%=0,50-0,92)[3,14] (A).

Taxa de aborto espontâneo

Em geral, a causa mais comum de abortos espontâneos são anomalias numéricas, principalmente as trissomias autossômicas dos cromossomos 13, 14, 15, 16, 21 e 22, seguida por monossomias do X[17] (B). Quando o PGS é aplicado em pacientes inférteis submetidas à FIV, a taxa de aborto espontâneo tende a ser reduzida[9](B). Os estudos que avaliaram esta variável estão sintetizados na Tabela 4 e revelaram resultados semelhantes. Munné *et al*.[9] demonstraram que a taxa de aborto espontâneo diminuiu 2,5 vezes após PGS (p<0,05), de 23% no Controle para 9% no grupo de estudo que, combinado com o ligeiro aumento na taxa de implantação no Grupo PGS, produziu um aumento do número de nascidos vivos (11% no Controle e 16% no Grupo PGS). Staessen[11] e Stevens[18] encontraram resultados similares com aumento das taxas nos Grupos Testes, porém sem significância estatística. Alguns embriões possivelmente foram transferidos, mesmo tendo morfologia pobre devido ao diagnóstico normal, o que poderia influenciar nessas taxas[9,11,18] (B, A).

No estudo realizado por Rubio[10], houve três abortos e a taxa foi de 13% no grupo de estudo. Em um caso, o embrião tinha uma trissomia do cromossomo 15 e a paciente tinha 39 anos. Neste estudo não foi rastreado esse cromossomo particular, embora seja encontrado com frequência em amostras de abortos espontâneos[10,17] (B).

Em geral, os estudos avaliados diferem em relação à metodologia e se tornam limitados em termos de interpretação e coleta de dados, dificultando assim as comparações. Alguns estudos possuem amostras de dimensões reduzidas, outros diferem em relação à idade das pacientes, cromossomos testados e não fazem menção sobre a qualidade dos pré-embriões biopsiados.

Limitações da técnica

Existem algumas limitações em relação à técnica de PGD, como número restrito de cromossomos que podem ser identificados, a possível sobreposição de sinais, sinal de divisão e mosaicismo, os

Tabela 4 - Comparação das taxas de aborto espontâneo de acordo com os grupos de estudo

Estudo	Pacientes	Idade (anos)	Taxa de aborto espontâneo (%)		Valor estatístico
			Grupo de estudo	Controle	
Gianaroli *et al.*[8]	IMA e FRI (≥3)	≥36	IMA 4; FRI 20	IMA 20; FRI 20	NS
Munné *et al.*[9]	IMA	≥35	9	23	S
Staessen *et al.*[11]	IMA	≥37	7	9	NS
Stevens *et al.*[18]	IMA	≥35	28	48	NS
Platteau *et al.*[15]	IMA	≥37	16,9	23,8	NS
Mastenbroek *et al.*[14]	IMA	≥37	18	18	NS

IMA: idade materna avançada; FRI: falha recorrente de implantação; NS: não significativo; S: significativo (p<0,05).

quais podem levar a erros de diagnósticos, assim, um pré-embrião rotulado como "normal", na verdade poderia ser aneuploide para um ou mais cromossomos não testados[19] (B).

Outra limitação é a ocorrência de pré-embriões mosaicos, apresentando células euploides e aneuploides ou distintas aneuploidias em diferentes blastômeros encontrados em até 57% dos pré-embriões biopsiados no dia 3. Estes são provenientes de erros na mitose, não disjunção ou atrasos na anáfase, sendo este último responsável por 56% do mosaicismo observado na fase de blastocisto[20] (B).

No entanto, a taxa de incidência de mosaicismo em aborto espontâneo e em gravidez vital é baixa (5 e 2%, respectivamente), por isso, é provável que a maior parte dos pré-embriões mosaicos seja eliminada antes do primeiro trimestre de gravidez, após a ativação do genoma embrionário[21] (C).

Alternativas futuras

As limitações relacionadas à técnica poderiam ser superadas no futuro, utilizando hibridação genômica comparada (CGH), técnica que possibilita analisar o número de cópias de todos os cromossomos de um único blastômero, podendo assim, identificar o verdadeiro nível de mosaicismo[19] (B).

A CGH tem sido capaz de identificar rupturas no cromossomo não detectáveis por meio da FISH, e as taxas de pré-embriões normais foram menores se comparadas àquelas analisadas pela FISH (~25%)[19,22] (B).

Contudo, a CGH também apresenta desvantagens que incluem o fato de não distinguir células diploides de haploides ou tetraploides e a necessidade de um longo prazo para a hibridação, cerca de cinco dias[23] (B). Outro viés seria o congelamento dos pré-embriões obrigatório após a biópsia, que levaria a uma importante diminuição do grau de sucesso, pois há uma redução significativa na taxa de sobrevivência de pré-embriões biopsiados após a criopreservação[22] (B).

Atualmente, a melhor alternativa para uma metodologia CGH simplificada, aplicável clinicamente, é a "*microarray*". A vantagem da técnica está no tempo necessário para análise, menos de 48 horas, dentro do prazo regular de uma transferência embrionária após PGS. A aplicação futura de *microarray* para PGS parece ser muito promissora, e sua relativa simplicidade técnica está vinculada a torná-la mais propícia à aplicação rotineira nos laboratórios de FIV[1] (B).

Técnicas não invasivas para a seleção de pré-embriões, como a proteômica e metabolômica, estão sendo cada vez mais estudadas, pois são capazes de fornecer informações importantes sobre as alterações do meio de um pré-embrião *in vitro*[24] (B).

As condições não adequadas de cultura induzem ao estresse celular e levam a transformações metabólicas associadas à mudança de viabilidade[24,25] (B). Os métodos são capazes de avaliar com precisão o potencial reprodutivo de um pré-embrião em fase de clivagem, atribuindo uma pontuação a esse embrião e o correlacionando com sucesso de gestação[25] (B).

Conclusão

Esta revisão não encontrou provas consistentes na literatura, apontando um efeito benéfico tanto do PGD como do PGS em termos de melhoria nas taxas de implantação, gestação e nascidos vivos. Embora os dados revelem um aumento dessas taxas, esse aumento não possui valor estatístico e a técnica não aumenta as taxas de sucesso nos vários centros de reprodução estudados.

No entanto, é importante frisar o valor da realização do PGD oferecido para casais férteis com alto risco de transmissão de doenças genéticas, com intuito de selecionar pré-embriões livres de doenças genéticas específicas. E, finalmente, até a presente data, tanto o PGD quanto o PGS não devem ser oferecidos como procedimento de rotina pelos centros, visando aumento de taxas até ser comprovada sua eficácia.

Leituras suplementares

1. Fragouli E. Preimplantation genetic diagnosis: present and future. J Assist Reprod Genet. 2007;24(6):201-7.
2. Kanavakis E, Traeger-Synodinos J. Preimplantation genetic diagnosis in clinical practice. J Med Genet. 2002;39(1):6-11.
3. Twisk M, Mastenbroek S, Wely M, Heineman MJ, Veen F, Repping S. Preimplantation genetic screening for abnormal number of chromosomes (aneuploidies) in in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection (Cochrane Review). In: The Cochrane Library, Issue 4, 2007. Oxford: Update Software.
4. ESHRE PGD Consortium Steering Committee. ESHRE Preimplantation Genetic Diagnosis Consortium: data collection III (May 2001). Hum Reprod. 2002;17(1): 233-46.
5. Donoso P, Staessen C, Fauser BC, Devroey P. Current value of preimplantation genetic aneuploidy screening in IVF. Hum Reprod Update. 2007;13(1):15-25.
6. Ferraretti AP, Magli MC, Kopcow L, Gianaroli L. Prognostic role of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in assisted reproductive technology outcome. Hum Reprod. 2004;19(3):694-9.
7. Sharma V, Allgar V, Rajkhowa M. Factors influencing the cumulative conception rate and discontinuation of in vitro fertilization treatment for infertility. Fertil Steril. 2002;78(1):40-6.
8. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, Munné S. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. Fertil Steril. 1999;72(5):837-44.
9. Munné S, Magli C, Cohen J, Morton P, Sadowy S, Gianaroli L, *et al*. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. Hum Reprod. 1999;14(9):2191-9.
10. Rubio C, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohí J, *et al*. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. Hum Reprod. 2003;18(1):182-8.
11. Staessen C, Platteau P, Van Assche E, Michiels A, Tournaye H, Camus M, *et al*. Comparison of blastocyst transfer with or without Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in couples with advanced maternal age: a prospective randomized controlled trial. Hum Reprod. 2004;19(12): 2849-58.
12. Sandalinas M, Sadowy S, Alikani M, Calderon G, Cohen J, Munné S. Developmental ability of chromosomally abnormal human embryos to develop to the blastocyst stage. Hum Reprod. 2001;16(9):1954-8.
13. Werlin L, Rodi I, DeCherney A, Marello E, Hill D, Munné S. Preimplantation genetic diagnosis as both a therapeutic and diagnostic tool in assisted reproductive technology. Fertil Steril. 2003;80(2):467-8.
14. Mastenbroek S, Twisk M, Echten-Arends VJ, Sikkema-Raddatz B, Korevaar JC, Verhoeve HR, *et al.* In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. N Engl J Med. 2007;357(1):9-17.
15. Platteau P, Staessen C, Michiels A, Van Steirteghem A, Liebaers I, Devroey P. Preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy screening in women older than 37 years. Fertil Steril. 2005;84(2):319-24.
16. Munné S, Chen S, Fischer J, Colls P, Zheng X, Stevens J, *et al*. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. Fertil Steril. 2005;84(2): 331-5.
17. Stephenson MD, Awartani KA, Robinson WP. Cytogenetic analysis of miscarriages from couples with recurrent miscarriage: a case-control study. Hum Reprod. 2002;17(2):446-51.
18. Stevens J, Wale P, Surrey S, Schoolcraft WB, Gardner DK. Is aneuploidy screening for patients aged 35 or over beneficial? A prospective randomized trial. Fertil Steril. 2004;82:249.
19. Voullaire L, Slater H, Williamson R, Wilton L. Chromosome analysis of blastomeres from human embryos by using comparative genomic hybridization. Hum Genet. 2000;106(2):210-7.
20. Coonen E, Derhaag JG, Dumoulin JC, van Wissen LC, Bras M, Janssen M, *et al*. Anaphase lagging mainly explains chromosomal mosaicism in human preimplantation embryo. Hum Reprod. 2004;19(2):316-24.
21. Los FJ, Van Opstal D, van den Berg C. The development of cytogenetically normal, abnormal and mosaic embryos: a theoretical model. Hum Reprod Update. 2004;10(1):79-94.
22. Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R, McBain J. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization or fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. Fertil Steril. 2003;80(4):860-8.
23. Wilton L. Preimplantation genetic diagnosis and chromosome analysis of blastomeres using comparative genome hybridization. Hum Reprod Update. 2005;11(1):33-41.
24. Gardner DK, Sakkas D. Assessment of embryo viability: the ability to select a single embryo for transfer - a review. Placenta. 2003;24 Suppl B: S5-12.
25. Vergouw CG, Botros LL, Roos P, Lens JW, Schats R, Hompes PG, *et al*. Metabolomic profiling by near-infrared spectroscopy as a tool to assess embryo viability: a novel, non-invasive method for embryo selection. Hum Reprod. 2008;23(7): 1499-504.