

PGS: Güncel Durum

PGS: Current Status

Muhterem BAHÇE^a

^aMB GENLAB Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi, Ankara

ÖZET

İleri anne yaşı ve kromozomal anöploidi arasındaki ilişki ve bunun üreme üzerine olan olumsuz etkisi uzun yıllardır bilinmektedir. Bu veriler, gerek abort materyallerinden elde edilen sitogenetik analiz sonuçlarından gerekse de ivf embriyolarının analizlerinden elde edilen veriler ile doğrulanmıştır. IVF uygulamalarında implantasyon ve eve sağlıklı bebek götürme oranlarının artırılması için Preimplantasyon Genetik Tarama yönteminin kullanılması gündeme gelmiştir. Bu uygulama ile kromozomal anomalili embriyolarının transferden alınması ve normal embriyoların transferi ile bu sağlanmaya çalışılmıştır. İlk olarak Floresan in Situ Hibridizasyon (FISH) yöntemi ve sınırlı sayıda kromozom analizleri ile taramalar yapılmış ancak elde edilen sonuçlar tatmin edici bulunmamıştır. Günümüzde tüm kromozomların analizine yönelik aCGH ve Yeni Nesil Dizileme gibi test yöntemleri geliştirilmiş ve bu yöntemler ile taranan embriyoların transferi ile daha yüksek implantasyon ve canlı doğum oranları elde edilmeye başlanmıştır. Ancak bu yöntemlerin kullanılması ile ilgili farklı kaynaklardan randomize kontrollü çalışmalar devam etmektedir.

Anahtar Kelimeler: Preimplantasyon genetik tarama; in vitro fertilizasyon; aCGH; SNP array; qPCR; yeni nesil dizileme

ABSTRACT

The relation between advanced maternal age and the aneuploidy rate and the negative impact on fertility has been known for long time. This has been proven from the cytogenetic analysis of the abort material and genetic analysis from the ivf embryos as well. For the aim of improving the implantation and the take home healthy baby rates, preimplantation genetic screening has been introduced to ivf procedures. By this way, it is aimed to transfer the chromosomally normal embryos and eliminate the abnormal ones. Floresant In Situ Hybridization (FISH) technique has been used for this purpose but the results obtained has not been satisfactory. Today, new techniques such as quantitative real time PCR, aCGH and next generation sequencing has been introduced to ivf procedures and after the transfer of the embryos screened with these new technologies, higher implantation and live birth rates have been obtained. But the randomized controlled clinical trials are still ongoing from different groups.

Key Words: Preimplantation genetic screening; in vitro fertilization; aCGH; SNP array; qPCR; next generation sequencing

TJRMS 2017;1(2):99-103

IVF uygulamalarında, FISH yöntemi ile sınırlı sayıda kromozomun taranması ve sonrasında yapılan transferlerden elde edilen sonuçların tatmin edici

düzelelerde bulunmaması ve dahası yapılan işlemlerin başarı oranlarını düşürdüğünün ileri sürülmesi bu alanda çalışan bilim adamlarını yeni analiz yöntemlerinin geliştirmeye yönlendirmiştir.¹ Ge-

Geliş Tarihi/Received: 21.12.2016

Kabul Tarihi/Accepted: 30.12.2016

Yazışma Adresi/Correspondence:

Muhterem BAHÇE

MB GENLAB Genetik Hastalıklar Tanı Merkezi, Ankara, TÜRKİYE/TURKEY

mbahce@genlab.gen.tr

Copyright © 2017 by Üreme Tıbbi Cerrahi Eğitim Araştırma ve Uygulama Vakfı

netik alanında ki bilimsel gelişmeler ve bu gelişmeler sonucu elde edilen teknik olanaklar, hızla IVF alanına aktarılmıştır. Bu kapsamda, X ve Y kromozomları ile 22 otozom kromozomun (24 kromozom) analizine yönelik Preimplantasyon Genetik Tarama (PGS) amacı ile real time kantitatif PCR, aCGH ve yeni nesil dizileme yöntemleri gündeme gelmiştir.²

SNP ARRAY

SNP arrayler insan genomunda 40 milyon kadar olduğu saptanan tek nükleotid polimorfizmlerinin analizine dayanmaktadır. Bu polimorfizmler fonksiyonel fark yaratmayan değişikliklerdir. Dört parental kromozomdaki tek nükleotid farklılıklarının saptanması ve bu verilere dayanarak embriyonik kromozomların tanımlanması ile analizler gerçekleştirilebilmektedir. Bunların analizi genomdaki küçük değişikliklerin saptanmasına ve kromozomal anomalilerin parental kökenlerine ait bilgilerin elde edilmesine de olanak vermektedir. Bu yolla uniparental dizomi gibi genetik anomalilerin saptanması da mümkün olmaktadır. Aynı zamanda bu bilgilerin kullanımı tek gen hastalıkları ve translokasyon olgularında preimplantasyon genetik tanı olanağı sunmakta aynı zamanda da tüm kromozomal anöploidilerin analizine olanak sağlamaktadır. Ancak aynı polimorfizmleri taşıyan kromozomaların varlığı durumunda yöntemin çalışması mümkün olmamaktadır. Benzer şekilde post mitotik anomalilerin neden olduğu mozaik olguların da embriyolarda tanımlanması bu yöntem ile sağlanamamaktadır. Bugün ki bilgilerimiz mitotik anomalilerin neden olduğu embriyonik mozaizmin oldukça önemli olduğunu ortaya koymaktadır.³⁻⁵

REAL TIME KANTİTATİF PCR

Real time PCR yöntemi de SNP arrayler gibi tek nükleotid farklılıklarının belirlenmesi temeli ile çalışmaktadır. Ancak tüm genom DNA amplifikasyonu gereksiz PCR ile hedef SNP bölgelerinin amplifikasyonu ve elde edilen veriler kullanılarak her iki ebeveyninden gelen kromozomların tanımlanması esasına dayanmaktadır. Her bir kromozom için 4 bölge olmak üzere toplam 96 bölge için tek bir PCR tüpü içinde analiz yapıl-

maktadır. Her bir bölge aynı reaksiyonda kontrol ve veri kalitesi açısından dört kez çalışılmaktadır. PCR plate'inin 384 kuyucuklu olması her bir çalışmada sadece iki embriyoya ait örneğin çalışılmasına olanak tanımaktadır. Validasyon çalışmaları oldukça tutarlı veriler sağlamıştır. Dört saat gibi oldukça kısa sürede tüm kromozomların analizini sağlamaktadır. Bu da az sayıda embriyosu olan olgularda aynı siklus içinde transferi mümkün kılmaktadır. Diğer yandan tüm genom amplifikasyonu gerekmemesi ve SNP array yöntemi gibi parental DNA analizi istememesi de avantajları olarak vurgulanabilmektedir. Bununla birlikte, analizin bu kadar sürede sonuçlanabilmesi için sistemin IVF merkezi içinde konuşlanması ve verilerin uzman bir ekip tarafından analizi gerekmektedir. Ayrıca, bir defada sadece iki örneğin aynı anda çalışılabilmesi, cihaz yatırım maliyeti ve sürekli PCR sarflarının transferi gibi konular yöntemin yaygın kullanımını kısıtlamıştır.^{6,7}

ARRAY CGH

Array CGH, farklı eksitasyon ve emisyon dalga boyuna sahip floresan maddeler ile işaretlenmiş test örneği ile normal yapıda olduğu bilinen bir referans DNA'nın mikroskop lamları üzerine yapıştırılan normal bireye ait DNA'dan hazırlanmış arrayler için karşılaştırılmasına dayanmaktadır. Hibridizasyon ve hibridizasyon sonrası yıkama işlemlerinden sonra lamlar lazer tarayıcılar ile analiz edilmekte ve her bir noktadaki floresan sinyaller matematiksel verilere dönüştürülmektedir. Elde edilen veriler özel analiz programları yardımı ile analiz edilmektedir. Bu yöntem, embriyolarda tüm genom amplifikasyonu sonrası 24 kromozomun analizini olası kılan ilk yöntemdir ve tüm dünyada yaygın olarak kullanılmaktadır. Yaklaşık 3000 hedef bölgenin iki kez analizi için hazırlanan arrayler 10 megabazlık değişiklikleri saptama gücüne sahiptir. Bu yolla kromozomların sayı anomalileri kadar yapısal anomalileri de saptanabilmektedir. aCGH yöntemi, dengeli kromozomal düzensizlikleri ve triploidi/tetraploidi tanımlayamamaktadır. Yöntem rutin laboratuvar uygulamalarında 12/24 saat içerisinde sonuç verebilmekte 3. gün biyopsilerinin analizi ve 5. gün transferi ile aynı siklusta transfer olanağını sağlamaktadır.⁸⁻¹⁰

YENİ NESİL DİZİLEME (NEXT GENERATION SEQUENCING)

Yöntem biyopsi ile elde edilen polar body, blastomer veya trofoektoderm örneklerine uygulanabilmektedir. Biyopsi materyalleri daha sonra tüm genom amplifikasyon işlemine alınmakta ve sonrasında 100-200 baz çiftlik parçalara bölünmektedir. Bu işlem sonrasında her bir örneği kimliklendirmek için kısa DNA barkodları eklenmekte ve sonrasında bu DNA dizileri referans alınarak DNA dizilemesi gerçekleştirilmektedir. Yeni diziyeye eklenen her bir nükleotid farklı floresan dalga boyunda bir molekül taşıdığı için ileri görüntüleme teknikleri kullanılarak yeni sentezlenen dizinin nükleotid sekansı elde edilmektedir. Bu işlem aynı anda yüz binlerce DNA molekülü için yapılabilir. Elde edilen dizi referans dizileri ile özel programlar aracılığı ile karşılaştırılmakta ve test örneğine ait dizi elde edilmektedir. Kromozomal anöploidilerin tanımlanması için genellikle genomun %5 kadarının dizilenmesi ile elde edilen veriler yeterli olmaktadır.^{11,12}

MOZAİSİZM

Yukarıda tanımlanan analiz yöntemlerinin hepsi kromozomal anöploidiler için oldukça yüksek doğruluk oranlarına sahiptirler. Bununla birlikte preimplantasyon genetik tarama amaçlı çalışmalarda bugün için önemli zorluklardan birisi embriyonik mozaisizm olarak görünmektedir.¹³ Bugün ki bilgilerimiz gerek klivaj evresinde gerek blastosist evresinde mozaisizmin embriyolarda önemli bir fenomen olduğunu ve analiz sonuçları üzerinde etkili olduğunu göstermektedir. Ayrıca, saptanan mozaisizmin trofoektoderm ile sınırlı mı olduğu yoksa iç hücre kitlesinde de var olup olmadığı son derece önemlidir. Farklı gruplar tarafından yapılan çalışmalarda anöploid hücrelerin trofoektoderm hücre grubuna yönlendirildiği ile ilgili hiçbir bulguya rastlanmamıştır.¹⁴⁻¹⁷ Anöploid embriyoları tümör dokulardaki mekanizmaya benzer şekilde invazyon için gerekli doğal bir fenomen olduğu da ileri sürülmüştür.¹⁸ Ancak, bu embriyonik gelişim evresinde iç hücre kitlesine zarar vermeden bunu saptamak olası görünmemektedir. Dünyada genel eğilim bu embriyoların normal öploid embriyo bu-

lunması halinde transfer edilmemesi yönündedir.¹⁹ Ancak transfer için uygun öploid embriyo bulunmaması durumunda bu mozaik embriyoların transferi konusunda tartışmalar devam etmektedir.²⁰ Her ne kadar mozaik embriyoların transferi sonrası canlı doğumlar bildirilmekte ise de bu olguların ileriki yaşamlarında mozaisizm kaynaklı bir sorun yaşayıp yaşamayacağı bilinmemektedir.²¹ Diğer yandan saptanan mozaisizmlerin, hücre bölünmesinin S fazında yakalanan hücrelere ait yalancı mozaik tanımlamalar olabileceği de bildirilmektedir.¹⁴ Mozaisizm öncelenecek yapılacak çalışmalarda, yeni nesil dizilemeye dayalı platformların kullanımının daha verimli olduğu görülmektedir. Bu yöntemin aCGH yöntemine göre daha hassas şekilde mozaisizmi tanımladığı gösterilmiştir. Yeni nesil dizileme yönteminin kullanılmaya başlanması ile embriyolarda segmental kromozomal anöploidilerin (kromozomun bir kısmını ilgilendiren anöploidiler) tüm hücrelerde olduğu kadar mozaik yapıda da bulunabildiği saptanmıştır.²² Bu bulgu da transfer için seçilecek embriyolar için ilave bir kısıtlama veya tartışmayı gündeme getirmiştir. Transfer için uygun başka öploid embriyo bulunmaması durumunda, hastalara bu embriyolar ile ilgili danışma verilmeli, riskin gerçekleşmesi durumunda oluşabilecek düşük veya anomalili gebelikler gibi olası sonuçlar açıklanmalı ve yazılı onamları alındıktan sonra istemeleri durumunda transfer edilmelidir. İleriki yıllarda bu embriyoların sonuçları ile ilgili veriler incelendiğinde yeni kriterler ile değerlendirmelerin yapılması uygun olacaktır.¹⁹

KLİNİK UYGULAMALAR

IVF merkezinin embriyo biyopsisi için hangi yöntem ve gelişim evresini tercih ettiği de bir önemli faktördür. Hatta bu yöntem aynı merkezde farklı hastalar için de farklılıklar gösterebilmektedir. Üçüncü gün biyopsi yapılan ve blastosist transferi hedeflenen olgularda analiz için yeterli zaman bulunurken, blastosist biyopsisi uygulanan olgularda embriyo dondurma işlemine gereksinim duyulmaktadır. Ancak sınırlı sayıda embriyonun olduğu olgularda bu kez real time kantitatif PCR ile kısa sürede sonuç alınarak transfer aynı siklusta gerçekleştirilebilmektedir. Daha fazla embriyosu olan

ve aynı siklus içinde blastosist transferi hedeflenen olgularda ise en etkin yöntem aCGH gibi görünmektedir. Zira yeni nesil dizileme, laboratuvar işlemleri açısından çok daha uzun zaman almaktadır. Yeni nesil dizileme yönteminin yaygın rutin kullanımı ile ilgili devam eden randomize çalışmaların sonuçları önemli görünmektedir.

Lee ve ark. 2015 yılında yayınladıkları derlemede, pgs ile ilgili yayınlanan randomize, gözlemsel ve prospektif çalışmaları özetlemişlerdir. Eldeki veriler, gerek genç hasta grubunda gerekse de ileri yaş hasta grubunda PGS ve tek embriyo transferinin daha yüksek klinik sonuçlar verdiğini göstermiştir.²³ Forman ve ark. da, tek öploid embriyo transferlerinin ancak iki test edilmemiş embriyo transferi ile aynı oranda canlı doğum sağlayabildiğini randomize çalışma ile göstermişlerdir. Çalışma grubunda daha az gebelik komplikasyonları ve yeni doğan sorunları da yine aynı çalışmada gösterilmiştir. Bu sonuçların, çoğul gebelik komplikasyonlarına bağlı olduğu ileri sürülmüştür.²⁴ Vaiarelli ve ark. da 2016'da yayınladıkları derlemede PGS'in gerek genç hasta grubunda gerekse de ileri yaş hasta grubunda etkili olarak kullanılabileceğini vurgulamışlardır. Ancak hala tekrarlayan implantasyon başarısızlığı ve tekrarlayan gebelik kayıpları ile ilgili randomize kontrollü çalışma bulunmadığını bildirmektedirler. PGS yaklaşımının etkili olarak kullanılabilmesinin de belirli koşullara bağlı olduğunu vurgulamaktadırlar. Bunlar, yüksek standartlarda genetik analiz laboratuvar şartlarının oluşturulması, maksimum sayıda blastosist gelişimi için uygun bir kültür sistemi ve embriyo derecelendirme sistemidir. Diğer yandan etkin bir vitrifikasyon ve çözme protokolünün varlığı ile trofoektoderm biyopsisini yapabilecek yetişmiş embriyologların bulunmasının önemi vurgulanmıştır. Aynı zamanda uygun bir genetik analiz platformu ve genetik analiz ekibi de yanlış pozitif ve negatif hata oranları ile DNA amplifikasyon başarısızlıklarının sınırlandırılması için önemli olduğu vurgulanmıştır.²⁵

MALİYET

Diğer yandan, ülkemizdeki düzenlemeler bu tür testlerin bakanlıkça ruhsatlandırılmış genetik tanı merkezlerince yapılmasını gerektirdiğinden ve bu merkezlerin IVF merkezleri ile aynı ortamda bu-

lunması az sayıda kurum için geçerli olduğundan bu da örnek taşınması ve zaman kaybı gibi sorunları gündeme getirecektir. Ayrıca her bir yöntem için kullanılan teknolojilerin uygulanması için gerekli olan cihaz parkı maliyetinin yüksek olması genetik tanı merkezleri için maliyet sorunları oluşturmaktadır. Bu kapsamda testin hastaya maliyeti de önemli bir faktör olarak değerlendirilmelidir, zira aynı hastanın polar body analizi üçüncü gün biyopsi sayıları ile blastosist sayıları ve buna bağlı olarak maliyetleri de çok farklıdır ve dikkate alınması gerekmektedir. Blastosist biyopsisi uygulanan olgularda, embriyoların gelişimleri senkronize olmadığından farklı günlerde biyopsi gereği ve laboratuvar iş yükü ile biyopsi materyallerinin, analiz laboratuvarına transportu da sorun oluşturmaktadır. Blastosist analizlerindeki bir başka maliyet zorluğu da biyopsi edilen embriyoların kimliklendirilerek tek tek dondurulması zorunluluğudur. Biyopsi sonrası dondurma ve sonraki siklusta transfer protokollerinin uygulandığı sistemlerde aCGH kullanıldığı durumlarda en etkin maliyetin 28 biyopsi örneğinin birlikte çalışılması ile sağlanırken, yeni nesil dizileme platformunda bu sayının 24 örneğin birlikte çalışılması ile en düşük maliyet sağlanmaktadır.

Sonuç olarak PGS amacı ile kullanılan platformların spesifite ve sensitivitesi ile ilgili çalışmalar yöntemlerin büyük oranlarda biri birilerini doğruladığını göstermektedir. Ancak PGS'in hangi olgularda kullanılması gerektiği ile ilgili tartışmalar sürmektedir. İyi cevaplı ileri yaş ve genç hastalarda uygulanması ile ilgili pozitif bildirimler çoğunluktadır. Bu hasta grubunda canlı ve sağlıklı bebek elde etme süresine pozitif katkısı olduğu gösterilmiştir. Diğer yandan anöploid embriyoların neden olduğu medikal, psikolojik ve zaman kayıpları da önlenmektedir. Ayrıca bu hasta grubunda uygulanan tek embriyo politikasının sonucu olarak, çoğul gebelikler ve bunlara bağlı komplikasyonlarda anlamlı oranda azalmıştır. Ancak "poor prognosis", tekrarlayan gebelik kayıpları ve tekrarlayan implantasyon başarısızlıklarında kullanımı tartışmalıdır ve randomize kontrollü çalışmalara ihtiyaç vardır. Mozaisizmden kaynaklanan yanlış pozitif sonuçların, az embriyo geliştirebilen bu hasta grubunda implantasyon ve canlı doğum potansiyeli olan embriyoları transferden alıkoyabileceği ileri sürülmüştür.

KAYNAKLAR

- Mastenbroek S, Twisk M, van Echten-Arends J, et al. In vitro fertilization with preimplantation genetic screening. *New Engl J Med* 2007;357(1):9-17.
- Handyside AH. 24-chromosome copy number analysis: a comparison of available technologies. *Fertil Steril* 2013;100:595-602.
- Treff NR, Su J, Tao X, Levy B, Scott RT Jr. Accurate single cell 24 chromosome aneuploidy screening using whole genome amplification and single nucleotide polymorphism microarrays. *Fertil Steril* 2010;94:2017-21.
- Treff NR, Tao X, Schillings WJ, Bergh PA, Scott RT Jr, Levy B. Use of single nucleotide polymorphism microarrays to distinguish between balanced and normal chromosomes in embryos from a translocation carrier. *Fertil Steril* 2011;96:e58-e65.
- Brezina PR, Benner A, Rechitsky S, Kuliev A, Pomerantseva E, Pauling D, et al. Single-gene testing combined with single nucleotide polymorphism microarray preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy: a novel approach in optimizing pregnancy outcome. *Fertil Steril* 2011;95:1786.e5-8. 27.
- Treff NR, Scott RT Jr. Four-hour quantitative real-time polymerase chain reaction-based comprehensive chromosome screening and accumulating evidence of accuracy, safety, predictive value, and clinical efficacy. *Fertil Steril* 2013;99(4):1049-53.
- Handyside AH. PGD and aneuploidy screening for 24 chromosomes by genome-wide SNP analysis: seeing the wood and the trees. *Reprod Biomed Online* 2011;23:686-91.
- Wells D, Delhanty JD. Comprehensive chromosomal analysis of human preimplantation embryos using whole genome amplification and single cell comparative genomic hybridization. *Mol Hum Reprod* 2000;6:1055.
- Gutiérrez-Mateo, Cristina et al. Validation of microarray comparative genomic hybridization for comprehensive chromosome analysis of embryos. *Fertility and Sterility* 2011;95(3): 953-8.
- Tiegs, A.W., Hodes-Wertz, B., McCulloh, D.H. et al. *J Assist Reprod Genet* 2016;33:893. doi:10.1007/s10815-016-0695-3.
- Yin X, et al. Massively parallel sequencing for chromosomal abnormality testing in trophectoderm cells of human blastocysts. *Biol Reprod* 2013;88(3):69.
- Kung A, Munné S, Bankowski B, Coates A, Wells D. Validation of next-generation sequencing for comprehensive chromosome screening of embryos. *Reproductive BioMedicine Online* 2015;31(6):760-9.
- Delhanty JD, Harper JC, Ao A, Handyside AH, Winston RM. Multicolour FISH detects frequent chromosomal mosaicism and chaotic division in normal preimplantation embryos from fertile patients. *Hum Genet* 1997;99:755.
- Antonio Capalbo, Filippo Maria Ubaldi, Laura Rienzi, Richard Scott, and Nathan Treff: Detecting mosaicism in trophectoderm biopsies: current challenges and future possibilities. *Hum. Reprod.* 2016. doi: 10.1093/humrep/dew250 First published online: October 13, 2016.
- Johnson DS, Cinnioglu C, Ross R, Filby A, Gemelos G, Hill M et al. Comprehensive analysis of karyotypic mosaicism between trophectoderm and inner cell mass. *Mol Hum Reprod* 2010;16:944.
- 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* 2011; 26:480.
- Northrop LE, Treff NR, Levy B, Scott RT Jr. SNP microarray-based 24 chromosome aneuploidy screening demonstrates that cleavage-stage FISH poorly predicts aneuploidy in embryos that develop to morphologically normal blastocysts. *Mol Hum Reprod* 2010;16: 590-600.
- Norbert Gleicher, Andrea Vidali, Jeffrey Braverman, Vitaly A. Kushnir, David H. Barad, Cynthia Hudson, Yang-Guan Wu, Qi Wang, Lin Zhang, David F. Albertini and the International PGS Consortium Study Group. Accuracy of preimplantation genetic screening (PGS) is compromised by degree of mosaicism of human embryos. *Reproductive Biology and Endocrinology* 2016;14:54.
- Sachdev NM, Maxwell SM, Besser AG, Grifo JA. Diagnosis and clinical management of embryonic mosaicism. *Fertil Steril.* 2016. pii: S0015-0282(16)62921-7. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.10.006. [Epub ahead of print]
- Maxwell SM, Colls P, Hodes-Wertz B, McCulloh DH, McCaffrey C, Wells D, Munné S, Grifo JA. Why do euploid embryos miscarry? A case-control study comparing the rate of aneuploidy within presumed euploid embryos that resulted in miscarriage or live birth using next-generation sequencing. *Fertil Steril* 2016. pii: S0015-0282(16)62686-9. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.08.017. [Epub ahead of print]
- Greco E, Minasi MG, Fiorentino F. Healthy babies after intrauterine transfer of mosaic aneuploid blastocysts. *N Engl J Med* 2015;373: 2089.
- Treff NR, Franasiak JM. Detection of segmental aneuploidy and mosaicism in the human preimplantation embryo: technical considerations and limitations. *Fertil Steril* 2016. pii: S0015-0282(16)62870-4. doi: 10.1016/j.fertnstert.2016.09.039. [Epub ahead of print]
- Lee E, Illingworth P, Wilton L, Chambers GM. The clinical effectiveness of preimplantation genetic diagnosis for aneuploidy in all 24 chromosomes (PGD-A): systematic review. *Hum Reprod* 2015;30(2):473-83. doi: 10.1093/humrep/deu303.
- Forman EJ, Hong KH, Franasiak JM, Scott RT., Jr. Obstetrical and neonatal outcomes from the BEST Trial: single embryo transfer with aneuploidy screening improves outcomes after in vitro fertilization without compromising delivery rates. *Am J Obstet Gynecol* 2014; 210(2):157 e1-6. doi: 10.1016/j.ajog.2013. 10.016.
- Vaiarelli A, Cimadomo D, Capalbo A, et al. Pre-implantation genetic testing in ART: who will benefit and what is the evidence? *Journal of Assisted Reproduction and Genetics* 2016;33(10):1273-8. doi:10.1007/s10815-016-0785-2.