



Reprodução & Climatério

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



Artigo de revisão

Perspectivas de uso da hibridização genômica comparativa como rastreamento pré-implantacional em biópsias de embrião humano no estágio de blastocisto[☆]

Pabline Barbosa Lima Almeida^{a,*}, Oscar Barbosa Duarte Filho^b
e Jonathas Borges Soares^a

^a Projeto Alfa-Infertilidade Conjugal e Reprodução Humana, Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, São Paulo, SP, Brasil

^b Centro de Reprodução Humana do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, São Paulo, SP, Brasil

INFORMAÇÕES SOBRE O ARTIGO

Histórico do artigo:

Recebido em 13 de maio de 2013

Aceito em 27 de maio de 2013

On-line em 15 de agosto de 2013

Palavras-chave:

Hibridização genômica comparativa

Técnicas reprodutivas

Diagnóstico genético

pré-implantacional

Blastocisto

R E S U M O

O rastreamento genético pré-implantacional parece melhorar as taxas de gravidez em certos grupos de pacientes com mau prognóstico nos tratamentos de fertilização *in vitro*. Mais recentemente tem-se sugerido seu uso para a seleção visando à transferência de um embrião único. O presente artigo tem como objetivo discorrer sobre a técnica de hibridização genômica comparativa, a biópsia do embrião na fase de blastocisto e as perspectivas de uso desses como rastreamento genético pré-implantacional. Foi feita revisão bibliográfica em artigos científicos, livros e periódicos. O método de hibridização genômica comparativa é capaz de analisar todos os pares cromossômicos e mostra-se promissor na identificação das aneuploidias. A biópsia do embrião na fase de blastocisto parece ser menos agressiva e fornece mais material genético do que aquela feita na fase de clivagem. A transferência de um embrião geneticamente normal aumenta as chances de gravidez nos procedimentos de fertilização *in vitro*. Entretanto, ainda não temos estudos randomizados controlados suficientes para assegurar que a hibridização genômica comparativa em blastocisto tenha impacto prático suficiente para aumentar as chances de gravidez.

© 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](#)

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

* Autor para correspondência.

E-mail: pablinealmeida@hotmail.com (P.B.L. Almeida).

Prospects of using comparative genomic hybridization in blastocyst stage human embryo biopsy as pre-implantation genetic screening

A B S T R A C T

Keywords:

Comparative genomic hybridization
Reproductive techniques
Pre-implantation genetic screening
Blastocyst

Pre-implantation genetic screening could improve pregnancy rates in certain groups of patients with poor prognosis undergoing *in vitro* fertilization procedures. Recently its use as screening has been suggested aiming single embryo transfers. This paper evaluates comparative genomic hybridization technique, blastocyst stage embryo biopsy and analyzes the prospects of using both as pre-implantation genetic screening. A bibliographical review in scientific articles, books, journals and websites was done. Comparative genomic hybridization is able to analyze all chromosomes being promising as pre-implantation genetic screening. Blastocyst biopsy seems to be less aggressive to the embryo and provides additional genetic material compared to cleavage stage biopsies. The transfer of a genetically normal embryo increases pregnancy rates in *in vitro* fertilization procedures. However there are insufficient randomized controlled trials to ensure that comparative genomic hybridization in blastocysts cells has a practical impact in pregnancy rates.

© 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

Casais que experimentam a infertilidade recorrem a tecnologias de reprodução assistida para conseguir a gravidez. Muitos desses casais submetem-se a múltiplos ciclos de fertilização *in vitro* (FIV) sem sucesso e frequentemente procuram outras opções para melhorar suas chances de um bom resultado.

A aneuploidia cromossômica é causa reconhecida de abortamentos espontâneos e responsável por cerca de dois terços desses.¹ As aberrações encontradas podem variar desde simples trissomias ou monossomias até anomalias mais complexas, que envolvem múltiplos cromossomos. Os resultados de gravidez variam desde falhas de implantação, abortamentos precoces ou tardios até nascimentos anormais, o que depende dos cromossomos envolvidos.

A estratégia mais usada para a identificação de embriões viáveis é baseada na avaliação de critérios morfológicos, tais como o número e tamanho das células, a presença de multinucleação, o percentual de fragmentação e a taxa de clivagem.²⁻⁵ A avaliação morfológica é praticada em todos os laboratórios de FIV e continua a ser o esteio na avaliação do embrião. No entanto, alguns dos aspectos mais importantes da viabilidade do embrião permanecem invisíveis para tais análises.

Recentemente, com a evolução das técnicas de biópsia embrionária e o aprimoramento dos testes genéticos, várias estratégias têm sido sugeridas para se alcançar uma avaliação mais acurada de todos os cromossomos a partir do material biopsiado de embriões ou oócitos. Atualmente, a mais promissora delas parece ser a hibridização genômica comparativa (CGH).⁶⁻¹⁰

Em 2008, durante a reunião da Sociedade Americana de Medicina Reprodutiva (ASRM), os dados clínicos de ciclos que usam a CGH para analisar biópsias de blastocisto foram apresentados e indicaram aumento estatisticamente significativo, superior a duas vezes, nas taxas de implantação (30-62%, $p < 0,001$) para mulheres com uma idade média de 38 anos e com história de 1-10 falhas em ciclos de FIV. A taxa de

gravidez em curso foi de 78%, bem acima das taxas de gravidez esperadas sem PGS.¹¹

Desde então, vários centros de reprodução assistida no mundo têm usado o método como opção para se diminuir as falhas em FIV, principalmente naqueles casais com mau prognóstico gestacional.

Diagnóstico genético pré-implantacional

O diagnóstico genético pré-implantacional (PGD) foi desenvolvido há mais de vinte anos e inicialmente usado para a determinação do sexo em embriões de casais com risco para a transmissão de uma doença recessiva ligada ao X.¹² O procedimento envolve a geração de embriões por FIV, seguido pela biópsia desses e teste do material embrionário.

A biópsia pode ser feita em diferentes estágios de desenvolvimento do embrião: dia 0, com a remoção do primeiro corpo polar (PB) do ovócito maduro; dia 1, com a biópsia do segundo corpo polar do zigoto (o primeiro PB também pode ser obtido nesse momento); dia 3, por meio da remoção de 1-2 células (blastômeros) do embrião em fase de clivagem; ou nos dias 5-6, com a remoção de um pequeno grupo de células do trofoectoderma (células TE) do blastocisto.¹³ O PGD para doenças hereditárias foi feito com sucesso em 1990 e permitiu que casais portadores de uma anomalia genética pudessem ter um filho normal.^{12,14}

Rastreamento genético pré-implantacional

Sabendo-se que as anormalidades cromossômicas desempenham um importante papel nas falhas de implantação embrionária em tratamentos de FIV, surgiu a hipótese de que o estudo genético dos embriões melhoraria as taxas de implantação. Em 1993, Munné et al. usaram a hibridização fluorescente *in situ* (Fish) para detectar anormalidades cromossômicas em cinco cromossomos e, assim, fizeram os

primeiros casos de rastreamento genético pré-implantacional (PGS).¹⁵

Tais técnicas passaram, então, a ser usadas para o rastreamento genético, com a finalidade de tentar melhorar as taxas de gravidez em certos grupos de pacientes com mau prognóstico nos procedimentos de FIV, como aquelas com idade materna avançada, abortamentos de repetição, repetidas falhas de implantação e fator masculino grave.¹⁶ Desde então, o PGS começou a ser feito com a finalidade de aumentar as taxas de implantação e nascidos vivos, além de reduzir os abortamentos espontâneos em pacientes sem desordem genética conhecida.¹⁷

O PGS oferece aos casais submetidos à FIV uma ferramenta de seleção adicional sobre a simples análise morfológica, visando a escolher o melhor embrião para transferência. A seleção dos embriões sem erros cromossômicos pode melhorar as taxas de sucesso na implantação e reduzir a probabilidade de abortamentos associados a aneuploidias.¹⁸

O PGS foi relatado pela primeira vez em 1995, na análise de corpos polares.^{19,20} Desde então, numerosos artigos foram publicados sobre o seu uso. No entanto, como acontece com várias novas tecnologias em reprodução humana, houve pouca evidência de que aumentasse as taxas de gestação. A maioria dos estudos randomizados e não randomizados de PGS foi feita com a biópsia de embriões na fase de clivagem, o que pode ser parte da razão para o seu mau desempenho até agora. Embriões nesse estágio de desenvolvimento mostram níveis elevados de anormalidades cromossômicas e mosaicismos.^{19,21} Por isso, a análise de uma única célula do embrião na fase de clivagem pode não representar seu real estado genético.

Além disso, a maioria desses estudos usou a técnica de hibridização *in situ* fluorescente (Fish), que é capaz de detectar somente metade ou menos do cariótipo humano (de 5 a 12 cromossomos), além do que a eficiência do método é reduzida quando muitos cromossomos são analisados ao mesmo tempo.

Hibridização *in situ* fluorescente

A hibridização *in situ* fluorescente foi desenvolvida e aperfeiçoada para uso em amostras com muitas centenas de células para contar, o que permite variações naturais na eficiência da hibridização, sobreposição de sinal e outras questões técnicas a serem levadas em conta sobre toda a análise da amostra. Dessa maneira, mesmo que algumas células apresentem uma contagem anormal em uma sonda por problemas técnicos, a maioria das outras células terá a contagem real, que permite o diagnóstico da amostra.

A Fish não foi projetada para testar um conjunto de amostras de uma única célula. Portanto, as limitações técnicas do teste são amplas e podem levar a resultados falso-positivos e falso-negativos e afetar a capacidade do teste no PGS. Surui, então, a necessidade de se avaliar o momento da biópsia, visando à obtenção de um maior número de células e do desenvolvimento de novos métodos capazes de analisar todos os pares de cromossomos.¹³

Hibridização genômica comparativa

A hibridização genômica comparativa (CGH) é uma técnica que faz a ponte entre a genética molecular e a citogenética.⁸ Permite um rastreamento cromossômico abrangente, capaz de determinar com precisão todas as aneuploidias cromossômicas. Combina a amplificação de todo o genoma das células biopsiadas, seguida da marcação fluorescente e hibridização com cromossomos normais numa lâmina de microscópio. Mais recentemente a hibridização genômica comparativa com arrays (array CGH ou aCGH) foi introduzida e proporcionou resultados similares àquela com células em metáfase (mCGH), mas num período de tempo mais rápido.²²

A CGH já foi aplicada com sucesso para o rastreamento genético pré-implantacional (PGS) de corpos polares,²³⁻²⁵ embriões em estágio de clivagem^{10,26} e blastocistos, com resultados clínicos promissores.²⁷⁻²⁹ Além da detecção de aneuploidias que afetam os cromossomos inteiros, a CGH também é capaz de identificar ganhos e perdas de segmentos desses e deve, portanto, ser capaz de detectar os desequilíbrios provocados por uma ampla variedade de rearranjos cromossômicos.^{7,10,27} Na CGH, o ácido desoxirribonucleico (DNA) da amostra e o de um controle normal são amplificados separadamente, com o uso de uma amplificação genômica completa (WGA). A WGA em células individuais para PGD foi relatada tanto para fins clínicos como para de pesquisa.³⁰⁻³⁵

Na mCGH, um software de computador especializado analisa a razão de fluorescência vermelho-verde ao longo do comprimento de cada cromossomo metafásico em cerca de seis conjuntos diferentes em um ideograma. Ganhos em vermelho indicam que a amostra é deficiente na região ou no cromossomo e ganhos em verde que o teste tem cópias extras da região ou do cromossomo. O processo é demorado e tecnicamente desafiador e leva até 72 horas para se fazer o trabalho em bancada de laboratório, mais o tempo adicional necessário para a análise detalhada dos dados.¹³

O aCGH segue o mesmo princípio do mCGH, mas usa um chip de DNA, geralmente cromossomos artificiais bacterianos (BACs) afixados na lâmina do microscópio, e já foi aplicado a uma única célula ou embrião. Cada clone de BAC corresponde a uma parte específica do cromossomo e um software de computador analisa a razão vermelho-verde de fluorescência em cada local que irá corresponder a uma perda ou ganho de região, semelhantemente ao mCGH. A análise é totalmente automatizada e todo o processo pode ser feito em 24 horas, o que permite a transferência dos embriões no mesmo ciclo.¹³

A vantagem principal da CGH em comparação com o método de Fish é que a primeira permite, em um único teste, a detecção de alterações numéricas (aneuploidias) em todos os cromossomos. Além disso, reduz os erros potenciais associados à fixação dos blastômeros. É também um método consistente, que fornece uma informação completa de todos os cromossomos, enquanto a Fish baseia-se no diagnóstico de uma pequena região do DNA.³⁶

Biópsia embrionária

Durante duas décadas a fase de biópsia embrionária predominante tem sido o estágio de clivagem, no qual geralmente

um ou por vezes dois blastômeros são biopsiados no terceiro dia de desenvolvimento do embrião.¹³ Os primeiros estudos clínicos sobre PGS em embriões no estágio de clivagem mostraram aumento nas taxas de implantação e de gravidez em curso, bem como diminuição nas taxas de abortamento espontâneo.³⁷⁻³⁹ A biópsia do blastocisto geralmente remove entre 5-10 células e consequentemente fornece mais DNA do que a biópsia na fase de clivagem, com 1 a 2 blastômeros.

Já está bem documentado que o embrião na fase de clivagem mostra elevados níveis de mosaicismos cromossômico.^{21,40} O mosaicismos cromossômico na pré-implantação do embrião dificulta a acurácia do PGS, pois as células removidas podem não representar a totalidade do embrião. Portanto, a análise de maior número de células torna o diagnóstico mais preciso.⁴¹ Entretanto, estudos recentes indicam que isso também ocorre com blastocistos.²⁷

A cultura de embriões humanos até o estágio de blastocisto é uma inovação que só se tornou costumeira nos últimos anos. Avanços foram feitos na cultura estendida de embriões com o uso de uma combinação sequencial de meios de cultura ultraestáveis com pouco oxigênio específica para cada estágio do embrião.^{42,43} Os embriões que se tornam blastocistos *in vitro* são considerados de melhor qualidade e, geralmente, têm um melhor potencial de implantação. Por essa razão a cultura para a fase de blastocisto é cada vez mais feita nas clínicas de reprodução assistida em todo o mundo. O que se torna cada vez mais evidente, no entanto, é que o cultivo desses embriões até blastocistos não elimina a aneuploidia.

Assim como em oócitos e embriões no estágio de clivagem, até recentemente a Fish foi o método de escolha para a análise citogenética de blastocistos humanos no contexto de pesquisa.⁴⁴⁻⁴⁸ Dados obtidos com esses estudos têm demonstrado que um grande número de erros cromossômicos persiste até a fase de blastocisto, mas suas taxas tendem a ser mais baixas em comparação com a fase de clivagem do desenvolvimento.^{44,48,49}

Postula-se que o PGS na fase de blastocisto pode levar a melhores resultados clínicos para casais inférteis porque seriam escolhidos embriões de melhor qualidade.^{6,13} Semelhantemente à de corpo polar, a biópsia das células trofoectodérmicas do blastocisto é considerada menos prejudicial para o embrião do que aquela na fase de clivagem. Apesar de serem retiradas cerca de cinco células, a proporção relativa tomada do volume do embrião é menor do que aquela associada à retirada de uma única célula na fase de clivagem. Além disso, a massa de células removidas é destinada a formar a placenta, e não o feto.

Perspectivas do rastreamento genético pré-implantacional

Na reprodução humana as taxas de gravidez e implantação de embriões são inversamente proporcionais à idade materna. Dados de três décadas de estudo sugerem um aumento nos erros de segregação cromossômica na ovogênese em mulheres acima de 35 anos. Assim, o aumento da idade materna aumenta o risco de aneuploidias embrionárias, eleva o risco de abortamentos e diminui as taxas de implantação dos embriões

por aberrações cromossômicas incompatíveis com o desenvolvimento e a diferenciação celular.

Outro grupo de mulheres com elevada produção de embriões geneticamente alterados é o daquelas com repetidas falhas em tratamentos de reprodução assistida ou com abortamentos recorrentes. Esses embriões apresentam taxas de aneuploidia em torno de 70% e a taxa habitual é de 30%.²⁵

Atualmente, o uso do PGS em tratamentos de FIV tem sido proposto nos casos de idade materna avançada (AMA), falhas de implantação em repetidos ciclos de FIV anteriores (RIF) e abortamentos recorrentes (RPL).¹⁷ Além disso, o PGS tem sido proposto também para mulheres com gestações trissômicas anteriores⁵⁰ e naquelas que têm parceiros com fator masculino grave.⁵¹⁻⁵³ Estudos demonstram que a incidência de aneuploidias é alta nos procedimentos de fertilização *in vitro*, mesmo quando avaliamos mulheres jovens e sem problemas reprodutivos como em casos de ovoduação.⁵⁴ Mais recentemente, na reprodução assistida, têm sido crescentes as tendências de se transferir um único embrião para diminuir as taxas de gestações múltiplas, principal fator de risco em FIV.⁵⁵⁻⁵⁹

Gestações múltiplas são mais propensas à prematuridade, com um maior risco de baixo peso ao nascer, atrasos de desenvolvimento, paralisia cerebral e malformações congênitas.⁶⁰⁻⁶² A transferência de múltiplos embriões normalmente é usada para melhorar as taxas de implantação. A transferência de embrião único é o ideal para a prevenção de nascimentos múltiplos. Um embrião de alta qualidade tem mais probabilidade de culminar em uma gravidez em curso e, em última análise, no nascimento de um bebê único e saudável.^{63,64}

Conclusão

A triagem de aneuploidias para a seleção de embriões já percorreu um longo caminho desde que foi inicialmente proposta como uma forma de melhorar os resultados clínicos em pacientes submetidas a tratamentos de fertilização *in vitro*. Dados mostram que o uso da hibridização *in situ* fluorescente para analisar tanto blastômeros como células trofoectodérmicas do blastocisto é dificultado por inúmeros problemas técnicos. Esses podem potencialmente aumentar o risco de erro diagnóstico.

As deficiências nas técnicas iniciais do rastreamento genético pré-implantacional levaram vários grupos de investigação a desenvolver métodos opcionais, citogenéticos e moleculares e examinar todos os pares cromossômicos de células individuais. Esses métodos já foram aperfeiçoados e validados e são cada vez mais usados no ambiente clínico.

Como a biópsia do embrião na fase de clivagem pode acarretar um maior risco de erro diagnóstico por causa do mosaicismos, muitas clínicas de fertilização *in vitro* têm escolhido fazer a biópsia dos embriões no estágio de blastocisto. Entretanto, ainda não temos evidência científica suficiente para assegurar o benefício da técnica. Estudos randomizados controlados estão em curso nos Estados Unidos e na Europa com o uso da biópsia de blastocisto em combinação com métodos de citogenética molecular abrangentes para o rastreamento genético pré-implantacional.

Esperamos que os resultados obtidos a partir desses estudos possam esclarecer se o PGS realmente faz diferença significativa nos resultados clínicos para os casais que necessitam de fertilização *in vitro*, com o estabelecimento de uma gravidez bem sucedida e, finalmente, o nascimento de um bebê vivo, único e saudável.

Atualmente, o uso do rastreamento para pacientes saudáveis e sem indicações com o propósito de melhorar os resultados de fertilização *in vitro* está em ascensão. Entretanto, as evidências científicas ainda não são suficientes para recomendar a aplicação clínica da hibridização genômica comparativa em biópsias de embrião no estágio de blastocisto com a finalidade de rastreamento genético pré-implantacional.

Conflitos de interesse

Os autores declaram não haver conflitos de interesse.

REFERÊNCIAS

1. Lathi RB, Westphal LM, Milki AA. Aneuploidy in the miscarriages of infertile women and the potential benefit of preimplantation genetic diagnosis. *Fertil Steril*. 2008;89:353-7.
2. Cummins JM, Breen TM, Harrison KL, Shaw JM, Wilson LM, Hennessey JF. A formula for scoring human embryo growth rates in *in vitro* fertilization: its value in predicting pregnancy and in comparison with visual estimates of embryo quality. *J In vitro Fert Embryo Transf*. 1986;3:284-95.
3. Puissant F, Van Rysselberge M, Barlow P, Deweze J, Leroy F. Embryo scoring as a prognostic tool in IVF treatment. *Hum Reprod*. 1987;2:705-8.
4. Van Royen E, Mangelschots K, De Neubourg D, Valkenburg M, Van de Meerseche M, Ryckaert G, et al. Characterization of a top quality embryo, a step towards single-embryo transfer. *Hum Reprod*. 1999;14:2345-9.
5. Sakkas D, Gardner DK. Noninvasive methods to assess embryo quality. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2005;17:283-8.
6. Fragouli E, Lenzi M, Ross R, Katz-Jaffe M, Schoolcraft WB, Wells D. Comprehensive molecular cytogenetic analysis of the human blastocyst stage. *Hum Reprod*. 2008;23:2596-608.
7. Wells D, Delhanty J. Evaluating comparative genomic hybridization (CGH) as a strategy for preimplantation diagnosis of unbalanced chromosome complements. *Eur J Hum Genet*. 1996;4 Suppl 1:125.
8. Kallioniemi A, Kallioniemi OP, Sudar D, Rutovitz D, Gray JW, Waldman F, et al. Comparative genomic hybridization for molecular cytogenetic analysis of solid tumors. *Science*. 1992;258:818-21.
9. Wells D, Sherlock JK, Handside AH, Delhanty DA. Detailed chromosomal and molecular genetic analysis of single cells by whole genome amplification and comparative genome hybridization. *Nucleic Acids Res*. 1999;27:1214-8.
10. Voullaire L, Wilton L, Slater H, Williamson R. Detection of aneuploidy in single cells using comparative genome hybridization. *Prenat Diagn*. 1999;19:846-51.
11. Goossens V, Harton G, Moutou C, Traeger-Synodinos J, Van Rij M, Harper JC, PGD ESHRE. Consortium data collection IX: cycles from January to December 2006 with pregnancy follow-up to October 2007. *Hum Reprod*. 2009;24:1786-810.
12. Handside AH, Kontogianni EH, Hardy K, Winston RML. Pregnancies from biopsied human preimplantation embryos sexed by Y-specific DNA amplification. *Nature*. 1990;344:768-70.
13. Harper JC, Harton G. The use of arrays in preimplantation genetic diagnoses and screening. *Fertil Steril*. 2010;94:1173-7.
14. Harper JC. Preimplantation genetic diagnosis. Cambridge: Cambridge University Press; 2009.
15. Munné S, Lee A, Rosenwaks Z, Grifo J, Cohen J. Diagnosis of major chromosome aneuploidies in human preimplantation embryos. *Hum Reprod*. 1993;8:2185-91.
16. Goossens V, De Rycke M, DeVos A, Staessen C, Michiels A, Verpoest W, et al. Diagnostic efficiency, embryonic development and clinical outcome after the biopsy of one or two blastomeres for preimplantation genetic diagnosis. *Hum Reprod*. 2008;23:481-92.
17. Ly KD, Agarwal A, Nagy GP. Preimplantation genetic screening: does it help or hinder IVF treatment and what is the role of the embryo? *J Assist Reprod Genet*. 2011;28:833-49.
18. Munné S, Wells D, Cohen J. Technology requirements for preimplantation genetic diagnosis to improve assisted reproduction outcomes. *Fertil Steril*. 2010;94:408-30.
19. Munné S, Dailey T, Sultan KM, Grifo J, Cohen J. The use of first polar bodies for preimplantation diagnosis of aneuploidy. *Hum Reprod*. 1995;10:1014-20.
20. Verlinsky Y, Cieslak J, Freidman M, Ivakhnenko V, Wolf G, Kovalinskaya L, et al. Pregnancies following pre-conception diagnosis of common aneuploidies by fluorescent in-situ hybridization. *Hum Reprod*. 1995;10:1923-7.
21. Harper JC, Coonen E, Handside AH, Winston RM, Hopman AH, Delhanty JD. Mosaicism of autosomes and sex chromosomes in morphologically normal, monospermic, preimplantation human embryos. *Prenat Diagn*. 1995;15:41-9.
22. Gutierrez-Mateo C, Colls P, Sanchez-Garcia J, Escudero T, Prates R, Ketterson K, Wells D, Munne S. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertil Steril*. 2011;95:953-8.
23. Wells D, Escudero T, Levy B, Hirschhorn K, Delhanty JD, Munné S. First clinical application of comparative genome hybridization and polar body testing for preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Fertil Steril*. 2002;78:543-9.
24. Fishel S, Gordon A, Lynch C, Dowell K. Live birth after polar body array comparative genome hybridization prediction of embryo ploidy. The future of IVF? *Fertil Steril*. 2010;93, 1006.e7-1006.e10.
25. Fragouli E, Wells D, Delhanty JD. Chromosome abnormalities in the human oocyte. *Cytogenet Genome Res*. 2011;133:107-18.
26. Wilton L, Voullaire L, Sargeant P, Williamson R, McBain J. Preimplantation aneuploidy screening using comparative genomic hybridization of fluorescence in situ hybridization of embryos from patients with recurrent implantation failure. *Fertil Steril*. 2003;80:860-8.
27. Fragouli E, Alfarawati S, Daphnis DD, Goodall NN, Mania A, Griffiths T, et al. Cytogenetic analysis of human blastocysts with the use of FISH, CGH and aCGH: scientific data and technical evaluation. *Hum Reprod*. 2010;26:480-90.
28. Wells D, Alfarawati S, Fragouli E. Use of comprehensive chromosomal screening for embryo assessment: microarrays and CGH. *Mol Hum Reprod*. 2008;14:703-10.
29. Schoolcraft WB, Fragouli E, Stevens J, Munné S, Katz-Jaffe MG, Wells D. Clinical application of comprehensive chromosomal screening at the blastocyst stage. *Fertil Steril*. 2010;94:1700-6.
30. Hellani A, Coskun S, Tbakhi A, Al-Hassan S. Clinical application of multiple displacement amplification in preimplantation genetic diagnosis. *Reprod Biomed Online*. 2005;10:376-80.
31. Burlet P, Frydman N, Gigarel N, Kerbrat V, Tachdjian G, Feyerisen E, et al. Multiple displacement amplification

- improves PGD for fragile X syndrome. *Mol Hum Reprod*. 2006;12:647–52.
32. Lledó B, Ten J, Galán FM, Bernabeu R. Preimplantation genetic diagnosis of Marfan syndrome using multiple displacement amplification. *Fertil Steril*. 2006;86:949–55.
 33. Fiegler H, Geigl JB, Langer S, Rigler D, Porter K, Unger K, et al. High resolution array-CGH analysis of single cells. *Nucleic Acids Res*. 2007;35:e15.
 34. Renwick PJ, Lewis CM, Abbs S, Ogilvie CM. Determination of the genetic status of cleavage-stage human embryos by microsatellite marker analysis following multiple displacement amplification. *Prenat Diagn*. 2007;27:206–15.
 35. Ren Z, Zhou C, Xu Y, Deng J, Zeng H, Zeng Y. Mutation and haplotype analysis for Duchenne muscular dystrophy by single cell multiple displacement amplification. *Mol Hum Reprod*. 2007;13:431–6.
 36. Rawe V, Cuzzi J. La CGH conarrays (aCGH) para todos los cromosomas: un concepto avanzado para el diagnóstico genético preimplantatorio. *Reproduccion*. 2012;27:96–100.
 37. Munné S, Sandalinas M, Escudero T, Velilla E, Walmsley R, Sadowy S, et al. Improved implantation after preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *Reprod Biomed Online*. 2003;7:91–7.
 38. Munné S, Fischer J, Warmer A, Chen S, Zouves C, Cohen J, et al. Preimplantation genetic diagnosis significantly reduces pregnancy loss in infertile couples: a multicenter study. *Fertil Steril*. 2006;85:326–32.
 39. Colls P, Escudero T, Cekleniak N, Sadowy S, Cohen J, Munné S. Increased efficiency of preimplantation genetic diagnosis for infertility using “no result rescue”. *Fertil Steril*. 2007;88:53–61.
 40. Munné S, Sultan KM, Weier HU, Grifo JA, Cohen J, Rosenwaks Z. Assessment of numeric abnormalities of X, Y, 18, and 16 chromosomes in preimplantation human embryos before transfer. *Am J Obstet Gynecol*. 1995;172 4 Pt 1:119199.
 41. Harper JC, Sengupta SB. Preimplantation genetic diagnosis: state of the ART 2011. *Hum Genet*. 2012;131:175–86.
 42. Schoolcraft WB, Gardner DK, Lane M, Schlenker T, Hamilton F, Meldrum DR. Blastocyst culture and transfer: analysis of results and parameters affecting outcome in two in vitro fertilization programs. *Fertil Steril*. 1999;72:604–9.
 43. McArthur SJ, Leigh D, Marshall JT, de Boer KA, Jansen RP. Pregnancies and live births after trophoctoderm biopsy and preimplantation genetic testing of human blastocysts. *Fertil Steril*. 2005;84:1628–36.
 44. Evsikov S, Verlinsky Y. Mosaicism in the inner cell mass of human blastocysts. *Hum Reprod*. 1998;13:3151–5.
 45. Magli MC, Jones GM, Gras L, Gianaroli L, Korman I, Trounson AO. Chromosome mosaicism in day 3 aneuploid embryos that develop to morphologically normal blastocysts in vitro. *Hum Reprod*. 2000;15:1781–6.
 46. 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;16:1954–8.
 47. Bielanska M, Tan SL, Ao A. Chromosomal mosaicism throughout human preimplantation development in-vitro: incidence, type, and relevance to embryo outcome. *Hum Reprod*. 2002;17:413–9.
 48. Santos MA, Teklenburg G, Macklon NS, Van Opstal D, Schuring-Blom GH, Krijtenburg PJ, et al. The fate of the mosaic embryo: chromosomal constitution and development of day 4, 5 and 8 human embryos. *Hum Reprod*. 2010;25:1916–26.
 49. Coonen E, Derhaag JG, Dumoulin JC, Van Wissen LC, Bras M, Janssen M, et al. Anaphase lagging mainly explains chromosomal mosaicism in human preimplantation embryos. *Hum Reprod*. 2004;19:316–24.
 50. Munné S, Bahçe M, Sandalinas M, Escudero T, Márquez C, Velilla E, et al. Differences in chromosome susceptibility to aneuploidy and survival to first trimester. *Reprod Biomed Online*. 2004;8:81–90.
 51. Silber S, Escudero T, Lenahan K, Abdelhadi I, Kilani Z, Munné S, et al. Chromosomal abnormalities in embryos derived from testicular sperm extraction. *Fertil Steril*. 2003;79:30–8.
 52. Platteau P, Staessen C, Michiels A, Tournaye H, Van Steirteghem A, Liebaers I, et al. Comparison of the aneuploidy frequency in embryos derived from testicular sperm extraction in obstructive and non-obstructive azoospermic men. *Hum Reprod*. 2004;19:1570–4.
 53. Donoso P, Platteau P, Papanikolaou EG, Staessen C, Van Steirteghem A, Devroey P. 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;21:2390–5.
 54. Munné S, Ary J, Zouves C, Escudero T, Barnes F, Cinioglu C, Ary B, Cohen J, et al. Wide range of chromosome abnormalities in the embryos of young egg donors. *Reprod Biomed Online*. 2006;12:340–6.
 55. Tiitinen A, Halttunen M, Härkki P, Vuoristo P, Hyden-Granskog C. Elective single embryo transfer: the value of cryopreservation. *Hum Reprod*. 2001;16:1140–4.
 56. Dhont M. Single-embryo transfer. *Semin Reprod Med*. 2001;19:251–8.
 57. Adamson D, Baker V. Multiple births from assisted reproductive technologies: a challenge that must be met. *Fertil Steril*. 2004;81:517–22.
 58. Varghese AC, Nagy ZP, Agarwal A. Current trends, biological foundations and future prospects of oocyte and embryo cryopreservation. *Reprod Biomed Online*. 2009;19:126–40.
 59. Stillman RJ, Richter KS, Banks NK, Graham JR. Elective single embryo transfer: a 6-year progressive implementation of 784 single blastocyst transfers and the influence of payment method on patient choice. *Fertil Steril*. 2009;92:1895–906.
 60. 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.
 61. Strömberg B, Dahlquist G, Ericson A, Finnström O, Köster M, Stjernqvist K. Neurological sequelae in children born after in-vitro fertilisation: a population-based study. *Lancet*. 2002;359:461–5.
 62. Pinborg A, Loft A, Schmidt L, Andersen AN. 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;18:1234–43.
 63. 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*. 2010;94:936–45.
 64. Patchava S, Gelbaya TA, Nardo LG. Managing the complications associated with assisted reproductive technologies. *Minerva Ginecol*. 2009;61:347–55.