



## PREIMPLANTATION GENETIC SCREENING OF EMBRYOS IN THE PROCESS OF IN VITRO FERTILIZATION - PILOT STUDY

### PREIMPLANTACIONI GENETSKI SKRINING EMBRIONA U PROCESU VANTELESNE OPLODNJE - PILOT STUDIJA

Ivana Stojić<sup>1,2</sup>, Jelena Vukosavljević<sup>1,3</sup>, Slobodan Maričić<sup>1,4</sup>, Miloš Vuković<sup>1,5</sup>,  
Stefan Stojanoski<sup>1,5</sup>, Aleksandra Trninić Pjević<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup> Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Novi Sad, Srbija

<sup>2</sup> Klinički centar Vojvodine, Klinika za radiologiju, Novi Sad, Srbija

<sup>3</sup> Klinički centar Vojvodine, Klinika za ginekologiju i akušerstvo, Novi Sad, Srbija

<sup>4</sup> Institut za onkologiju Vojvodine, Novi Sad, Srbija

<sup>5</sup> Institut za onkologiju Vojvodine, Centar za imidžing dijagnostiku, Novi Sad, Srbija

**Correspondence:** ivana.stojic@mf.uns.ac.rs

#### Abstract

**Introduction:** Ever since the first successful *in vitro* conception was made, the selection of the most competent embryos for transfer was the primary focus of research in this domain. The main cause of implantation failure and pregnancy loss is the presence of aneuploidy. It has been proposed that the performance of the *in vitro* fertilization (IVF) can be improved by selection and transfer of the embryo without chromosomopathy. This method is known as Preimplantation Genetic Screening (PGS).

**Aim:** The aim of our study was to determine the clinical significance of the array comparative genomic hibridization (array CGH) within the PGS and the possibility of routine application of PGS to determine the existence of aneuploidy within the embryos obtained in IVF procedure.

**Material and methods:** We performed partly both retrospective and prospective study on 25 patients who underwent an IVF with PGS in the Clinic for Gynaecology and Obstetrics, Clinical Center of Vojvodina, from March 2015 to February 2016. Embryo biopsy was done first, and then the samples were sent to the Institute for Health Protection of Children and Youth of Vojvodina, where array CGH method was performed.

**Results:** From 109 analyzed samples, 63 were successfully amplified, while 46 were not. From those successfully amplified, 26.98% (17/63) were euploid and 73.02% (46/63) aneuploid. The percentage of aneuploidy was highest in patients in the age group 31-36 years (50%; 23/46). Patients with tubal infertility had the highest rate of aneuploidy (36.9%; 17/46).

**Conclusion:** In our study, aneuploidies were present in a high proportion in patients with tubal sterility and in patients in the age group 31-36 years, which significantly reduces the chance of a successful IVF procedure. Routine screening of embryos for aneuploidies in an IVF procedure would significantly reduce emotional, financial and time losses.

#### Keywords:

*in vitro*  
fertilization,  
preimplantation  
genetic screening,  
aneuploidy,  
array comparative  
genomic  
hibridization



## Sažetak

**Uvod:** Još od prvih uspešnih začeća *in vitro*, odabir najvijabilnijih embriona za transfer je bio primarni fokus istraživanja u oblasti vantelesne oplodnje (VTO). Glavni uzrok neuspeha implantacije i gubitka trudnoće je prisustvo aneuploidije. Smatra se da uspešnost *in vitro* fertilizacije može da bude poboljšana selekcijom i transferom hromozomski normalnih embriona. Ova metoda je poznata kao preimplantacioni genetski skrining (PGS). **Cilj:** Cilj našeg istraživanja je bio da se utvrdi klinički značaj komparativne genomske hibridizacije u formatu mikroniza (eng. *array CGH*) u okviru PGS, kao i mogućnost rutinske primene u cilju detekcije aneuploidija među embrionima dobijenim u postupku vantelesne oplodnje.

**Materijal i metode:** Sprovedena je delom retrospektivna, delom prospektivna studija u koju je uključeno 25 pacijentkinja kod kojih je izvršen postupak vantelesne oplodnje sa PGS na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Vojvodine u periodu od marta 2015. do februara 2016. godine. Učinjena je biopsija embriona, nakon čega su uzorci slati u Institut za zdravstvenu zaštitu dece i omladine Vojvodine, gde je izvođena "array" CGH metoda.

**Rezultati:** Od 109 analiziranih uzoraka, uspešno su amplifikovana 63 uzorka, od kojih je dobijeno 26,98% (17/63) euploidnih i 73,02% (46/63) aneuploidnih embriona. Procenat aneuploidija je bio najviši (50%; 23/46) u starosnoj grupi od 31-36 godina. Kod tubarnog steriliteta procenat aneuploidije je bio najviši (36,9%; 17/46).

**Zaključak:** Pokazano je da su aneuploidije prisutne u visokom procentu kod pacijentkinja sa tubarnim sterilitetom i kod pacijentkinja u starosnoj grupi od 31-36 godina, što značajno snižava šansu za uspešan postupak VTO. Rutinski skrining embriona na aneuploidije u postupku VTO značajno bi smanjio emocionalne, finansijske i vremenske gubitke.

### Ključne reči:

vantelesna oplodnja, preimplantacioni genetski skrining, aneuploidije, komparativna genomska hibridizacija u formatu mikroniza

## Uvod

Još od prvih uspešnih začeća vantelesne oplodnje (VTO), odabir najvijabilnijih embriona za transfer bio je primarni fokus istraživanja u ovoj oblasti. Originalna neinvazivna tehnika, morfološko gradiranje, dugo je bilo metod procene i izbora embriona za transfer (1). U ranoj fazi deljenja za evaluaciju i selekciju embriona za transfer koriste se morfološki parametri, uključujući broj ćelija, procenat fragmentacije, prisustvo i broj jedara, veličinu i simetriju blastomera. U stadijumu blastociste za procenu i gradiranje obično se koriste stepen rasta blastociste, morfologija intracelularne mase (ICM) i trofoektoderma (1,2). Ipak, i pored transfera najboljih embriona, često ne dođe do procesa začeća, dok se, s druge strane, desi da dođe do začeća sa embrionima koji su daleko lošijeg kvaliteta (3,4). Osim toga, morfološka evaluacija obično zahteva posmatranje embriona pod mikroskopom izvan konvencionalnog inkubatora, kada može da dođe do nepoželjnog stresa embriona koji utiče na njegov kvalitet i snižava šansu za uspešan embriotransfer (5,6).

Danas je dobro poznato da je glavni uzrok neuspeha implantacije i gubitka trudnoće prisustvo numeričkih hromozomskih abnormalnosti ili aneuploidije embriona (7). Aneuploidija je najčešća abnormalnost *in vitro* oplodjenih embriona (8) i pokazano je da se učestalost povećava sa starošću majke (9). Stoga se smatra da uspešnost VTO može da bude poboljšana selekcijom hromozomski normalnih embriona. Ova metoda je poznata kao preimplantacioni genetski skrining (PGS). Inicijalna metoda PGS-a podrazumeva korišćenje fluorescentne *in situ* hibridizacije (FISH) na polarna tela, blastomere ili

ćelije trofoektoderma fiksirane na mikroskopskoj pločici. Fluorescentna *in situ* hibridizacija uključuje hibridizaciju specifičnih hromozomskih regiona sa fluorescentno obeleženim DNK (dezoksiribonukleinska kiselina) probama i time se otkriva broj hromozomskih kopija u bilo kojoj fazi ćelijskog ciklusa (10). Danas su dostupne unapređene metode, među kojima je i komparativna genomska hibridizacija u formatu mikroniza (engl. *array comparative genomic hybridization*, aCGH). Analiza pomoću aCGH utvrđuje da li postoji kvantitativno odstupanje (višak ili manjak materijala) u DNK testiranog uzorka. Ovim putem se mogu detektovati aneuploidije i nebalansirane hromozomske translokacije (11,12).

Preimplantacioni genetski skrining se koristi u procesima asistirane reprodukcije kako bi se povećala uspešnost ostvarenih trudnoća transferom euploidnih embriona, te se stoga predlaže ženama starije životne dobi, parovima sa ponavljanim neuspešnim vantelesnim oplodnjama, prethodnim pobačajima ili kod prisustva teškog oblika muškog infertiliteta (13).

Cilj našeg istraživanja je bio da se utvrdi klinički značaj aCGH u okviru PGS-a, kao i mogućnost rutinske primene u cilju detekcije aneuploidija među embrionima dobijenim u postupku vantelesne oplodnje.

## Materijal i metode

### Ispitivana grupa

Na Klinici za ginekologiju i akušerstvo Kliničkog centra Vojvodine sprovedena je delom retrospektivna,

delom prospektivna studija u koju je uključeno 25 pacijentkinja kod kojih je izvršen postupak vantelesne oplodnje sa PGS u periodu od marta 2015. do februara 2016. godine. Kriterijumi za ulazak u studiju su: (i) prethodno učinjena najmanje dva neuspešna postupka VTO, (ii) najmanje jedan prethodni spontani pobačaj bez utvrđenog uzroka i/ili (iii) starost trudnice > 38 godina.

## Metodologija

Biopsija je započeta ablacijom, tj. otvaranjem zone pelucide putem lasera. Odmah po otvaranju zone pelucide pristupalo se aspiraciji ćelija/polarnog tela putem specijalno dizajnirane pipete za biopsiju. Ukoliko je u pitanju biopsija blastomera, embrion je neposredno pre biopsije podvrgnut delovanju medijuma za biopsiju u čijem sastavu se ne nalaze joni kalcijuma (Ca) i magnezijuma (Mg), čime su oslabljene tesne veze između blastomera u embrionu, što omogućava uspešno odvajanje ćelija. Biopsija blastomera je sprovedena kada je embrion dostigao stadijum 6-8 ćelija (72h ili treći dan kultivacije). Jedna ili dve ćelije blastomere uzete su od embriona provlačenjem kroz otvor na zoni pelucidi. Nakon uzimanja blastomere/a, embrion je vraćen na dalju kultivaciju u inkubator kako bi nastavio dalji rast i razvoj.

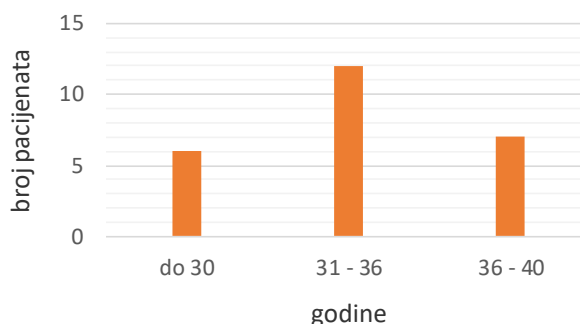
Biopsija embriona u stadijumu blastociste je izvršena jednim od sledeća dva načina: (i) zona pelucida je otvarana laserom trećeg dana i embrion je ostavljen na dalju kultivaciju, za to vreme su ćelije trofoektoderma napredovale prema otvoru jer teže istiskivanju (engl. *hatching*), čime je biopsija ćelija trofoektoderma olakšana, ili (ii) zona je otvarana petog dana kultivacije i to na strani suprotnoj od pozicije intracelularne mase. Nakon kultivacije započeto je istiskivanje ćelija trofoektoderma kroz otvor, čime je olakšano uzorkovanje za analizu.

Blastomere su ispirane u medijumu za ispiranje (*Origio*, Malov, Danska), a zatim u soluciji PBS (rastvor fosfatnog pufera) + PBP (paraformaldehid fosfatni pufer) i odlagane u tube za lančanu reakciju polimerizacije (PCR) od 200 µl. U tube je prethodno stavljeno 2 µl rastvora koji sadrži PBS + PVP (polivinil-pirolidon) i u svaku tubu je dodat po jedan uzorak. Tube za PCR su prethodno sterilisane ultraljubičastim (UV) svetlom. Radi kontrole su korišćene i analizirane i kontrolna tuba koja je sadržala samo navedenu soluciju. Uzorci su zatim poslani u genetsku laboratoriju Instituta za zdravstvenu zaštitu dece i omladine Vojvodine. Primenjena je aCGH metoda koja obuhvata šest koraka: amplifikaciju iz jedne ćelije embriona, obeležavanje, hibridizaciju, ispiranje, skeniranje laserskim skenerom i interpretaciju rezultata. Korišćena je platforma sa imobilisanim probama, tj. DNK fragmentima kloniranim pomoću različitih vektora (*Illumina assey*, San Dijego, SAD). Svaka mikroploča je sadržala 100–200 kb klonova koji pokrivaju čitav genom. Analiza je sprovedena korišćenjem laserskog skenera i „*BlueFuse Multi*“ softvera (San Dijego, SAD). S obzirom na to da je proces potpuno automatizovan, za ceo postupak je bilo potrebno 24h, što znači da je bilo moguće uraditi biopsiju blastomere trećeg dana kultivacije embriona i embriotransfer blastociste petog dana kultivacije,

čime je izbegnuto zamrzavanje embriona. Pacijentkinje su, dakle, u istom ciklusu imale embriotransfer euploidnog embriona.

## Rezultati

Klinička studija je sprovedena kod 25 pacijentkinja, starosti od 27 do 40 godina, prosečne starosti 33,68 ± 2,4 godina (**grafikon 1**). Najviše pacijentkinja (12) bilo je u starosnoj grupi od 31 do 36 godina.



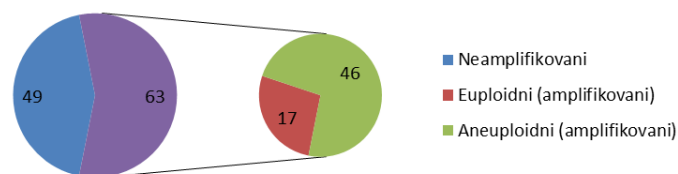
**Grafikon 1.** Uzasna dob pacijentkinja

Najčešći uzrok steriliteta u našem istraživanju je bio idiopatski (28%; 7/25). Sledeći po učestalosti je bio udružen muški i ženski sterilitet sa zastupljenošću od 24% (6/25), a potom muški sterilitet (20%; 5/25). Najčešći ženski uzrok steriliteta je bio tubarnog porekla, sa učestalošću od 12% (3/25). Uzroci steriliteta u ispitivanoj grupi su prikazani u **tabeli 1**.

**Tabela 1.** Uzrok steriliteta kod pacijentkinja

Pacijentkinje n (%)	Uzrok steriliteta
3 (12)	Tubarni sterilitet
2 (8)	PCO (policistični ovarijalni sindrom)
1 (4)	Endometrioza
1 (4)	Uterini sterilitet
7 (28)	Nepoznato
5 (20)	Muški sterilitet
6 (24)	Udruženi muški i ženski sterilitet

Analizirana su 24 polarna tela, 80 blastomera i 5 ćelija trofoektoderma. Od 109 uzoraka, dobijena je uspešna amplifikacija kod 63, odnosno 57,7% (62 blastomere i 1 blastocista). Od uspešno amplifikovanih, dobijeno je 17 euploidnih (26,98%) i 46 aneuploidnih embriona (73,02%) (**grafikon 2**).

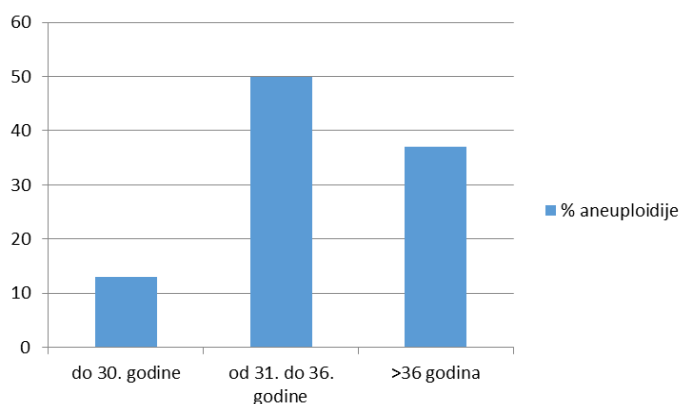


**Grafikon 2.** Prikaz broja amplifikovanih i neamplifikovanih uzoraka

Hromozomski normalni uzorci su dobijeni kod 7 pacijentkinja. Prosečan broj analiziranih uzoraka kod

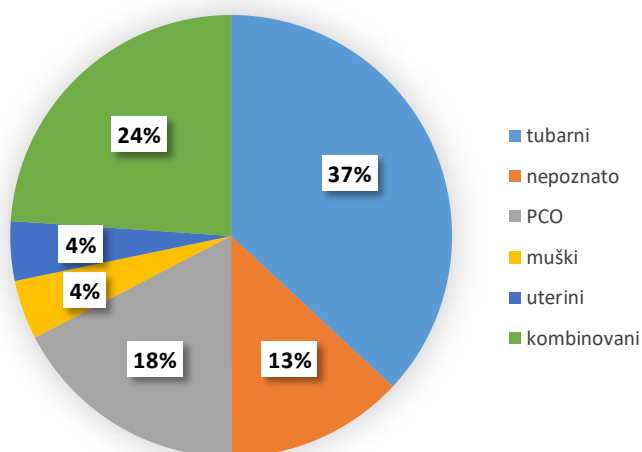
svake pacijentkinje je bio 4,36 (109/25). Broj transferisanih embriona je bio 40, a prosečno je vršen transfer 1-2 embri-ona po pacijentkinji. Ni u jednom od uzoraka nije došlo do kontaminacije stranim DNK materijalom.

U starosnoj grupi do 30 godina procenat aneuploidija je bio 13,04% (6/46), od 31 do 36 godina 50% (23/46), a u grupi preko 36 godina 36,96% (17/46) (**grafikon 3**).



**Grafikon 3.** Procenat aneuploidija u odnosu na starosnu dob pacijentkinja

Najveći procenat aneuploidija od 36,9% (17/46) bio je kod tubarnog steriliteta, dok su kod ostalih oblika steriliteta aneuploidije bile manje zastupljene (**grafikon 4**).



**Grafikon 4.** Procenat aneuploidija u odnosu na vrstu steriliteta

## Diskusija

Hromozomske aneuploidije su najčešći uzrok spontanog prekida trudnoće, kako nakon prirodne koncepcije tako i nakon IVF. Najmanje 40-60% humanih embriona su abnormalni, a taj broj se povećava i do 80% kod žena od 40 ili više godina (14). Ovi podaci su u skladu sa našim istraživanjem, gde je procenat aneuploidija bio 73,02% i povećavao se sa starijim uzrastom pacijentkinja. U našoj studiji dobijen je veći procenat aneuploidija u starosnoj grupi do 36 u odnosu na grupu preko 36 godina, što se može objasniti činjenicom da je najveći broj pacijentkinja pripadao upravo ovoj grupi. U sprovedenim retrospektivnim studijama Fransiaka i saradnika, kao i Rubija i saradnika, procenat abnormalnih embri-ona je rastao proporcionalno starosti pacijentkinja, pa je tako

najmanji bio kod žena starosne dobi od 26 do 37 godina (2-6%), a značajno viši (33%) kod žena sa 42 godine starosti i kod žena sa 44 godine starosti (53%), što je takođe u skladu sa našim rezultatima, gde je najmanji procenat aneuploidnih embriona bio u starosnoj grupi do 30 godina (13,04%) (15,16).

Smernice Američkog društva za reproduktivnu medicinu (ASRM) iz 2014. godine ukazuju na potrebu da se smanji broj embriona transferovanih u procesu VTO. Idealno bi bilo transferovanje samo jednog embriona, s obzirom na to da multiple trudnoće predstavljaju rizik kako po fetus, tako i po majku i imaju znatno veći morbiditet u poređenju sa jednoplodnim trudnoćama (17). Odluka o broju embriona koji će se transferovati zasniva se na kvalitetu embriona i stadijumu razvoja, starosnoj dobi pacijentkinje, odgovoru jajnika na hormonsku stimulaciju i broju prethodnih pokušaja VTO (18,19). U randomiziranoj kliničkoj studiji Formana i saradnika, gde je transferovana samo jedna euploidna blastocista, primećena je značajno manja stopa multiplih trudnoća, dok je stopa jedнопolne trudnoće ostala ekvivalentna kao sa korišćenjem 2 netestirane blastociste (20). Naša studija je sprovedena u skladu sa preporukama ASMR i Evropskog udruženja za humanu reprodukciju i embriologiju (ESHRE), gde je prosečno izvršen transfer 1-2 embri-ona po pacijentkinji.

Metodom PGS dobili smo 26,98% euploidnih embriona, što se slaže sa rezultatima drugih istraživanja (21,22). Najveći procenat aneuploidija, čak 37%, bio je kod tubarnog steriliteta, koji je ujedno i najčešći uzrok neplodnosti.

Treba imati u vidu da je najveći broj studija koja se bave aneuploidijama rađen na embrionima infertilnih pacijenata, nastalim tokom postupaka in vitro fertilizacije. Iz tog razloga su podeljena mišljenja o tome da li je visoka stopa aneuploidija prisutna samo kod infertilnih pacijenata ili je to odraz realnog stanja u čitavoj populaciji.

U našoj studiji su rađene sve tri vrste biopsija: biopsija polarnog tela, biopsija blastomere i blastociste.

Biopsija polarnog tela podrazumeva uklanjanje jednog ili oba polarna tela i omogućava uvid isključivo u genetički status naslednog materijala majke. Veliki nedostatak ovog vida biopsije odnosi se na činjenicu da se informacija o kompletnom genetičkom statusu embriona ne može dobiti zbog stadijuma u kom je izvršena biopsija. Biopsija i analiza polarnog tela može, dakle, pokazati prisustvo aneuploidija u embrionu samo pod uslovom da je njihov nastanak posledica grešaka u mejozi majke (23). Kod naših pacijentkinja nije dobijena amplifikacija ni kod jednog polarnog tela, a uzorkovana su bila 24.

Biopsija blastomera se smatra preciznijom metodom od biopsije polarnih tela i omogućava izbegavanje krioprezervacije embriona ukoliko se za genetičku analizu primenjuju metode koje ne iziskuju više od 48h. Moguće je, međutim, da jedna blastomera nije reprezentativna u odnosu na ostatak embriona. Prednost se zato daje biopsiji trofoblasta u stadijumu blastociste, što odgovara 5. danu razvoja embriona. Uzimanjem više ćelija trofoblasta dobija se više genetičkog materijala, što povećava tačnost

dobijenih rezultata (24,25). Kod nas se, ipak, češće radila biopsija blastomera, čak kod 80 uzoraka, jer postoji rizik da embrion neće dostići fazu blastociste u kultivaciji in vitro, a takođe smo hteli da izbegnemo zamrzavanje embriona koje bismo morali da radimo kod biopsije blastociste.

Preliminarni podaci pokazuju da biopsija blastociste u kombinaciji sa aCGH predstavlja najoptimalniji pristup PGS, uzimajući u obzir sve prethodno navedene prednosti, a posebno implantacioni potencijal (26). Prema Jang (Yang) i sar. stopa kliničkih trudnoća kod pacijentkinja kojima je urađen transfer normalnih blastocista, selektovanih aCGH tehnologijom, iznosila je 69,1%. Stopa kliničkih trudnoća među pacijentkinjama koje su takođe bile uključene u ovu studiju, ali kod kojih nije urađena aCGH analiza, već su embrioni transferisani samo na osnovu morfoloških kriterijuma, iznosila je 41,7% (27). U ovom istraživanju primenjena je aCGH tehnologija koja iziskuje ~ 72h za sprovođenje, te je stoga krioprezervacija nezaobilazna.

Naša studija je dobar primer da se uz uspostavljen efikasan protokol vitifikacije biopsija može nesmetano uraditi 5. dana kultivacije. S obzirom na veliki broj prednosti koje aCGH ima u odnosu na druge metode, kod nas se danas radi upravo ova analiza hromozoma.

Postojalo je nekoliko ograničenja koje treba spomenuti. Pre svega, imali smo relativno mali broj pacijentkinja i kratak period praćenja, s obzirom na to da je PGS nova metoda koja se prvi put implementira u našoj zemlji. I pored toga, rezultati su pokazali veliki značaj i uspešnost PGS-a, odnosno aCGH, u detekciji aneuploidija.

U daljem radu bi trebalo da sprovedemo studiju gde bismo uporedili uspešnost implementacije aCGH i PGS na ishodu postupka IVF, u odnosu na one kod kojih ovaj postupak nije sproveden, kao i u odnosu na njihove ranije neuspešne ishode.

## Zaključak

Informacije dobijene skriningom na aneuploidije od izuzetne su važnosti za pacijentkinje u programu vantelesne oplodnje. Pokazano je da su aneuploidije prisutne u visokom procentu kod pacijentkinja sa tubarnim sterilitetom, koji je ujedno bio i najčešći uzrok steriliteta među našim pacijentkinjama, kao i kod pacijentkinja u starosnoj grupi od 31 do 36 godina, što značajno snižava šansu za uspešan postupak VTO.

U našoj studiji smo pokazali da se biopsija embriona može nesmetano raditi i na 5. dan kultivacije, u stadijumu blastomera, iako preliminarni podaci govore o tome da je najoptimalniji pristup PGS biopsija blastociste u kombinaciji sa aCGH.

Komparativna genomska hibridizacija je pružila uvid u hromozomske greške koje su prisutne u humanim preimplantacionim embrionima i omogućila je detekciju aneuploidija kod embriona pre transfera u matericu, i to sve u roku od 24h, čime je bio omogućen transfer euploidnog embriona u istom ciklusu.

Rutinski skrining embriona na aneuploidije u postupku VTO značajno bi smanjio emocionalne, finansijske

i vremenske gubitke, a ovako selektovani, euploidni embrioni bi doprineli većem broju trudnoća i boljem ishodu postupaka VTO.

## Reference

1. Edwards RG, Purdy JM, Steptoe PC, Walters DE. The growth of human preimplantation embryos *in vitro*. *Am J Obstet Gynecol*. 1981;141(4):408-16.
2. Balaban B, Brison D, Calderon G, Catt J, Conaghan J, Cowan L, et al. Alpha scientists in reproductive medicine and ESHRE special interest group of embryology. The Istanbul consensus workshop on embryo assessment: proceedings of an expert meeting. *Hum Reprod*. 2011;26:1270-83.
3. Yang Z, Salem SA, Liu X, Kuang Y, Salem RD, Liu J. Selection of euploid blastocysts for cryopreservation with array comparative genomic hybridization (aCGH) results in increased implantation rates in subsequent frozen and thawed embryo transfer cycles. *Mol Cytogenet*. 2013;6(1):32.
4. Wintner EM, Hershko-Klement A, Tzadikvitch K, Ghetler Y, Gonen O, Wintner O, et al. Does the transfer of a poor quality embryo together with a good quality embryo affect the *In Vitro* Fertilization (IVF) outcome? *J Ovarian Res*. 2017;10(1):2.
5. Zhang JQ, Li XL, Peng Y, Guo X, Heng BC, Tong GQ. Reduction in exposure of human embryos outside the incubator enhances embryo quality and blastulation rate. *Reprod Biomed Online*. 2010;20(4):510-5.
6. Rodriguez-Purata J, Lee J, Whitehouse M, Duke M, Grunfeld L, Sandler B, et al. Reproductive outcome is optimized by genomic embryo screening, vitrification, and subsequent transfer into a prepared synchronous endometrium. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(3):401-12.
7. Alfarawati S, Fragouli E, Colls P, Stevens J, Gutiérrez-Mateo C, Schoolcraft WB, et al. The relationship between blastocyst morphology, chromosomal abnormality, and embryo gender. *Fertil Steril*. 2011;95(2):520-4.
8. Maurer M, Ebner T, Puchner M, Mayer RB, Shebl O, Oppelt P, et al. Chromosomal aneuploidies and early embryonic developmental arrest. *Int J Fertil Steril*. 2015;9(3):346.
9. Wang S, Kleckner N, Zhang L. Crossover maturation inefficiency and aneuploidy in human female meiosis. *Cell Cycle*. 2017;16(11):1017-9.
10. Wells D, Fragouli E. Preimplantation genetic diagnosis. *Textb Clin Embryol*. 2013;346.
11. Fiorentino F. Array comparative genomic hybridization: its role in preimplantation genetic diagnosis. *Curr Opin Obstet Gynecol*. 2012;24(4):203-9.
12. Lee C-I, Wu C-H, Pai Y-P, Chang Y-J, Chen C-I, Lee T-H, et al. Performance of preimplantation genetic testing for aneuploidy in IVF cycles for patients with advanced maternal age, repeat implantation failure, and idiopathic recurrent miscarriage. *Taiwan J Obstet Gynecol*. 2019;58(2):239-43.
13. Sermon K, Capalbo A, Cohen J, Coonen E, De Rycke M, De Vos A, et al. The why, the how and the when of PGS 2.0: current practices and expert opinions of fertility specialists, molecular biologists, and embryologists. *MHR Basic Sci Reprod Med*. 2016;22(8):845-57.
14. Khajuria R, Rodrigo L, Valbuena D, Rubio C, Simon C. Incidence of chromosomal aneuploidies at embryonic level with comparison based on type of biopsy and maternal age: first indian experience. *Reprod Biomed Online*. 2018;36:e22.
15. Franasiak JM, Forman EJ, Hong KH, Werner MD, Upham KM, Treff NR, et al. The nature of aneuploidy with increasing age of the female partner: a review of 15,169 consecutive trophectoderm biopsies evaluated with comprehensive chromosomal screening. *Fertil Steril*. 2014;101(3):656-63.
16. Rubio C, Bellver J, Rodrigo L, Castillón G, Guillén A, Vidal C, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic diagnosis for aneuploidies in advanced maternal age: a randomized, controlled study. *Fertil Steril*. 2017;107(5):1122-9.

17. Penzias A, Bendikson K, Butts S, Coutifaris C, Fossum G, Falcone T, et al. Guidance on the limits to the number of embryos to transfer: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2017;107(4):901–3.
18. Labs EGG on GP in IVF, De los Santos MJ, Apter S, Coticchio G, Debrock S, Lundin K, et al. Revised guidelines for good practice in IVF laboratories (2015). *Hum Reprod*. 2016;31(4):685–6.
19. van Loendersloot LL, Moolenaar LM, Repping S, Bossuyt PM, Hompes PGA, van der Veen F, et al. Cost-effectiveness of single versus double embryo transfer in IVF in relation to female age. *Eur J Obstet Gynecol Reprod Biol*. 2017;214:25–30.
20. Forman EJ, Tao X, Ferry KM, Taylor D, Treff NR, Scott Jr RT. Single embryo transfer with comprehensive chromosome screening results in improved ongoing pregnancy rates and decreased miscarriage rates. *Hum Reprod*. 2012;27(4):1217–22.
21. Ata B, Kaplan B, Danzer H, Glassner M, Opsahl M, Tan SL, et al. Array CGH analysis shows that aneuploidy is not related to the number of embryos generated. *Reprod Biomed Online*. 2012;24(6):614–20.
22. Fayek HK, Tawab N, Elrahman HA, Demiry Y, Aboulghar M, Serour G, et al. 44. Can PGT-A using array CGH improve IVF clinical results? (The Egyptian IVF-ET center experience). *Reprod Biomed Online*. 2019;39:e54.
23. Capalbo A, Cimadomo D, Rienzi L, Ubaldi FM. Comprehensive Chromosomal Screening from Polar Body Biopsy to Blastocyst Trophectoderm Sampling: Evidences and Considerations. In: *Screening the Single Euploid Embryo*. Springer; 2015. p. 89–102.
24. Victor AR, Griffin DK, Brake AJ, Tyndall JC, Murphy AE, Lepkowsky LT, et al. Assessment of aneuploidy concordance between clinical trophoctoderm biopsy and blastocyst. *Hum Reprod*. 2018;34(1):181–92.
25. Orvieto R, Gleicher N. Should preimplantation genetic screening (PGS) be implemented to routine IVF practice? *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(11):1445–8.
26. Mir P, Mateu E, Mercader A, Herrero R, Rodrigo L, Vera M, et al. Confirmation rates of array-CGH in day-3 embryo and blastocyst biopsies for preimplantation genetic screening. *J Assist Reprod Genet*. 2016;33(1):59–66.
27. Yang Z, Liu J, Collins GS, Salem SA, Liu X, Lyle SS, 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(1):24.