

Resultados clínicos del uso de la hibridación genómica comparativa (CGH) basada en microarreglos de ADN (a-CGH) en fecundación *in vitro*

Rafael Alfonso Sánchez Usabiaga,¹ María Guadalupe Vera Aguado,² Anaïd Batista Espinoza,² Sergio Romero Tovar²

RESUMEN

La mayor parte de los métodos para evaluar la viabilidad embrionaria en fecundación *in vitro* (FIV) se basa en las características morfológicas del embrión en diferentes etapas de desarrollo, lo que destaca una relación poco precisa entre la morfología embrionaria y las aneuploidías. Recientemente, con la hibridación genómica comparativa basada en microarreglos de ADN (a-CGH) se han logrado resultados clínicos favorables, lo que justifica la aplicación de esta técnica en la selección embrionaria. En este artículo se analizan los resultados clínicos del tamizaje genético preimplantacional (PGS, del inglés *preimplantation genetic screening*) durante ciclos de fecundación *in vitro*. Los resultados clínicos después del análisis de los 24 cromosomas mediante a-CGH indicaron un aumento de las tasas de implantación y embarazo, que fueron superiores a la evaluación del número limitado de cromosomas con la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH). La valoración de la biopsia embrionaria utilizando a-CGH ofrece resultados alentadores, ya que incrementa las tasas de implantación y embarazo, lo que incide en la tendencia actual de transferencia de embrión único. Se requieren estudios con asignación al azar más amplios que permitan establecer conclusiones con bases estadísticas firmes.

Palabras clave: diagnóstico genético preimplantacional, tamizaje genético preimplantacional, array-CGC, FISH, FIV.

ABSTRACT

Most methods to assess embryo viability in IVF (*in vitro* fertilization) are based on the morphological characteristics of the embryo at different stages of development, indicating an inaccurate association between embryonic morphology and aneuploidy. Recently, favorable clinical results have been achieved using comparative genomic hybridization based on DNA microarrays (a-CGH), justifying this technique for embryo selection. This paper analyzes the clinical outcome of preimplantation genetic screening (PGS) during IVF cycles. Clinical results after the analysis of the 24 chromosomes by a-CGH showed increased implantation and pregnancy rates, higher than the assessment of the limited number of chromosomes by fluorescence *in situ* hybridization (FISH). Assessment of embryo biopsy using a-CGH provides encouraging results improving implantation and pregnancy rates, providing a response to the current trend in the single-embryo transfer. Larger randomized studies to allow establish conclusions with firm statistical bases are needed.

Key words: preimplantation genetic diagnosis, preimplantation genetic screening, array-CGC, FISH, IVF.

¹ Director general de Médica Fértil.

² Médica Fértil, Querétaro.

Correspondencia: Dr. Rafael Sánchez U. Prolongación Constituyentes 218, colonia El Jacal, CP 76180, Querétaro, Qro. Correo electrónico: rsanchez@medicafertil.com.mx

Recibido: enero, 2013.

Aceptado: marzo, 2013.

Este artículo debe citarse como Sánchez-Usabiaga RA, Vera-Aguado MG, Batista-Espinoza A, Romero-Tovar S. Resultados clínicos del uso de la hibridación genómica comparativa (CGH) basada en microarreglos de ADN (a-CGH) en fecundación *in vitro*. Rev Mex Reprod 2013;5:159-166.

www.nietoeditores.com.mx

Para maximizar el éxito de los tratamientos de fecundación *in vitro* (FIV) se requiere un método confiable de selección de embriones potencialmente viables. En la actualidad, la mayor parte de los métodos de evaluación se basa en la morfología embrionaria, que es una guía limitada para valorar la viabilidad del embrión. Las anomalías cromosómicas son extremadamente comunes en los gametos y embriones humanos, y se vinculan con una variedad de consecuencias reproductivas negativas en los ciclos naturales y en los que se recurre a técnicas de reproducción asistida. El tamizaje genético preim-

plantacional (PGS, del inglés *preimplantation genetic screening*) es un método con el que se busca mejorar los resultados de los tratamientos de fecundación *in vitro*, al asegurarse de que los embriones seleccionados para su transferencia al útero sean cromosómicamente normales.

En Estados Unidos, durante el año 2006, se realizaron aproximadamente 138,198 ciclos de fecundación *in vitro*.¹ Desafortunadamente, sólo 31% de los embriones transferidos llegan al nacimiento de un hijo sano; por tanto, para que el tratamiento sea exitoso en cada ciclo de fecundación *in vitro* es determinante tener información del potencial de implantación de los embriones y consecuentemente del nacimiento de hijos saludables.¹⁻⁴

Existen evidencias que apoyan la correlación entre las tasas de implantación y la morfología embrionaria, por lo que generalmente la transferencia de embriones se realiza con base en esta información;⁵⁻⁷ sin embargo, en estudios recientes se reporta que entre 30 y 40% de los embriones morfológicamente normales tienen alteraciones cromosómicas (aneuploidías).^{8,9} La transferencia de embriones aneuploides casi siempre termina en la falla de implantación,⁸ aborto espontáneo¹⁰⁻¹⁴ o nacimiento de niños con problemas cromosómicos.¹⁵

La nueva generación de técnicas para el tamizaje genético preimplantacional (PGS), como la hibridación genómica comparada (CGH) y los microarreglos (matrices de nucleótidos, a-CGH y polimorfismos de nucleótido único), al igual que la reacción en cadena de polimerasa cuantitativa, permiten el análisis de los 24 cromosomas con alta precisión diagnóstica y resultados clínicos satisfactorios.

Los avances en genética molecular y la vitrificación de embriones, aunados a la bioinformática, marcan el inicio de una nueva era en el tratamiento de la pareja infértil.

En este documento se revisan los resultados clínicos obtenidos al integrar el tamizaje de aneuploidías cromosómicas mediante a-CGH en programas de fecundación *in vitro*. Se muestran los resultados clínicos de estudios con tamizaje genético preimplantacional y se discute la controversia de la importancia del análisis cromosómico como herramienta para la selección de embriones.

TERMINOLOGÍA

El diagnóstico genético preimplantacional (PGD, del inglés *preimplantation genetic diagnosis*) es una técnica de detección de anomalías genéticas o cromosómicas que se lleva a cabo en las diferentes etapas de desarrollo del embrión previo a su transferencia al útero de la mujer. Inició como una alternativa diagnóstica en las parejas en las que uno o ambos miembros son portadores de alguna alteración genética o cromosómica que les impide lograr un embarazo o que aumenta el riesgo de aborto o trastornos en la descendencia. En algunas parejas es la única solución segura para tener descendencia biológica sana.

Una variante del diagnóstico genético preimplantacional es el diseñado para la detección de aneuploidías (PGD-AS, del inglés *preimplantation genetic diagnosis-aneuploidy screening*) o tamizaje genético preimplantacional (PGS), término adoptado para diferenciar esta nueva aplicación en pacientes en los que no se conoce la alteración genética.

En este documento se utilizará el término tamizaje genético preimplantacional, ampliamente difundido en la bibliografía internacional.

TENDENCIA DEL TAMIZAJE GENÉTICO PRE-IMPLANTACIONAL EN LA PRÁCTICA CLÍNICA

La Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología recabó información del diagnóstico genético preimplantacional realizado en diferentes clínicas del todo el mundo.¹⁶ Los resultados publicados por esta organización mostraron 66% de ciclos en los que la indicación fue la detección de aneuploidías; sin embargo, no se ha establecido el número preciso de clínicas que realizan tamizaje genético preimplantacional, aunque los datos sugieren que su aplicación clínica va en aumento.^{16,17}

TÉCNICAS A TRAVÉS DEL TIEMPO

Inicialmente, el objetivo del diagnóstico genético preimplantacional fue identificar embriones en riesgo de transmitir enfermedades hereditarias monogénicas de los padres. Se utilizó por primera vez para la determinación del género en parejas portadoras de enfermedades

ligadas al sexo. En ese caso, la amplificación del ADN se realizó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, del inglés *polymerase chain reaction*) para una secuencia repetida de un gen específico en el cromosoma Y.¹⁸ Una de las limitantes de la PCR fue que, aunque permitía identificar el sexo destacando una secuencia específica de gen único para el cromosoma Y, no proporcionaba mayor información del cromosoma X. Se recurrió a la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH, del inglés *fluorescent in situ hybridization*) para solventar este problema,¹⁹ posteriormente se amplió su uso para incluir cromosomas somáticos. Para el año 1993, Munne y colaboradores efectuaron el primer tamizaje genético preimplantacional, e incluyeron cinco cromosomas identificados mediante la técnica de FISH.¹⁹

Es bien conocido que las alteraciones cromosómicas juegan un papel determinante en la implantación embrionaria durante los ciclos de fecundación *in vitro*, por lo que se planteó la hipótesis de que si se identificaban embriones euploides las posibilidades de embarazo serían mayores; así que el tamizaje genético preimplantacional se utilizó para aumentar las tasas de implantación y nacidos vivos y, a la vez, para disminuir el número de abortos espontáneos en pacientes sin alteraciones genéticas.

Casi al mismo tiempo, Munné y Verlinsky realizaron tamizaje genético preimplantacional con hibridación fluorescente *in situ* en el primer y segundo cuerpos polares.^{20,21} Esta última técnica en embriones se convirtió en algo más común, excepto en los países donde no se permitía por políticas locales. Las primeras pruebas clínicas en embriones mostraron mayores tasas de implantación y de embarazos en curso, así como menor número de abortos espontáneos;²²⁻²⁷ sin embargo, su uso es todavía motivo de controversia, porque las investigaciones para validarlo requieren estudios con asignación al azar que apoyen su valor estadístico.

Conforme el medio de cultivo favoreció el crecimiento de los embriones a etapa de blastocisto, el tamizaje genético preimplantacional permitió estudiar las células del trofoectodermo.²⁸

En la etapa de blastocisto es posible extraer varias células, ya sea para analizarlas mediante la técnica FISH o CGH, a diferencia del estadio de división, en el que pueden extraerse una o dos células.^{28,29}

McArthur y colaboradores, en 2005, reportaron el uso rutinario de biopsia de blastocisto para su estudio preimplantación mediante hibridación fluorescente *in situ*, que elevó las posibilidades de embarazo y de nacidos vivos.

Recientemente, la tendencia a la transferencia electiva de un solo embrión ha ido en aumento, con la subsecuente disminución del número de embarazos múltiples, considerado factor principal en los tratamientos de fecundación *in vitro*.³⁰⁻³²

Una de las complicaciones del embarazo múltiple es la prematuridad, con el consecuente riesgo de bajo peso al nacer, retraso en el desarrollo, parálisis cerebral y malformaciones congénitas.^{33,34}

La probabilidad de prematuridad aumenta con la transferencia de un mayor número de embriones, situación dada para incrementar las posibilidades de embarazo en pacientes con mal pronóstico reproductivo. La transferencia electiva de un embrión identificado por su buena calidad es ideal para evitar los embarazos múltiples. Los embriones de buena calidad tienen mayor probabilidad de llegar a un embarazo a término, con el nacimiento de un niño saludable.³⁵

Indicaciones para el tamizaje genético preimplantacional

Las principales indicaciones se enlistan en el Cuadro 1. La frecuencia de aneuploidías es mayor en mujeres de edad avanzada y pérdida repetida de la gestación. Otras indicaciones han sido los antecedentes de trisomías en embarazos previos,³⁶ factor masculino severo^{37,38} y donación de óvulos.³⁹

Hoy en día, el tamizaje genético preimplantacional se aplica a pacientes con buen pronóstico con el propósito de mejorar las posibilidades de embarazo mediante la transferencia de embrión único seleccionado.

Cuadro 1. Indicaciones para realizar tamizaje genético preimplantacional

Edad materna avanzada
Fallo repetido de implantación
Pérdida repetida de la gestación
Embarazo previo con aneuploidía
Factor masculino
Infertilidad de origen desconocido
Transferencia de embrión único

Evaluación de los 24 cromosomas

Se han desarrollado diferentes métodos para el análisis de los 24 cromosomas, denominados bajo el concepto general de evaluación completa de los cromosomas (CCS, del inglés *complete chromosome screening*).

En los primeros estudios publicados se utilizó la hibridación genómica comparativa en ovocitos metafase II,⁴⁰ embriones en división (tercer día)^{41,42} y blastocisto.⁴³

Posteriormente, se desarrollaron nuevas tecnologías con las que se obtuvieron resultados en periodos más cortos. La hibridación genómica comparativa basada en microarreglos de ADN,⁴⁴⁻⁴⁸ microarreglos de polimorfismos de nucleótido único (SNP),^{49,50} así como técnicas de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR).⁵¹ La primera aplicación clínica de array-CGH en célula única⁵² reveló que era la técnica de elección debido a su eficiencia, nivel de detección y menor tiempo para entrega de resultados.

En una revisión reciente publicada por Simpson y su grupo (2012) se encontró que el array-CGH fue el método preferido para el diagnóstico de aneuploidías de los 24 cromosomas, lo que motivó a los centros de fecundación *in vitro* a realizar el tamizaje genético preimplantacional mediante esta tecnología.⁵³

Tamizaje genético preimplantacional utilizando a-CGH

Con base en la tecnología de array-CGH, se tomó biopsia del cuerpo polar en grupos piloto^{54,55} para confirmar su utilidad en pacientes de edad materna avanzada. El grupo de la Sociedad Europea de Reproducción Humana y Embriología encontró, incluso, 76% de aneuploidías en la biopsia del cuerpo polar, con discrepancia de 6% entre los resultados del estudio y la correspondiente al cigoto, con lo que se alcanzó una tasa de embarazo de 30% por transferencia de embriones.^{54,55}

Persisten algunas preocupaciones en cuanto a la fiabilidad lograda mediante el tamizaje del cuerpo polar, lo que pone en tela de juicio sus resultados en los tratamientos de fecundación *in vitro*.^{56,57} Los errores meióticos paternos y el resto de alteraciones meióticas pueden pasar inadvertidas en la biopsia del cuerpo polar.

En cuanto a la biopsia de embriones en división, su utilidad es motivo de controversia debido al mosaicis-

mo en embriones de tercer día; sin embargo, Hellani y su grupo reportaron una tasa alta de embriones aneuploides, con 60% de anomalías cromosómicas no incluidas en los procedimientos de hibridación fluorescente *in situ*, y con cinco de ocho pacientes con embarazo viable.⁵⁸

El Instituto Valenciano de Infertilidad, en un estudio retrospectivo en el que se incluyeron 556 ciclos de tamizaje genético preimplantacional utilizando a-CGH en mujeres con pérdida repetida de la gestación, fallo repetido de implantación, factor masculino severo y edad materna avanzada, registró 73.5% de embriones aneuploides, tasas de embarazo de entre 55.5 y 72% en pacientes con factor masculino severo y tasas de implantación de 47.2 a 59% para las diferentes indicaciones en mujeres de edad avanzada.⁵⁹

La controversia de la biopsia en el día 3 tiene que ver principalmente con estudios en donde se utilizó la técnica de hibridación fluorescente *in situ*, en los que la fijación del núcleo pudo haber fallado y, por tanto, la interpretación diagnóstica pudo llevar a sobreestimar el número de embriones aneuploides que no se confirmaron en etapa de blastocisto; sin embargo, en un estudio previo con FISH y biopsia en día 3 se reportó una correlación elevada entre la biopsia de tercer día de una sola blastómera y el análisis en blastocisto.⁶⁰ Estas altas tasas de correlación se atribuyen a la debida fijación e interpretación con doble control para determinados cromosomas. La doble verificación se realizó con sondas adicionales (subteloméricas o locus específicos para determinados cromosomas) para los cromosomas sobre los que se tenían dudas, lo que disminuyó el porcentaje de embriones sin resultado y el riesgo de falla diagnóstica de monosomías debido a la falta de señales. Además, en este estudio la validación de la tecnología de microarreglos de CGH en el día 3 en una sola blastómera logró una correlación alta entre los embriones de tercer día y el blastocisto.⁶¹

Con los array-CGH con biopsia de trofotodermo, Wells y colaboradores encontraron una tasa de embarazo de 66.7% en comparación con la de las pacientes a quienes no se les realizó el estudio de tamizaje genético preimplantacional, con 27.9%.⁶² A partir de esa publicación, la tendencia hacia biopsia de blastocisto aumentó.⁶³⁻⁶⁵

Es importante destacar dos estudios con asignación al azar recientemente publicados: uno de ellos incluyó mujeres infértiles mayores de 35 años a quienes se les practicó biopsia de trofotodermo y vitrificación de embriones. La transferencia de embriones se hizo en un ciclo posterior, con lo que se logró un aumento significativo de las tasas de embarazo, con actividad cardíaca de 60.8% comparado contra 40.9% en el grupo control con transferencia de blastocisto en fresco.⁶⁵ En el segundo estudio, se analizó un grupo de pacientes con buen pronóstico, a quienes se les efectuó biopsia de trofotodermo para tamizaje genético preimplantacional y en otro se llevó a cabo transferencia de día 5 de un solo embrión; la tasa de embarazo fue de 69.1% en las mujeres con tamizaje genético preimplantacional y de 41.7% en el grupo control.⁶⁶ En este estudio se mostraron las limitaciones de la transferencia de un solo embrión cuando la viabilidad de este último se valoró por su morfología únicamente, incluso en pacientes con bajo riesgo de aneuploidías. En el grupo de tamizaje genético preimplantacional, las tasas de embarazo fueron mayores; además, el número de abortos espontáneos fue menor que en el grupo control.⁶⁶

Así mismo, Scott y su grupo⁶⁷ realizaron dos estudios prospectivos doble ciego para evaluar el valor predictivo del tamizaje de aneuploidías en los resultados en la práctica clínica. En uno de ellos se hizo ADN *finger-print* y tamizaje de aneuploidías en 225 pacientes con fecundación *in vitro*, transfiriendo los embriones sin conocer los resultados de aneuploidías. El tamizaje genético preimplantacional fue altamente predictivo de los resultados clínicos, con 96% de embriones aneuploides fallidos en la implantación y 41% de implantación en embriones euploides.⁶⁷

Transferencia de un solo embrión

La tasa de embarazo durante un ciclo de fecundación *in vitro* generalmente sigue siendo baja, por lo que la transferencia de embrión único es poco utilizada como estrategia para disminuir el riesgo de embarazos múltiples, situación que obliga a mejorar las técnicas para la selección de embriones viables.⁶⁸ Se demostró que al integrar las nuevas tecnologías de a-CGH para detectar aneuploidías durante los ciclos de fecundación *in vitro* se elevan significativamente las tasas de embarazo en

mujeres con buen pronóstico. La alta frecuencia de aneuploidías (44.9%) en los blastocistos analizados destaca la imprecisión de seleccionar los embriones únicamente mediante su morfología. El grupo al que se le efectuó tamizaje genético preimplantacional tuvo una tasa de embarazo más alta (69.1%, ≥ 20 semanas de embarazo), que el grupo control (41%, ≥ 20 semanas de embarazo), además, el número de abortos fue menor (2.6%) en los blastocistos seleccionados mediante a-CGH que en el grupo control (9.1%).

Vitrificación de embriones

Hoy en día, para mejorar la receptividad uterina y aumentar las tasas de implantación se tiende a realizar biopsia de blastocisto y su vitrificación para una posterior transferencia en ciclo no estimulado.⁶⁹ La combinación de biopsia de trofotodermo, el análisis de aneuploidías de los 24 cromosomas mediante a-CGH y la vitrificación para transferencia contribuyó a aumentar las tasas de implantación y de recién nacidos sanos en tratamientos de fecundación *in vitro*. Estos resultados reflejan el beneficio del tamizaje genético preimplantacional durante ciclos de reproducción asistida.

Durante un ciclo de fecundación *in vitro*, los embriones no transferidos generalmente se seleccionan bajo criterios morfológicos para su criopreservación. La incorporación de a-CGH para elegir los embriones potencialmente viables disminuyó significativamente el número de embriones a criopreservar, por lo que deberá informarse a los pacientes de estos beneficios.⁷⁰

En un estudio retrospectivo publicado recientemente por Shapiro y colaboradores⁷¹ se comparó la incidencia de embarazo ectópico con transferencia de blastocistos en fresco o ciclos de óvulos vitrificados-descongelados. De 2,150 blastocistos autólogos transferidos, 1,460 fueron en fresco y 690 derivaron de óvulos en metafase II descongelados, fecundados y llevados al día 5 para su transferencia. La tasa de embarazos ectópicos fue de 1.5% en ciclos en fresco, significativamente mayor a 0 en el grupo de vitrificados; asimismo, la tasa de embarazos de localización no determinada fue de 2.5 en ciclos en fresco contra 0.3% en el grupo control, resultado estadísticamente significativo (riesgo relativo 7.3, intervalo de confianza de 95% de 1.7 a 31.0). Esto concuerda con la mayor incidencia de embarazo ectópico en ciclos estimulados para fecundación

in vitro, y se encontró menor incidencia en el grupo en el que la transferencia tuvo lugar en un ciclo posterior. Esta información destaca la importancia de contar con un adecuado programa de vitrificación de óvulos y embriones para alcanzar resultados reproductivos favorables en los tratamientos de fecundación *in vitro*.

CONCLUSIONES

Además de la morfología, el tamizaje genético preimplantacional es el único estudio clínicamente disponible que proporciona información potencialmente útil de la viabilidad del embrión.

Los resultados clínicos del análisis de los 24 cromosomas mediante a-CGH muestran elevación de las tasas de implantación y embarazo, y disminución del número de abortos espontáneos, superando así los métodos previos, como la hibridación fluorescente *in situ*, en los que el número de cromosomas evaluado es limitado.

En cuanto a la controversia sobre la biopsia de tercer día, la mayor parte de los datos proviene de la hibridación fluorescente *in situ*, por lo que los a-CGH deberán estudiarse en protocolos controlados con distribución al azar. La tendencia actual de realizar tamizaje genético preimplantacional y biopsia de trofotodermo con transferencia de embriones en fresco o vitrificarlos para posteriormente transferirlos en ciclos no estimulados ha mostrado resultados reproductivos favorables; sin embargo, se requiere realizar un mayor número de estudios controlados con distribución al azar que permitan evaluar y validar las diferentes plataformas de tamizaje genético preimplantacional, el día para realizar la biopsia embrionaria y la transferencia en ciclo estimulado o su vitrificación, con lo que se justifica el uso de tamizaje genético preimplantacional en la práctica clínica para la transferencia de un solo embrión.

REFERENCIAS

- Centers for Disease Control and Prevention, American Society for Reproductive Medicine. 2006 Assisted Reproductive Technology Success Rates: National Summary and Fertility Clinic Reports. Atlanta: Department of Health and Human Services, Centers for Disease Control and Prevention, 2008.
- Sermon K, van Steirteghem A, Liebaers I. Preimplantation genetic diagnosis. *Lancet* 2004;363:1633-1641.
- Thornhill AR, deDie Smulders CE, Geraedts JP, Harper JC, et al. ESHRE PGD consortium best practice guidelines for clinical preimplantation genetic diagnosis (PGD) and preimplantation genetic screening (PGS). *Hum Reprod* 2005;20:35-48.
- Verlinsky Y, Tur-Kaspa I, Cieslak J, Bernal A, et al. Preimplantation testing for chromosomal disorders improves reproductive outcome of poor-prognosis patients. *Reprod BioMed Online* 2005;11:219-225.
- Hardarson T, Hanson C, Sjogren A, Lundin K. Human embryos with unevenly sized blastomeres have lower pregnancy and implantation rates: indications for aneuploidy and multinucleation. *Hum Reprod* 2001;16:313-318.
- Borini A, Lagalla C, Cattoli M, Sereni E, et al. Predictive factors for embryo implantation potential. *Reprod BioMed Online* 2005;10:653-668.
- Nomura M, Iwase A, Furui K, Kitagawa T, et al. Preferable correlation to blastocyst development and pregnancy rates with a new embryo grading system specific for day 3 embryos. *J Assist Reprod Genet* 2007;24:23-28.
- Munné S. Preimplantation genetic diagnosis and human implantation. A review. *Placenta* 2003;24:S70-S76.
- Baltaci V, Satioglu H, Kabukcu C, Unsal E, et al. Relationship between embryo quality and aneuploidies. *Reprod BioMed Online* 2006;12:77-82.
- Warburton D, Kline J, Stein Z. Cytogenetic abnormalities in spontaneous abortions of recognized conceptions. *Perinatal genetics: diagnosis and treatment*. New York: Academic Press, 1986.
- Munné S, Magli C, Bahce M, Fung J. Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: XY, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat Diagn* 1998;18:1459-1466.
- Sarosi C, Schwartz LB, Lublin J. Chromosomal analysis of early fetal losses in relation to transvaginal ultrasonographic detection of fetal heart motion after infertility. *Fertil Steril* 1998;69:274-277.
- Vidal F, Gimenez C, Rubio C, Simon C, et al. FISH preimplantation diagnosis of chromosome aneuploidy in recurrent pregnancy wastage. *J Assist Reprod Genet* 1998;15:310-313.
- Pellicer A, Rubio C, Vidal F, Minguez Y, et al. *In vitro* fertilization plus preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent miscarriage: an analysis of chromosome abnormalities in human preimplantation embryos. *Fertil Steril* 1999;71:1033-1039.
- Kuliev A, Cieslak J, Ilkevitch Y, Verlinsky Y. Chromosomal abnormalities in a series of 6733 human oocytes in preimplantation diagnosis for age-related aneuploidies. *Reprod BioMed Online* 2003;6:54-59.
- Baruch S, Kaufman D, Hudson KL. Genetic testing of embryos: practices and perspectives of US *in vitro* fertilization clinics. *Fertil Steril* 2008;89:1053-1058.
- van Rij MC, Goossens V. ESHRE PGD consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow up to October 2007. *Hum Reprod* 2009;24:1786-1810.
- Handyside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RM. Pregnancies from biopsied human preimplantation em-

- bryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature* 1990;344:768-770.
19. Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod* 1993;8:2185-2191.
20. Munné S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J. The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod* 1995;10:1014-1020.
21. Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Lifchez A, et al. Birth of healthy children after preimplantation diagnosis of common aneuploidies by polar body fluorescent *in situ* hybridization analysis. Preimplantation Genetics Group. *Fertil Steril* 1996;66:126-129.
22. Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, et al. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online* 2003;7:91-97.
23. Munné S, Chen S, Fischer J, Colls P, et al. Preimplantation genetic diagnosis reduces pregnancy loss in women aged 35 years and older with a history of recurrent miscarriages. *Fertil Steril* 2005;84:331-335.
24. 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;72:837-844.
25. Munné S, Magli MC, Cohen J. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Hum Reprod* 1999;14:2191-2199.
26. Munné S, Fischer J, Chen S, Warner A, et al. Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss in infertile couples: a multicenter study. *Fertil Steril* 2006;85:326-332.
27. Colls P, Escudero T, Cekleniak N, Sadowy S, et al. Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using "no result rescue". *Fertil Steril* 2007;88:53-61.
28. McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, Gee AJ, et al. Pregnancies and live births after trophectoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil Steril* 2005;84:1628-1636.
29. Schoolcraft WB, Fragouli L, Stevens J, Munné S, et al. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2009[Epub ahead of print].
30. Adamson D, Baker V. Multiple births from assisted reproductive technologies: a challenge that must be met. *Fertil Steril* 2004;81:517-522.
31. Tiitinen A, Halttunen M, Härkki P, Vuoristo P. Elective single embryo transfer: the value of cryopreservation. *Hum Reprod* 2001;16:1140-1144.
32. Leese B, Denton J. Attitudes towards single embryo transfer, twin and higher order pregnancies in patients undergoing infertility treatment: a review. *Hum Fertil (Camb)* 2010;13:28-34.
33. Pinborg A, Loft A, Schmidt L, Andersen A. Morbidity in a Danish national cohort of 472 IVF/ICSI twins, 1132 non-IVF/ICSI twins and 634 IVF/ICSI singletons: health-related and social implications for the children and their families. *Hum Reprod* 2003;18:1234-1243.
34. Stromberg B, Dahlquist G, Ericson A, Finnström O, et al. Neurological sequelae in children born after *in vitro* fertilisation: a population-based study. *Lancet* 2002;359:461-465.
35. Gelbaya TA, Tsoumpou I, Nardo LG. The likelihood of live birth and multiple birth after single *versus* double embryo transfer at the cleavage stage: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril* 2009;94:936-945.
36. Munné S, Bahce M, Sandalinas M, Escudero T, et al. Differences in chromosome susceptibility to aneuploidy and survival to first trimester. *Reprod Biomed Online* 2004;8:81-90.
37. Silber S, Escudero T, Lenahan K, Abdelhadi I, et al. Chromosomal abnormalities in embryos derived from testicular sperm extraction. *Fertil Steril* 2003;79:30-38.
38. Donoso P, Platteau P, Papanicolaou EG, Staessen C, et al. Does PGD for aneuploidy screening change the selection of embryos derived from testicular sperm extraction in obstructive and non-obstructive azoospermic men? *Hum Reprod* 2006;21:2390-2395.
39. Munné S, Ary J, Zouves C, Escudero T, et al. Wide range of chromosome abnormalities in the embryos of young egg donors. *Reprod Biomed Online* 2006;12:340-346.
40. Fragouli E, Wells D, Whalley KM, Mills JA, et al. Increased susceptibility to maternal aneuploidy demonstrated by comparative genomic hybridization analysis of human MI oocytes and first polar bodies. *Cytogenet Genome Res* 2006;114:30-38.
41. 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;80:860-868.
42. Voullaire L, Collins V, Callaghan T, McBain J, et al. High incidence of complex chromosome abnormality in cleavage embryos from patients with repeated implantation failure. *Fertil Steril* 2007;87:1053-1058.
43. Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munné S, et al. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril* 2010;94:1700-1706.
44. leCaignec C, Spits C, Sermon K, de Rycke M, et al. Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. *Nucleic Acids Res* 2006;34:e68.
45. Hellani A, Abu-Amro K, Azouri J, El-Akoum S. Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *RBM Online* 2008;17:841-847.
46. Wells D, Alfarawati S, Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod* 2008;14:703-710.
47. Fishel S, Gordon A, Lynch C, Dowell K, et al. Live birth after polar body array comparative genomic hybridization prediction of embryo ploidy-the future of IVF? *Fertil Steril* 2010;93:1006.e7-10.
48. Mir P, Rodrigo L, Mercader A, Buendía P, et al. False positive rate of an array CGH platform for single-cell preimplantation genetic screening and subsequent clinical application on day-3. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:143-149.

49. Schoolcraft WB, Surrey E, Minjarez D, Gustofson RL, et al. Comprehensive chromosome screening (CCS) with vitrification results in improved clinical outcome in women >35 years: a randomized control trial. *Fertil Steril* 2012;98:S1.
50. Johnson DS, Gemelos G, Baner J, Ryan A, et al. Preclinical validation of a microarray method for full molecular karyotyping of blastomeres in a 24-h protocol. *Hum Reprod* 2010;25:1066-1075.
51. Treff NR, Tao X, Ferry KM, Su J, et al. Development and validation of an accurate quantitative real-time polymerase chain reaction-based assay for human blastocyst comprehensive chromosomal aneuploidy screening. *Fertil Steril* 2012;97:819-824.
52. leCaignec C, Spits C, Sermon K, de Rycke M, et al. Single-cell chromosomal imbalances detection by array CGH. *Nucleic Acids Res* 2006;34:e68.
53. Simpson JL. Preimplantation genetic diagnosis to improve pregnancy outcomes in subfertility. *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol* 2012;26:805-815.
54. Magli MC, Montag M, Muzi L, Geraedts J, et al. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part II: technical aspects. *Hum Reprod* 2011;26:3181-3185.
55. Geraedts J, Montag M, Magli MC, Repping S, et al. Polar body array CGH for prediction of the status of the corresponding oocyte. Part I: clinical results. *Hum Reprod* 2011;26:3173-3180.
56. Scriven PN, Ogilvie CM, Khalaf Y. Embryo selection in IVF: is polar body array comparative genomic hybridization accurate enough? *Hum Reprod* 2012;4:951-953.
57. Capalbo A, Bono S, Spizzichino L, Biricik A, et al. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. *Hum Reprod* 2013;28:509-518.
58. Hellani A, Abu-Amro K, Azouri J, El-Akoum S. Successful pregnancies after application of array-comparative genomic hybridization in PGS-aneuploidy screening. *RBM Online* 2008;17:841-847.
59. Rubio C, Rodrigo L, Mir P, Mateu E, et al. Use of array comparative genomic hybridization (array-CGH) for embryo assessment: clinical results. *Fertil Steril* 2013;99:1044-1048.
60. Mir P, Rodrigo L, Mateu E, Peinado V, et al. Improving FISH diagnosis for preimplantation genetic aneuploidy screening. *Hum Reprod* 2010;25:1812-1877.
61. Mir P, Rodrigo L, Mercader A, Buendía P, et al. False positive rate of an array CGH platform for single-cell preimplantation genetic screening and subsequent clinical application on day-3. *J Assist Reprod Genet* 2013;30:143-149.
62. Wells D, Alfarawati S, Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod* 2008;14:703-710.
63. Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet* 2012;5:24-29.
64. Capalbo A, Bono S, Spizzichino L, Biricik A, et al. Sequential comprehensive chromosome analysis on polar bodies, blastomeres and trophoblast: insights into female meiotic errors and chromosomal segregation in the preimplantation window of embryo development. *Hum Reprod* 2013;28:509-518.
65. Schoolcraft WB, Surrey E, Minjarez D, Gustofson RL, et al. Comprehensive chromosome screening (CCS) with vitrification results in improved clinical outcome in women >35 years: a randomized control trial. *Fertil Steril* 2012;98:S1.
66. Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet* 2012;5:24-29.
67. Scott RT Jr, Ferry K, Su J, Tao X, et al. Comprehensive chromosome screening is highly predictive of the reproductive potential of human embryos: a prospective, blinded, nonselection study. *Fertil Steril* 2012;9:870-875.
68. Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, et al. Selection of single blastocysts for fresh transfer via standard morphology assessment alone and with array CGH for good prognosis IVF patients: results from a randomized pilot study. *Mol Cytogenet* 2012;5:24-29.
69. Schoolcraft WB, Surrey E, Minjarez D, Gustofson RL, et al. Comprehensive chromosome screening (CCS) with vitrification results in improved clinical outcome in women >35 years: a randomized control trial. *Fertil Steril* 2012;98:S1.
70. Liu J, Sills ES, Yang Z, Salem SA, et al. Impact of aCGH on human embryo cryopreservation yield array comparative genomic hybridization screening in IVF significantly reduces number of embryos available for cryopreservation. *Clin Exp Reprod Med* 2012;39:52-57.
71. Shapiro BS, Daneshmand ST, de Leon L, Garner FC, et al. Frozen-thawed embryo transfer is associated with a significantly reduced incidence of ectopic pregnancy. *Fertil Steril* 2012;98:1490-1494.