



Reprodução & Climatério

<http://www.sbrh.org.br/revista>



Artigo de revisão

O uso do diagnóstico genético pré-implantacional em pacientes com aborto de repetição: revisão do uso da técnica de array-CGH[☆]

Felipe de Melo Prajante^{a,*} e Newton Eduardo Busso^{a,b}

^a Projeto Alfa - Infertilidade Conjugal e Reprodução Assistida, São Paulo, SP, Brasil

^b Departamento de Ginecologia e Obstetrícia, Faculdade de Ciências Médica da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 20 de maio de 2013

Aceito em 27 de maio de 2013

On-line em 6 de agosto de 2013

Palavras-chave:

Técnicas reprodutivas

Diagnóstico pré-implantação

Fertilização in vitro

Aborto habitual

Hibridização genômica comparativa

R E S U M O

Tendo em vista a grande frequência de alterações cromossômicas, seja nos casais com quadros de abortamento de repetição ou nos fetos abortados, uma possibilidade para o tratamento para esses pacientes seria o uso de tratamentos de reprodução assistida, associados ao diagnóstico genético pré-implantacional (PGD) com a técnica de hibridização genética comparativa por array (array-CGH), para a transferência apenas de embriões geneticamente normais. O objetivo desta revisão é avaliar se é possível melhorar o prognóstico gestacional, com redução do número de perdas e o do tempo para conseguir uma gestação saudável, desses casais com aborto de repetição ao usarem o PGD por array-CGH. Foram executadas duas revisões bibliográficas dos últimos 10 anos, a primeira relacionando o uso do PGD nos casos de aborto de repetição e a outra com o uso do array-CGH e PGD. A literatura, apesar de discordante quanto à real eficácia do PGD nos casos de aborto de repetição, tende a se mostrar favorável ao uso dessa técnica, da mesma forma que o método de *fluorescence in situ hybridization* (Fish) é inferior a array-CGH para o PGD. Dessa forma, apesar de ser uma técnica promissora para casais com AR, o PGD com array-CGH necessita de mais estudos que comprovem sua real eficácia.

© 2013 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Publicado por Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de [CC BY-NC-ND](#)

The use of preimplantation genetic diagnosis in patients with recurrent abortion: a review of the technique of array-CGH

A B S T R A C T

Given the high frequency of chromosomal abnormalities, either in couples with recurrent miscarriage or in aborted fetuses, a possibility for treatment for these patients is the use of assisted reproduction treatment, associated with preimplantation genetic diagnosis (PGD) with technique by array comparative genomic hybridization (array-CGH), to transfer only

Keywords:

Reproductive techniques

Preimplantation diagnosis

Fertilization in vitro

[☆] Trabalho feito no Projeto Alfa, São Paulo, SP, Brasil.

* Autor para correspondência: Rua Marcelino Champagnat, 300, Zona 02, Maringá, PR, 83511-110, Brasil.

E-mail: felipeprajante@gmail.com (F.d.M. Prajante).

Habitual abortion
Comparative genomic
hybridization

genetically normal embryos. The aim of this review is to assess the feasibility of improving the prognosis of pregnancy, reducing the number of losses and the time to achieve a healthy pregnancy, for couples with recurrent abortion when using PGD with array-CGH. Two literature reviews were performed for the last 10 years, the first relating the use of PGD and recurrent miscarriage, and the other using the array-CGH and PGD. The literature, although discordant about the real efficacy of PGD in cases of recurrent abortion, tends to show favorable to use this technique, just as the method of array-CGH shows to be better than Fish (fluorescence *in-situ* hybridization) for PGD. Thus, despite of being a promising technique for couples with RA, the use of PGD with array-CGH needs more study to prove its actual effectiveness.

© 2013 Sociedade Brasileira de Reprodução Humana. Published by Elsevier Editora Ltda.

Este é um artigo Open Access sob a licença de CC BY-NC-ND

Introdução

O termo aborto espontâneo, apesar de apresentar diversas definições na literatura, significa, segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o término da gestação antes de 20 semanas ou cujo feto apresente menos do que 500 g.¹ Essa complicação gestacional, além de ocorrer em 15% a 20% de todas as gestações clinicamente reconhecidas, está associada à considerável morbidade física e psicológica.² Diferentemente do aborto espontâneo, o quadro de aborto de repetição (AR) é definido como a perda de duas ou mais gestações clínicas.¹ Estima-se que menos de 5% das mulheres irão apresentar dois abortamentos consecutivos e apenas 1% apresentará três ou mais.³

Classicamente, os fatores associados à ocorrência do AR incluem causas genéticas, fatores anatômicos, como a síndrome de Asherman, leiomiomas uterinos, pólipos endometriais, incompetência istmo-cervical e defeitos de desenvolvimento uterino (útero bicornio, útero septado e útero didelfo), e fatores endócrinos, como a síndrome dos ovários policísticos, autoimunes e a síndrome de anticorpo antifosfolípide (SAAF).^{4,5} Apesar de avaliação completa, em aproximadamente 40% dos casais com história de AR não é identificada a causa, sendo classificados como aborto de repetição idiopático.^{3,6,7}

O óbito embrionário pode ser decorrente de duas causas principais, malformações estruturais e aberrações cromossômicas. Dos abortos espontâneos, 50% a 60% são consequências de aberrações cromossômicas.⁸ Tanto Stern et al. (1996) quanto Ogasawara et al. (2000) mostram que 50% a 60% dos fetos abortados são cromossomicamente anormais em mulheres com dois ou mais abortamentos, com número médio de abortamentos de 3,8 e 3,5, respectivamente.^{9,10} Carp et al. (2001) revelam incidência de 29% em mulheres com três ou mais abortamentos, média de 4,7.¹¹ Ferro et al. (2003) usaram a histeroembrioscopia para biopsiar o córion fetal para feitura de estudo genético e encontraram anormalidades cromossômicas em 37 (67,3%) das 55 biópsias feitas em mulheres com dois ou mais abortamentos.¹²

Ogasawara et al. (2000) mostraram em pequena amostra de 10 pacientes portadoras de síndrome antifosfolípide que 40% das perdas embrionárias apresentavam aberrações cromossômicas.¹⁰ Posteriormente, Carp et al. (2003) encontraram quatro casos de alterações cromossômicas em 16 embriões de pacientes com trombofilias hereditárias.¹³

Estima-se que um em cada 625 indivíduos seja carreador de translocações cromossômicas balanceadas. Em casais com AR, essa incidência é de aproximadamente 4% a 5% e inclui, principalmente, translocações recíprocas e translocações robertsonianas.¹⁴ Carreadores de translocações balanceadas apresentam risco de aumento de infertilidade e abortamento, além de nascidos vivos com anomalias congênitas e retardo mental decorrente da segregação desbalanceada.¹⁵

Tendo em vista diversas publicações que mostram a grande frequência de alterações cromossômicas, seja nos casais com quadros de abortamento de repetição ou nos fetos abortados, uma possibilidade para o tratamento seria o uso de reprodução assistida associada ao diagnóstico genético pré-implantacional (PGD), o que permite a seleção e transferência apenas dos embriões geneticamente normais.^{16,17}

Os métodos de avaliação genética pré-implantacional vêm passando por diversas mudanças nos últimos anos. Inicialmente, a pesquisa de translocações cromossômicas era feita por meio da *fluorescence in-situ hybridization* (Fish), a qual envolve o uso de sondas de pintura para cromossomos metafásicos de corpos polares. Suas principais deficiências são a análise limitada do número de cromossomos e os elevados custo e tempo necessário para a confecção da sonda específica. Ele permite a diferenciação de embriões normais dos embriões com translocações balanceadas ou desbalanceadas.¹⁵ O método de Fish é tecnicamente difícil na fixação dos blastômeros. Diversos inconvenientes, como a falha na hibridização, sobreposição dos sinais e sua separação, podem afetar a acurácia na interpretação do teste. Os valores preditivos positivo e negativo para esse método são de 83% e 81%, respectivamente.^{18,20} Resultados falsos podem levar à eliminação de embriões normais ou balanceados ou, ainda, à transferência de embriões anormais.¹⁵

Apesar de a Fish permitir a identificação de aneuploidias, essas serão restritas a alguns cromossomos específicos. Na tentativa de corrigir as deficiências e dificuldades técnicas desse método, além de possibilitar a avaliação dos 23 pares de cromossomos, surgiu a hibridização genômica comparativa por *array* (array-CGH).^{15,19,20} Fiorentino et al. (2011) relataram em 28 ciclos de PGD para translocações cromossômicas com o uso de embriões em estágio de clivagem elevada taxa de sucesso diagnóstico (93%). Os embriões foram adequados para transferência em 60% dos ciclos iniciados e taxa de gestação de 70% foi alcançada.¹⁵

Na análise de ambas as técnicas de avaliação genética, o *array*-CGH deve substituir o método de Fish para PGD, pois oferece alta acurácia diagnóstica, de 95 a 99%, e permite taxas de gestação de 20% a 60%, a depender da indicação do tratamento e da idade da paciente.¹⁵

Diante de tais fatos, a presente revisão avalia se é possível melhorar o prognóstico gestacional, com redução do número de perdas e o do tempo para conseguir uma gestação saudável, de casais com quadro de abortamento de repetição ao serem submetidos às técnicas de fertilização *in vitro* e diagnóstico genético pré-implantacional (PGD) pelo *array*-CGH.

Método

Em revisão sistemática dos últimos 10 anos por meio das bases de dados PubMed e The Cochrane Library, com o uso das palavras-chave *miscarriage*, *recurrent abortion*, *array*-CGH e *preimplantation genetic diagnosis* (PGD), foram feitas duas revisões separadamente. A primeira relacionou o uso do PGD aos casos de aborto de repetição e a segunda usou o *array*-CGH e o PGD. Para a seleção dos artigos, a definição de aborto de repetição usada foi a perda de duas ou mais gestações clínicas antes de 20 semanas gestacionais ou cujo feto apresente menos do que 500 g.

Resultados

Durante o levantamento bibliográfico dos últimos 10 anos foram encontrados 41 artigos que relacionam aborto de repetição e o diagnóstico genético pré-implantacional (PGD) e nenhum usava a técnica de *array*-CGH. Dos 41 artigos, apenas 15 relacionavam diretamente o uso do PGD como possível tratamento para casais com diagnóstico de aborto de repetição.

Apesar de o uso do PGD para pacientes com quadro de abortamento de repetição ainda ser um tema discutível, dos 15 trabalhos analisados, apenas dois mostraram que o uso dessa técnica não aumenta a taxas de nascidos vivos para esse grupo de casais.

Franssen et al. (2011), em revisão sistemática pelas bases de dados Medline, Embase e Cochrane até abril de 2009, buscaram as taxas de nascidos vivos e abortamento após gestação natural e fertilização *in vitro* (FIV) associados ao PGD de casais com história de aborto de repetição que apresentassem uma anomalia cromossômica estrutural. Foram encontrados 164 casais submetidos ao PGD por anomalias cromossômicas estruturais, dos quais 126 apresentavam dois ou mais abortamentos prévios. Os resultados mostraram que durante os casos de gestação natural a taxa de nascidos vivos variou de 33% a 60% (média de 55,5%) e de abortamento de 21% a 40% (média de 34%). Já no grupo submetido ao PGD, a taxa de nascidos vivos por casal foi de zero a 100% (média de 31%) após a análise dos cromossomos paternos, enquanto que a taxa de abortamento foi de zero a 50%, após a mesma análise. Dessa forma, os dados revisados são insuficientes para a indicação do uso do PGD com o objetivo de aumentar as taxas de nascimento em casais com abortamento de repetição que sejam portadores de alguma anomalia cromossômica estrutural.²¹

Por outro lado, Fisher et al. (2010), em revisão sistemática de dados, analisaram 192 pacientes com história de AR

submetidos ao PGD por translocações recíprocas ou robertsonianas. Os resultados obtidos evidenciaram a redução de 88,5% para 13% nas taxas de abortamento para os casais após o PGD. A taxa de gestação foi de 87% e a concepção ocorreu após a média de 1,4 ciclo ou em menos de quatro meses. Assim sendo, indivíduos com translocações que apresentem abortos de repetição são beneficiados pelo uso do PGD, por redução significativa nas taxas de abortamento, melhoria nas taxas de sucesso de gravidez e redução no tempo necessário para engravidar.²² Keymolen et al. (2009) analisaram retrospectivamente 111 ciclos de PDG por translocações robertsonianas em um período de 10 anos. Por meio da comparação entre a história natural de pessoas portadoras de translocações robertsonianas e os resultados obtidos pelo PGD nesse grupo, essa técnica mostra-se como boa opção reprodutiva, principalmente quando existe algum outro problema de fertilidade associado, como nos casos de abortamento de repetição, pois aumenta as taxas de nascidos vivos e encurta o tempo necessário para alcançarem uma gestação saudável. Entretanto, portadores de translocações que não apresentem aborto de repetição, infertilidade ou idade avançada devem ser questionados sobre a possibilidade de gestação espontânea antes de ser encaminhados a tratamentos de reprodução assistida.²³

Munné et al. (2005), em estudo clínico controlado, avaliaram as taxas de abortamento espontâneo de casais com história de aborto de repetição submetidos ao PGD e transferência apenas de embriões euploides. Segundo os dados, antes do PGD, pacientes com AR tinham perdido 87% (262/301) de suas gestações, com uma expectativa de perda de 36,5%. Após o PGD, foram perdidas apenas 16,7% das gestações e a maior redução foi observada no grupo de mulheres com idade maior ou igual a 35 anos (redução de 44,5% para 12% após o PGD). Dessa forma, o uso do diagnóstico genético pré-implantacional apresenta um efeito benéfico no prognóstico reprodutivo de casais com aborto de repetição, especialmente com mulheres com idade ≥ 35 anos, e reduz as taxas de abortamento a níveis populacionais basais.²⁴

Relacionado ao tema proposto por esta revisão, foram levantados ainda 11 artigos que mostravam o uso da técnica de *array*-CGH para o PGD e comparavam sua eficácia com a técnica de Fish. Cinco desses foram excluídos por se tratarem de *screening* genético pré-implantacional e não estarem compatíveis com o tema abordado. Na avaliação das seis publicações restantes, em todas elas foi confirmado que a hibridização genômica comparativa por *array* é superior à técnica de Fish e apresenta uma maior acurácia na identificação de anomalias.

A hibridização fluorescente *in situ* (Fish) como diagnóstico genético pré-implantacional de anomalias cromossômicas estruturais apresenta limitações, que incluem o teste de carreadores, resultados inconclusivos, fixação inadequada e avaliação limitada a apenas um pequeno número de cromossomos e de aneuploidias.²⁵⁻²⁸

Fiorentino et al. (2011) analisaram 24 casais portadores de 18 tipos de translocações cromossômicas balanceadas em 28 ciclos consecutivos de PGD. O número total de 187/200 (93,5%) embriões foi diagnosticado corretamente pela técnica de *array*-CGH e desses 16% (30/187) foram normais ou balanceados para todos os cromossomos, 17,7% (32/187) desbalanceados por translocação e normais para aneuploidia, 39,6% (74/187) apresentavam aneuploidia e eram

desbalanceados e 27,3% (51/187) eram normais ou balanceados, porém mostravam aneuploidia de cromossomos não envolvidos em translocações. Todos os diagnósticos obtidos foram confirmados por PCR-based. Dessa forma, os dados demonstram que o *array*-CGH é capaz de detectar cromossomos desbalanceados, assim como aneuploidias dos 24 cromossomos nos embriões avaliados, e supera as limitações da técnica de Fish, além de oferecer melhor desempenho, sensibilidade e confiabilidade.²⁹

O uso da *comparative genomic hybridization* (CGH) na prática clínica como método de PGD, apesar de superar a principal limitação da técnica de Fish, ainda apresentava como principal restrição o longo tempo necessário, de até 72 horas, para a hibridização. Com o objetivo de transpor esse empecilho, Hu et al. (2004), com o uso da técnica de *microarray*-CGH para a detecção de aneuploidia em uma única célula, fizeram em intervalo de tempo de apenas 30 horas o PGD, que apresentou acurácia superior à técnica de Fish, 97% contra 91% a 96% na avaliação dos 22 cromossomos autossômicos, o que tornou, dessa forma, o método mais viável para o uso clínico.²⁵

Colls et al. (2012), em revisão de 926 casos de PGD por translocações recíprocas avaliadas pela técnica de Fish, selecionaram 47 casos (402 embriões) para serem submetidos à técnica de *array*-CGH. A taxa de erro evidenciada no estudo foi de apenas 1,9% (1/54 embriões) para a técnica da hibridização genômica comparativa por *array*-CGH. Além disso, 38 embriões anormais que não foram detectados pela Fish, ao ser submetidos à *array*-CGH, mostraram-se anormais. Em conclusão, o estudo valida que o uso de *array*-CGH no PGD para translocações apresenta baixas taxas de erro e reforça que esse método pode identificar todos os embriões com translocações recíprocas desbalanceadas ou translocações robertsonianas, além de permitir a avaliação simultânea de todos os cromossomos para aneuploidia e não requerer teste genético prévio do casal, sendo dessa forma mais efetivo do que a técnica de Fish.³⁰

Discussão

A ocorrência de sucessivos abortos em casais que tentam engravidar causa uma grande tristeza, insegurança e dúvida em relação à próxima gestação. Com o objetivo de oferecer melhores condições reprodutivas para esses casais, diversos estudos vêm sendo feitos.

Antes de se estabelecer um possível tratamento, devemos avaliar as principais causas do quadro de aborto de repetição. Dentre os vários fatores causais, as anomalias cromossômicas fetais são responsáveis por metade dos abortamentos precoces (abaixo de 12 semanas de gestação) e um terço dos abortos de segundo trimestre.^{31,32} Com base nesses dados, o uso de técnicas de reprodução assistida com avaliação genética pré-implantacional (PGD) pode desempenhar um importante papel na redução da recorrência do abortamento e na redução do tempo para alcançar uma gestação saudável por esses casais.

Atualmente, na maioria dos centros de reprodução assistida que fazem o PGD, o método diagnóstico usado é a hibridização fluorescente *in situ* (Fish). Porém, sabe-se que essa técnica apresenta diversas limitações em sua feitura e

análise de resultados, além de possibilitar apenas a avaliação de um número restrito de cromossomos. Com o advento da hibridização genética comparativa por *array* (*array*-CGH), os 24 cromossomos, assim como possíveis translocações e aneuploidias, passaram a ser avaliados simultaneamente, com altas taxas de sensibilidade e confiabilidade.²⁹

Apesar de a *array*-CGH mostrar-se superior à Fish em vários estudos comparativos, não existem publicações, até o presente momento, que relacionem o seu uso no PGD a pacientes com quadro de abortamento de repetição e que comprovem que essa superioridade técnica é refletida em menores taxas de abortamento e melhor prognóstico reprodutivo para esses casais.

Mesmo que o uso do PGD, como possível tratamento para casos de aborto de repetição (AR), ainda seja amplamente discutível na literatura por não existirem trabalhos prospectivos randomizados, a maioria dos artigos referentes ao tema mostra que vários benefícios podem ser obtidos com o uso desse método. Munné et al. (2005) mostraram um efeito benéfico no prognóstico reprodutivo de casais com aborto de repetição que foram tratados com o uso do PGD, especialmente em mulheres com idade ≥ 35 anos, o que reduziu as taxas de abortamento a níveis populacionais basais.²⁴ Da mesma forma, Fisher et al. (2010), ao avaliar casais portadores de translocações com aborto de repetição, evidenciaram redução significativa nas taxas de abortamento, melhoria nas taxas de sucesso de gravidez e redução no tempo necessário para engravidar.²²

Com base nos dados coletados que mostram tanto um possível benefício do uso do PGD para casais com AR como a grande superioridade da técnica da *array*-CGH em relação ao método de Fish, em teoria, a associação desses dois métodos seria capaz de melhorar o manejo e, consequentemente, o futuro reprodutivo para esse grupo de pacientes.⁶

Porém, antes de se estabelecer o uso do PGD com *array*-CGH como tratamento para casais com AR, vários aspectos devem ser avaliados. O primeiro deles é seu elevado custo e seus riscos associados à técnica, pois todos os casais deverão ser submetidos a procedimentos de reprodução assistida de alta complexidade, que necessitam do uso de medicações injetáveis, e correm o risco de desenvolvimento de síndrome de hiperestimulação ovariana e de exposição a procedimento invasivo, como uma punção ovariana. Além disso, para que essa metodologia de tratamento seja instituída, são necessários estudos prospectivos e randomizados que realmente comprovem sua eficácia. Até que isso ocorra, a decisão de usar ou não a técnica deve ser discutida em conjunto com cada casal, com a apresentação de todos os pontos positivos e negativos, para que ele possa escolher, com o médico assistente, a melhor terapêutica para o caso.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Zegers-Hochschild F, Adamson GD, de Mouzon J, Ishihara O, Mansour R, Nygren K, et al. The International Committee for

- Monitoring Assisted Reproductive Technology (ICMART) and the World Health Organization (WHO) Revised Glossary on ART Terminology, 2009. *Human Reprod.* 2009;24:2683–7, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dep343>.
2. Wahabi HA, Abed Althagafi NF, Elawad M, Al Zeidan RA. Progesterone for treating threatened miscarriage. *Cochrane Database Syst Rev.* 2011;CD005943.
 3. Evaluation and treatment of recurrent pregnancy loss: a committee opinion. The Practice Committee of the American Society for Reproductive Medicine. Alabama: Birmingham: American Society for Reproductive Medicine; 2012.
 4. Palomba S, Falbo A, Orto F, Russo T, Tolino A, Zullo F. Metformin hydrochloride and recurrent miscarriage in a woman with polycystic ovary syndrome. *Fertil Steril.* 2006;85, 1511e3–5.
 5. Stephenson MD. Frequency of factors associated with habitual abortion in 197 couples. *Fertil Steril.* 1996;66: 24–9.
 6. Rajcan-Separovic E, Diego-Alvarez D, Robinson WP, Tyson C, Qiao Y, Harvard C, et al. Identification of copy number variants in miscarriages from couples with idiopathic recurrent pregnancy loss. *Hum Reprod.* 2010;25:2913–22, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/deq202>. Epub 2010 Sep 16.
 7. Stephenson M, Kuttah W. Evaluation and management of recurrent early pregnancy loss. *Clin Obstet Gynecol.* 2007;50:13245.
 8. Daniely M, Aviram-Goldring A, Barkai G, Goldman B. Detection of chromosomal aberration in fetuses arising from recurrent spontaneous abortion by comparative genomic hybridization. *Hum Reprod.* 1998;13:805–9.
 9. Stern JJ, Dorfman AD, Gutierrez-Najar MD. Frequency of abnormal karyotype among abortuses from women with and without a history of recurrent spontaneous abortion. *Fertil Steril.* 1996;65:250–63.
 10. Ogasawara M, Aoki K, Okada S, Suzumori K. Embryonic karyotype of abortuses in relation to the number of previous miscarriages. *Fertil Steril.* 2000;73:300–4.
 11. Carp H, Toder V, Aviram A, Daniely M, Mashlach S, Barkai G. Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage. *Fertil Steril.* 2001;75:678–82.
 12. Ferro J, Martinez MC, Lara C, Pellicer A, Remohi J, Serra V. Improved accuracy of hysteroembryoscopic biopsies for karyotyping early missed abortions. *Fertil Steril.* 2003;80:1260–4.
 13. Carp H, Dolitzky M, Inbal A. Thromboprophylaxis improves the live birth rate in women with consecutive recurrent miscarriages and hereditary thrombophilia. *J Thromb Hemost.* 2003;1:433–8.
 14. Franssen MT, Musters AM, van der Veen F, Repping S, Leschot NJ, Bossuyt PM, et al. Reproductive outcome after PGD in couples with recurrent miscarriage carrying a structural chromosome abnormality: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2011;17:467–75, <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmr011>.
 15. Chang LJ, Chen SU, Tsai YY, Hung CC, Fang MY, Su YN, et al. An update of preimplantation genetic diagnosis in gene diseases, chromosomal translocation, and aneuploidy screening. *Clin Exp Reprod Med.* 2011;38:126–34, <http://dx.doi.org/10.5653/cerm.2011.38.3.126>.
 16. Carp HJ, Dirnfeld M, Dor J, Grudzinskas JG. ART in recurrent miscarriage: preimplantation genetic diagnosis/screening or surrogacy? *Hum Reprod.* 2004;19:1502–5.
 17. Rubio C, Simón C, Vidal F, Rodrigo L, Pehlivan T, Remohi J, et al. Chromosomal abnormalities and embryo development in recurrent miscarriage couples. *Hum Reprod.* 2003;18: 182–8.
 18. DeUgarte CM, Li M, Surrey M, Danzer H, Hill D, DeCherney AH. Accuracy of FISH analysis in predicting chromosomal status in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril.* 2008;90:1049–54, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2007.07.1337>.
 19. Rius M, Obradors A, Daina G, Ramos L, Pujol A, Martínez-Passarell O, et al. Detection of unbalanced chromosome segregations in preimplantation genetic diagnosis of translocations by short comparative genomic hybridization. *Fertil Steril.* 2011;96:134–42, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2011.04.052>.
 20. Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S, Biricik A, Kokkali G, Rienzi L, et al. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod.* 2011;26:1925–35, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/der082>.
 21. Franssen MTM, Musters AM, van der Veen F, Repping S, Leschot NJ, Bossuyt PM, et al. Reproductive outcome after PGD in couples with recurrent miscarriage carrying a structural chromosome abnormality: a systematic review. *Hum Reprod Update.* 2011;17:467–75, <http://dx.doi.org/10.1093/humupd/dmr011>.
 22. Fischer J, Colls P, Escudero T, Munné S. Preimplantation genetic diagnosis (PGD) improves pregnancy outcome for translocation carriers with a history of recurrent losses. *Fertil Steril.* 2010;94:283–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.fertnstert.2009.02.060>.
 23. Keymolen K, Staessen C, Verpoest W, Michiels A, Bonduelle M, Haentjens P, et al. A proposal for reproductive counselling in carriers of Robertsonian translocations: 10 years of experience with preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod.* 2009;24:2365–71, <http://dx.doi.org/10.1093/humrep/dep201>.
 24. Munné S, Chen S, Fischer 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;84:331–5.
 25. Hu DG, Webb G, Hussey N. Aneuploidy detection in single cells using DNA array-based comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod.* 2004;10:283–9.
 26. Griffin DK, Wilton LJ, Handyside AH, Atkinson GH, Winston RM, Delhanty JD, et al. Diagnosis of sex in preimplantation embryos by fluorescent in situ hybridisation. *BMJ.* 1993;306:1382.
 27. 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;14:2191–9.
 28. Verlinsky Y, Cieslak J, Ivakhnenko V, Evsikov S, Wolf G, White M, et al. Prevention of age-related aneuploidies by polar body testing of oocytes. *J Assist Reprod Genet.* 1999;16:165–9, <http://dx.doi.org/10.1023/A:1020304621338>.
 29. Fiorentino F, Spizzichino L, Bono S, Biricik A, Kokkali G, Rienzi L, et al. PGD for reciprocal and Robertsonian translocations using array comparative genomic hybridization. *Hum Reprod.* 2011;26:1925–35, <http://dx.doi.org/10.0193/humrep/der082>.
 30. Colls P, et al. Validation of array comparative genome hybridization for diagnosis of translocations in preimplantation human embryos. *Reprod Biomed Online.* 2012;24:621–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.rbmo.2012.02.006>.
 31. van den Berg MM, van Maarle MC, van Wely M, Goddijn M. Genetics of early miscarriage: review. *Biochim Biophys Acta.* 2012;1822:1951–9, <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2012.07.001>.
 32. Goddijn M, Leschot NJ. Genetic aspects of miscarriage. *Baillieres Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2000;14:855–65.