



Análisis del mosaicismo en blastocistos mediante secuenciación masiva: cromosomas afectados y relación con la edad materna

Mosaicism analysis in blastocysts by next-generation sequencing: affected chromosomes and relationship with maternal age.

Anna Calull-Bagó,^{1,2} Cristina Coyotecatl-Ramírez,¹ Raúl Eduardo Piña-Aguilar,^{1,3,4} Patricia Cancino-Villarreal,² Claudia González-Ortega,² Antonio Martín Gutiérrez-Gutiérrez^{1,2}

Resumen

ANTECEDENTES: Si bien la edad materna avanzada se relaciona con mayor tasa de aneuploidías, no hay suficientes estudios que analicen la relación entre la edad y el mosaicismo embrionario.

OBJETIVO: Evaluar la prevalencia de mosaicismo en los cromosomas, su relación con la edad materna y describir las características de los embriones mosaico.

MATERIAL Y MÉTODO: Estudio retrospectivo de biopsias de trofoectodermo obtenidas mediante secuenciación masiva, procedentes de ciclos de PGT-A. Los embriones se clasificaron por estado de ploidía (PGDIS, 2016): euploide (< 20%), aneuploide (> 80%) y mosaico (20-80%). Los reportes de las biopsias se estratificaron en dos grupos de edad: menores de 35 años e igual o mayores de esa edad. La prevalencia de mosaicismo se estimó por cromosoma. Para el análisis estadístico se utilizó ANOVA.

RESULTADOS: Se analizaron 470 biopsias procedentes de 106 ciclos de PGT-A. La tasa de mosaicismo global fue de 22.5% y de euploidía y aneuploidía de 40.8 y 36.7%, respectivamente. De los embriones mosaico, 30% fueron de tipo aneuploide-aneuploide y 70% diploide-aneuploide. Los cromosomas en mosaico con mayor prevalencia fueron el 1, 6 y 20. La tasa de mosaicismo en pacientes menores de 35 años fue de 26.8% y de 25% en pacientes igual o mayores de 35 años. No se encontró diferencia significativa entre los grupos.

CONCLUSIONES: Si bien existe una relación directa entre la edad materna y la aneuploidía debido a errores meióticos, el mosaicismo fue independiente de la edad, lo que es consistente con errores de origen mitótico y podría estar asociado con otros factores.

PALABRAS CLAVE: Edad materna; aneuploidía; mosaicismo; prevalencia; cromosomas.

Abstract

BACKGROUND: Advanced maternal age is associated with a higher aneuploidy rate. However, few studies exist that analyse the relationship of age with embryonic mosaicism.

OBJECTIVE: To evaluate the prevalence of mosaicism in chromosomes and their relationship with maternal age; in addition, discern the characteristics of mosaic embryos.

MATERIAL AND METHOD: A retrospective analysis of 470 trophoctoderm biopsies by next-generation sequencing analysis from 106 PGT-A cycles. Embryos were classified by ploidy state (PGDIS, 2016): euploid (< 20%), aneuploid (> 80%) and mosaic (20-80%). The biopsies results were stratified in two age groups: < 35 years and ≥ 35 years. Incidence of mosaicism was estimated by chromosome. ANOVA test was used for statistical analysis.

RESULTS: The overall mosaicism rate was 22.5%, whereas the euploidy and aneuploidy rate were 40.8% and 36.7%, respectively. Of the mosaic embryos, 30% were aneuploid-aneuploid, and 70% were diploid-aneuploid. The chromosomes most af-

¹Vida Genetics, León, Guanajuato, México.

²Instituto de Ciencias en Reproducción Humana Vida, León, Guanajuato, México.

³Brigham and Women's Hospital, Boston, Massachusetts, Estados Unidos.

⁴Harvard Medical School, Boston, Massachusetts, Estados Unidos.

Recibido: 1 de julio 2019

Aceptado: 2 de marzo 2020

Correspondencia

Anna Calull
a.calull@gmail.com

Este artículo debe citarse como

Calull-Bagó A, Coyotecatl-Ramírez C, Piña-Aguilar RE, Cancino-Villarreal P y col. Análisis del mosaicismo en blastocistos mediante secuenciación masiva: cromosomas afectados y relación con la edad materna. Reproducción (México). 2020; Vol. 11:1-8.
<https://doi.org/10.24245/rmm.v11i1.4037>

ected by mosaicism were 1, 6 and 20. The mosaicism rate in women younger than 35 years was 26.8% and 25% in patients older than or equal to 35 years. Non-significant difference between the groups was found.

CONCLUSIONS: Although there is a direct relationship between maternal age and aneuploidy due to meiotic errors, we found that mosaicism is independent of age, consistent with mitotic origin errors and it could be associated with other factors.

KEYWORDS: Maternal age; Aneuploidy; Mosaicism; Prevalence; Chromosomes.

ANTECEDENTES

Las alteraciones cromosómicas son la principal causa de falla en la implantación en ciclos de fertilización *in vitro*, abortos espontáneos y síndromes dismórficos en recién nacidos. Las aneuploidías, trisomías y monosomías son las alteraciones más frecuentes en la concepción humana asociadas con la edad materna.¹ En mujeres de 35 años y más se ha observado una tasa de aneuploidía de 30% que aumenta a 85% en las mayores de 45 años.² Las aneuploidías son la consecuencia de errores meióticos, principalmente en el gameto femenino, mientras que el mosaicismo se origina debido a errores poscigóticos. Hay estudios que demuestran que la transferencia de embriones mosaico también puede contribuir a la disminución del éxito reproductivo, con tasas de embarazo de 15 a 20% y aborto espontáneo de 55.6%.^{1,3}

El mosaicismo cromosómico es la coexistencia de dos o más líneas celulares con diferentes complementos cromosómicos provenientes del mismo embrión. La coexistencia de células euploides y aneuploides en un mismo blastocisto dificulta la estimación de su destino por las implicaciones clínicas y bioéticas que ocasionaría su transferencia. El origen del mosaicismo reside en errores en la segregación cromosómica poscigótica, como consecuencia de una no

disyunción mitótica que produce líneas celulares con cantidad de cromosomas diferentes. Distintos mecanismos, como el retraso en la anafase o la endoduplicación, también se han considerado posibles causas del mosaicismo, aunque son menos frecuentes.^{1,4-6} El mosaicismo en embriones se describió en el decenio de 1990 luego de estudiar cariotipos de blastocistos en los días 6 y 8 mediante hibridación *in situ* fluorescente (FISH). Sin embargo, esta técnica se ha reemplazado debido a sus limitaciones en la cantidad de cromosomas que pueden analizarse y su baja sensibilidad.⁷

Hoy en día existen otras metodologías que analizan los 23 pares de cromosomas con el propósito de detectar alteraciones cromosómicas en embriones derivados de la fertilización *in vitro* antes de su transferencia: los microarreglos basados en la hibridación genómica comparativa (CGHa), los microarreglos que analizan polimorfismos de un solo nucleótido (SNPa) y la secuenciación masiva (*Next Generation Sequencing*, NGS).^{1,5,6} Recientemente, la biopsia de trofoectodermo en conjunto con la secuenciación masiva se utiliza en la prueba genética preimplantacional para aneuploidías (PGT-A) porque ha demostrado mayor sensibilidad de detección de mosaicismo, entre otras ventajas. Una de las ventajas de la biopsia en los días 5 o 6 de desarrollo es que permite obtener varias células de un solo embrión



y analizar el ADN proveniente de más de una célula; también permite encontrar células con diferente complemento cromosómico. En la biopsia de día 3 solo se analiza una célula, y su resultado representa a todo el embrión. En la actualidad, con la biopsia de trofoectodermo se analizan de 5 a 10 células en las que todas pueden tener el mismo estado cromosómico euploide (balanceado) o aneuploide (desbalanceado), u observar discrepancias entre los hallazgos de diferentes células. El límite de detección de mosaicismo por NGS se ha descrito de $\approx 20\%$ por lo que valores inferiores quizá no se detecten.⁷

En los últimos años se han reportado transferencias de embriones presuntamente diagnosticados con mosaicos que dan lugar a embarazos evolutivos y niños con cariotipos euploides.^{1,2,3} Sin embargo, no existe un consenso en los criterios para el diagnóstico y transferencia de este tipo de embriones. En 2016, la Sociedad Internacional de Diagnóstico Genético Preimplantacional (PGDIS) propuso contemplar la transferencia de embriones mosaico ante la ausencia de embriones euploides. El criterio de diagnóstico se estratificó por estado de ploidía y se considera embrión euploide si la aneuploidía es menor de 20%, aneuploide si es mayor de 80% y mosaico si está entre 20 y 80%. En cuanto a la transferencia embrionaria, se sugirieron recomendaciones a seguir en función del cromosoma implicado.⁸

El objetivo de este estudio fue: evaluar la prevalencia de mosaicismo en los cromosomas, su relación con la edad materna y describir las características de los embriones mosaico.

MATERIAL Y MÉTODO

Estudio retrospectivo de biopsias de trofoectodermo obtenidas mediante secuenciación masiva, procedentes de ciclos de PGT-A efectuado entre junio de 2018 y abril de 2019. La estimulación ovárica dependió de las preferencias de cada

clínico y las necesidades de cada paciente. En general, se llevó a cabo con la administración de gonadotropinas (FSHr, FSHr+LHr y/o HMG) en un protocolo flexible con antagonistas de la GnRH. La maduración folicular se efectuó mediante el disparo con hCGr y se procedió con la captura de los complejos cúmulus-ovocito a las 36 horas posteriores al disparo. Los ovocitos se denudaron y se les practicó ICSI para la inseminación de los ovocitos maduros. Los embriones se cultivaron a bajas tensiones de oxígeno y en un intervalo de pH entre 7.2 y 7.4 hasta el día de la biopsia embrionaria. La perforación de la zona pelúcida se llevó a cabo en el día 4 de desarrollo y la biopsia embrionaria se tomó en el día 5 o 6, dependiendo de la calidad y grado de expansión de los blastocistos. Con láser (Octax, MTG GmbH) se tomaron de 5 a 10 células del trofoectodermo, se depositaron en tubos para PCR y se enviaron al laboratorio Vida Genetics (León, Guanajuato, México) para su análisis. Todas las biopsias de blastocistos se vitrificaron en espera del reporte del estudio.

Todas las biopsias embrionarias se analizaron mediante secuenciación masiva para la realización de la prueba genética preimplantacional para aneuploidías. El ADN de las biopsias embrionarias se amplificó mediante la técnica de *Whole Genome Amplification* (WGA) con el equipo Ion SingleSeq (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos). Posteriormente, el ADN obtenido se llevó a una amplificación isothermal. Para la secuenciación se utilizó el secuenciador Ion Torrent™ PGM siguiendo las especificaciones del protocolo Ion ReproSeq™ PGS Kits (Thermo Fisher Scientific, USA). El análisis de la cantidad de copias se efectuó con el programa Ion Reporter, versión 5.10.5 (Thermo Fisher Scientific, Estados Unidos) mediante el Workflow ReproSeq Mosaic PGS w1.1.

Siguiendo las recomendaciones de la *Preimplantation Genetic Diagnosis International Society*

(PGDIS, 2016), los embriones con menos de 20% de aneuploidía en las células del trofoectodermo se diagnosticaron euploides, los que tuvieron más de 80% de aneuploidía se diagnosticaron aneuploides y el intervalo entre 20 y 80% de aneuploidía se definió como mosaico.

Los embriones mosaico se clasificaron, a su vez, conforme al tipo de mosaicismo que tuvieron. Se catalogó mosaicismo aneuploide-aneuploide a los embriones con aneuploidías y, además, alteraciones cromosómicas en mosaico, y como mosaicismo del tipo diploide (balanceado)-aneuploide a los embriones euploides con aneuploidías en mosaico (**Figura 1**).

Para evaluar la repercusión de la edad materna en la tasa de embriones mosaico, las pacientes se clasificaron en dos grupos: menores de 35 años e igual o mayores de 35 años. La proporción de embriones euploides, aneuploides y mosaicos en el total de embriones biopsiados se calculó por paciente para evitar sesgos debido a la cantidad de embriones generados por cada paciente.

Para el análisis estadístico se utilizó el programa *IBM SPSS Statistics* versión 24. La comparación de medias se llevó a cabo con análisis estadístico ANOVA. Las diferencias de medias se consideraron significativas cuando la *p* fue menor de 0.05.

RESULTADOS

Se tomó biopsia a 470 blastocistos de 93 pacientes (106 ciclos de PGT-A). La edad media fue de 35.8 ± 6.2 años, con límites de 20 y 47. De las 470 biopsias, 39 (8.3%) se reportaron con falla de amplificación debido a la ausencia de ADN posterior a la amplificación.

De los 431 embriones con diagnóstico, 40.8% (176 de 431) se clasificaron euploides, 36.7% (158 de 431) aneuploides y 22.5% (97 de 431) mosaicos. De los 97 embriones clasificados mosaicos, 68 fueron euploides con una o varias alteraciones cromosómicas en mosaico (mosaicismo diploide-aneuploide) mientras que 29 de 97 fueron embriones aneuploides con otras alteraciones cromosómicas en mosaico (mosaicismo

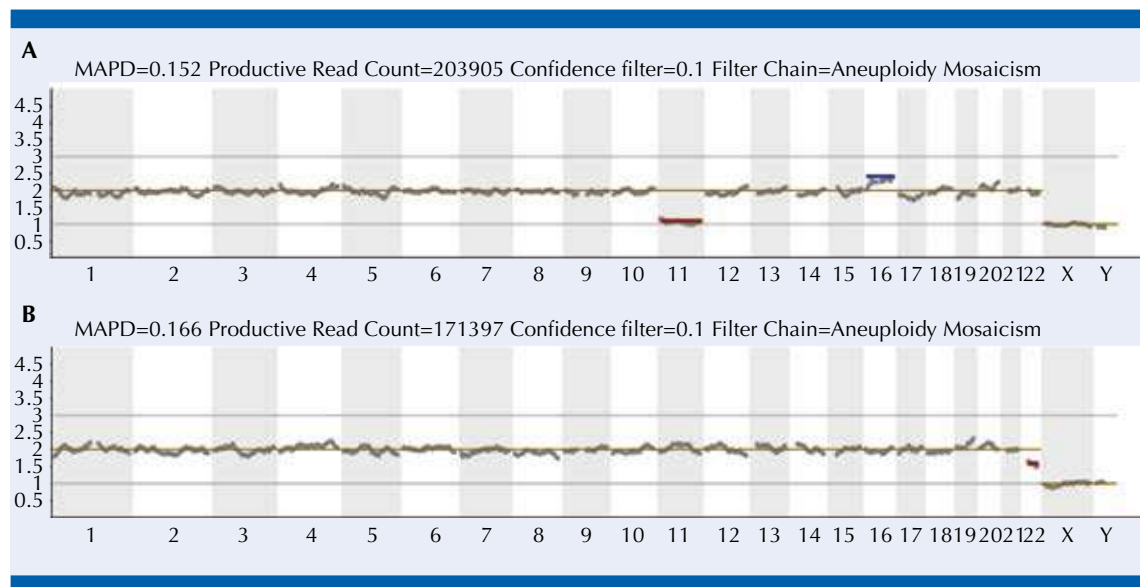


Figura 1. Perfiles de embriones mosaico. **A.** Aneuploide-aneuploide. **B.** Diploide (balanceado)-aneuploide.



aneuploide-aneuploide). En el primer grupo, 58 de 68 embriones con mosaicismo diploide-aneuploide solo 9 tuvieron la combinación de alteraciones de cromosomas completos, más alteraciones segmentarias, mientras que solo 1 de 68 tuvo aberraciones segmentarias como única alteración.

En las 97 biopsias afectadas por mosaicismo se encontraron 251 alteraciones cromosómicas en mosaico. Los cromosomas más frecuentemente afectados fueron el 1 ($n = 17$), el 20 ($n = 15$) y el 6 ($n = 14$) y los menos afectados el 8 ($n = 5$), el Y ($n = 5$), el 4 ($n = 6$) y el 11 ($n = 6$). Se observó que más de 5% de las biopsias tuvieron, simultáneamente, alteraciones en mosaico en los cromosomas 1, 2, 3, 6, 16, 19, 20 y X (**Figura 2**).

Para evaluar la repercusión de la edad materna en las tasas de euploidía, aneuploidía y mosaicismo, las pacientes se clasificaron en jóvenes

(menores de 35 años, $n = 32$) y edad materna avanzada (≥ 35 años, $n = 61$). **Cuadro 1**

Como era de esperar, las pacientes menores de 35 años tuvieron una tasa de euploidía significativamente mayor comparada con las pacientes igual o mayores de 35 años, 50.5 vs 33.6% respectivamente ($p = 0.012$). Sin embargo, las tasas de mosaicismo entre los dos grupos de edad fueron similares 26.8 vs 25%, sin diferencia significativa ($p = 0.663$).

DISCUSIÓN

Está reportado que la incidencia de mosaicismo es menor en el estadio de blastocisto comparado con estadios más tempranos del desarrollo, en parte porque ciertas alteraciones cromosómicas se asocian con el arresto embrionario y, quizá, por el propio mecanismo de segregación de blastómeras aneuploides del embrión.⁹ Por esto

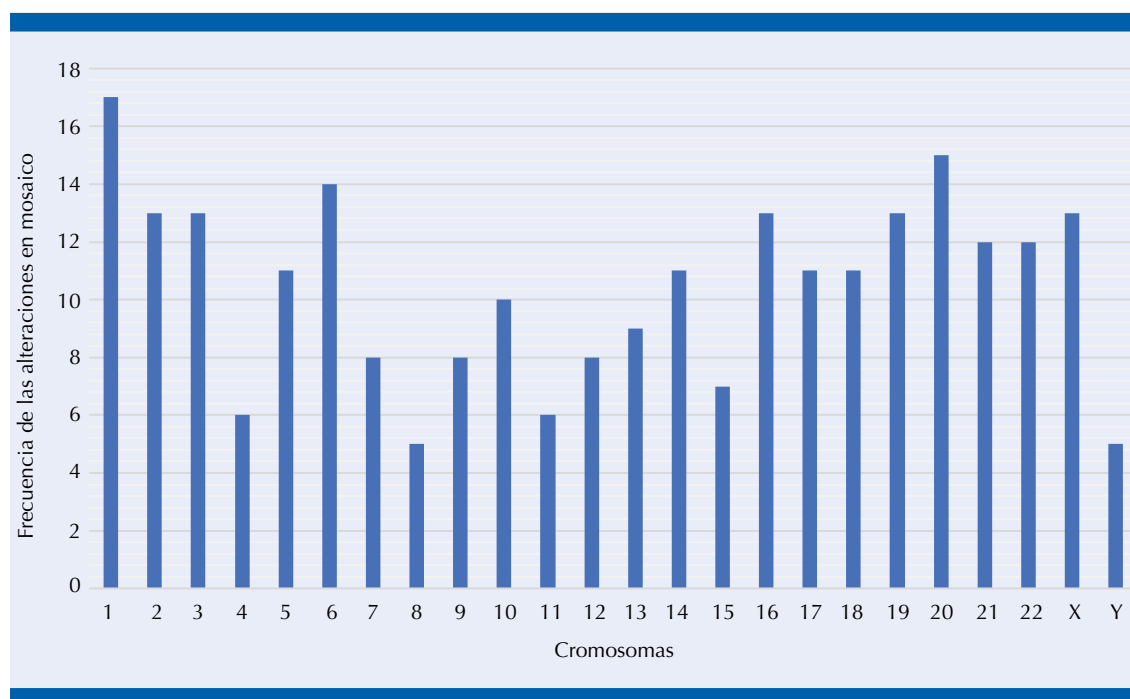


Figura 2. Frecuencias de mosaicismo por cromosoma.

Cuadro 1. Tasas de euploidía, aneuploidía y mosaicismo por edad materna (< 35 y ≥ 35 años)

Tasas (%)	< 35 años	≥ 35 años	Significación (p)
Euploidía	50.5	33.6	= 0.012
Aneuploidía	22.7	41.4	= 0.014
Mosaicismo	26.8	25.0	= 0.663

en la actualidad la mayor parte de los centros de reproducción asistida prefieren la biopsia de blastocisto.

Por mucho tiempo, el método más usado para realizar la prueba genética preimplantacional para aneuploidías fueron los microarreglos de CGH, que solo detectan mosaicismo cuando al menos un tercio de las células biopsiadas tienen un componente cromosómico distinto a las demás. Las técnicas PCR cuantitativa y los microarreglos de SNPs tienen aún menor sensibilidad. Con la introducción de la secuenciación masiva la detección de niveles bajos de mosaicismo ($\approx 20\%$) se convirtió en realidad. Al aumentar la sensibilidad en la detección del mosaicismo, la cantidad de embriones mosaico encontrados mediante la prueba genética preimplantacional para aneuploidías ha aumentado considerablemente.

En el estudio motivo de esta comunicación, la tasa de mosaicismo global detectada mediante secuenciación masiva fue de 22.5%, porcentaje que está dentro del rango de valores reportados previamente en otras investigaciones. Entre los estudios más recientes está el de Greco¹⁰ que reporta una tasa de mosaicismo de 4.8% con microarreglos de CGH. Otro estudio comunicó una tasa de mosaicismo de 44% después de analizar dos biopsias mediante diferentes técnicas.¹¹ Ruttanajit, mediante secuenciación masiva, encontró 13% de tasa de mosaicismo,¹² mientras que Maxwell y Nakhuda informaron 31.6 y 30.1% de mosaicismo, respectivamente.^{7,13}

Entre estos valores existe una elevada heterogeneidad; hay varios factores a considerar. Todos estos estudios utilizaron diferentes plataformas y la cantidad de blastocistos analizados difirió ampliamente, por lo que no sería correcto comparar sus resultados. Los embriones mosaico del tipo aneuploide-aneuploide fueron los menos comunes (30%). En muchos laboratorios este tipo de embriones se reportan aneuploides porque, a pesar de tener mosaicismo, son embriones que también tendrán aneuploidías o alteraciones segmentarias, de uno o más cromosomas, por tanto, no se van a transferir.

El otro 70% representa un reto para toda la comunidad dedicada a la medicina reproductiva. Transferir o no embriones mosaico (diploides-aneuploides) es un tema sumamente debatido por las implicaciones éticas y morales que implica. Está demostrado que estos embriones son capaces de dar lugar a un recién nacido sano.^{10,14,15} Sin embargo, a pesar de que las tasas de implantación y embarazo son menores al compararlas con embriones euploides y que la tasa de abortos es mayor,^{3,16} no puede descartarse la posibilidad de que den lugar a recién nacidos con alguna cromosopatía.

En cuanto a las alteraciones detectadas en mosaico, se observó que no se distribuyeron de igual manera entre los diferentes cromosomas. Los cromosomas 1, 6 y 20 fueron los de mayor incidencia, por lo que podría pensarse que el desarrollo embrionario es más tolerante a estas alteraciones en mosaico en comparación con el resto de cromosomas. Por consiguiente, el



mosaicismo de los cromosomas 8, 4 y 11 es, teóricamente, más nocivo para el embrión.

Otra de las ventajas del avance en las tecnologías para el PGT-A es la posibilidad de detectar alteraciones segmentarias. Éstas se describen como una delección o duplicación de una parte de un cromosoma, por lo que la cantidad total de cromosomas no varía. En el estudio aquí reportado se encontró que 1.5% de los embriones mosaicos diploides-aneuploides tuvieron alteraciones segmentarias como única aberración. Fragouli y Victor observaron que los desenlaces reproductivos de la transferencia de este tipo de embriones fueron similares a los obtenidos con la transferencia de embriones euploides.^{3,16} Sin embargo, las delecciones o duplicaciones de segmentos de cromosomas pueden llevar a fetos con malformaciones congénitas o retraso mental severo. Se requieren estudios de seguimiento detallados, según el cromosoma implicado.

Los resultados del análisis de la tasa de mosaicismo por edad concuerdan en que el mosaicismo es un evento poscigótico; por eso la edad materna no afecta su incidencia. Tampoco se observó repercusión de la edad materna en la incidencia de embriones mosaico. La tasa de mosaicismo entre mujeres jóvenes menores de 35 años y mayores o iguales a 35 años fue similar (26.8 vs 25%, respectivamente). Hasta donde sabemos, el primer estudio que reportó la relación de la edad materna con la tasa de mosaicismo en blastocistos, con análisis de 24 cromosomas, fue el de McCoy y su grupo.⁹ Ellos observaron, por primera vez, que a diferencia de los errores meióticos, los mitóticos no se asociaban con la edad materna. Posterior a este estudio solo se encontraron tres trabajos que analizaron la relación de la edad materna con la tasa de mosaicismo. El primero es el de Escudero y colaboradores, que analizaron 8555 blastocistos mediante NGS y en el que observaron que el mosaicismo no se

relacionaba con la edad materna.¹⁷ El segundo, llevado a cabo por Nakhuda y sus coautores, analizó 1547 blastocistos, también por NGS, y encontró que el mosaicismo no varió entre las mujeres de diferentes edades.⁷ Por último, Chan y colaboradores, los cuales analizaron 1004 blastocistos igualmente por NGS, observaron que la tasa de mosaicismo en las pacientes menores de 35 años fue significativamente menor comparada con las pacientes mayores o iguales a 35 años.¹⁸

La asociación de las aneuploidías con la edad materna es un hecho ampliamente documentado y, aunque el mosaicismo es un fenómeno solo poscigótico, se ha observado que la cohesión molecular, que es la responsable de unir las cromátides hermanas, disminuye con la edad, lo que podría afectar la segregación de los cromosomas.¹⁹ En concordancia con los reportes de Nakhuda y Escudero, aquí se observó un efecto de la edad materna en la incidencia de mosaicismo.

Acorde con los desenlaces de este estudio, mientras exista una relación directa entre la edad materna avanzada y la aneuploidía debido a errores meióticos, el mosaicismo será independiente de la edad; lo que es consistente con errores de origen mitótico. El mosaicismo podría estar asociado con otros factores: el cultivo y la biopsia embrionaria, factores intrínsecos del desarrollo temprano del embrión y otros que aún se desconocen.

REFERENCIAS

1. Capalbo A, Rienzi L. Mosaicism between trophectoderm and inner cell mass. *Fertil Steril* 2017;107(5):1098-106. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.03.023>.
2. Franasiak JM, et al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril* 2014;101(3):656-63. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.11.004>.

3. Fragouli E, et al. Analysis of implantation and ongoing pregnancy rates following the transfer of mosaic diploid-aneuploid blastocysts. *Human Genetics* 2017;136(7):805-19. <https://doi.org/10.1007/s00439-017-1797-4>.
4. Youssoufian H, Pyeritz RE. Mechanisms and consequences of somatic mosaicism in humans. *Nature Rev Gene* 2002;3(10):748-58. <https://doi.org/10.1038/nrg906>.
5. Munné S, Wells D. Detection of mosaicism at blastocyst stage with the use of high-resolution next-generation sequencing. *Fertil Steril* 2017;107(5):1085-91. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2017.03.024>.
6. Gueye NA, et al. Uniparental disomy in the human blastocyst is exceedingly rare. *Fertil Steril* 2014;101(1):232-36. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2013.08.051>.
7. Nakhuda G, et al. Frequencies of chromosome-specific mosaicisms in trophoectoderm biopsies detected by next-generation sequencing. *Fertil Steril* 2018;109:857-65. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.01.011>.
8. Preimplantation Genetic Diagnosis International Society. Position statement on chromosome mosaicism and preimplantation aneuploidy testing at the blastocyst stage. PGDIS 2016. http://www.pgdis.org/docs/newsletter_071816.html.
9. McCoy RC, et al. Evidence of selection against complex mitotic-origin aneuploidy during preimplantation development. *PLOS Genetics* 2015;11(10):e1005601.
10. Greco E, et al. Healthy babies after intrauterine transfer of mosaic aneuploid blastocysts. *N Engl J Med* 2015;373(21):2089-90.
11. Tortoriello DV, et al. Reanalysis of human blastocysts with different molecular genetic screening platforms reveals significant discordance in ploidy status. *J Assisted Reprod Gene* 2016;33:1467-71. <https://doi.org/10.1007/s10815-016-0766-5>.
12. Ruttanajit T, et al. Detection and quantitation of chromosomal mosaicism in human blastocysts using copy number variation sequencing. *Prenatal Diagnosis* 2016;36(2):154-62. <https://doi.org/10.1002/pd.4759>.
13. Maxwell SM, et al. Why do euploid embryos miscarry? A case-control study comparing the rate of aneuploidy within presumed euploid embryos that resulted in miscarriage or live birth using next-generation sequencing. *Fertil Steril* 2016;106(6):1414-19. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2016.08.017>.
14. Zhang L, et al. Rates of live birth after mosaic embryo transfer compared with euploid embryo transfer. *J Assisted Reprod Gen* 2019;36(1):165-72. <https://doi.org/10.1007/s10815-018-1322-2>.
15. Munné S. Origins of mosaicism and criteria for the transfer of mosaic embryos. *Reproductive BioMedicine Online* 2018;36:369-70. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2018.02.002>.
16. Victor AR, et al. One hundred mosaic embryos transferred prospectively in a single clinic: exploring when and why they result in healthy pregnancies. *Fertil Steril* 2019;111(2):280-93. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2018.10.019>.
17. Escudero T, et al. Next generation sequencing (NGS) for preimplantation genetic screening (PGS) discovers mosaicism is independent of age. *Fertil Steril* 2016;105(2):19. <https://doi.org/10.1016/j.fertnstert.2015.12.066>.
18. Chan CW, et al. Impact of maternal age on mosaicism rate in preimplantation embryos. A retrospective study. *Reproductive BioMedicine Online* 2019;38:39-40. <https://doi.org/10.1016/j.rbmo.2019.03.065>.
19. Duncan FE, et al. Chromosome cohesion decreases in human eggs with advanced maternal age. *Aging cell* 2012;11(6):1121-24. <https://doi.org/10.1111/j.1474-9726.2012.00866.x>.