

# LA GENETICA EMBRIONARIA E' LA VARIABILE DETERMINANTE PER LA GRAVIDANZA

Luca Gianaroli, M. Cristina Magli, Anna P. Ferraretti

S.I.S.ME.R., Centro di Medicina della Riproduzione, Bologna

*Indirizzo per corrispondenza:* Dott. Luca Gianaroli

S.I.S.ME.R., Centro di Medicina della Riproduzione, Via Mazzini 12, 40138 Bologna

tel: +39 051 307307; e-mail: sismar@sismar.it

## ABSTRACT

The introduction of molecular genetics in reproductive medicine laboratories revolutionized the treatment of patients at high reproductive risk. Besides a continuous updating of the list of disorders for which pre-implantation genetic diagnosis (PGD) can be applied, future developments are in progress towards a wider application of PGD.

The data obtained from the use of PGD for aneuploidy have confirmed an improved clinical outcome in patients with a poor prognosis of pregnancy, leading to a worldwide increased application of the technique. Multicolor FISH on blastomeres biopsied from day 3 embryos still remains the method of choice. The analysis of the most relevant aneuploidies on a single cell, such as those of chromosomes 13, 15, 16, 18, 21, 22, X and Y can be achieved by performing multiple rounds of hybridization. This approach is also applicable to the detection of translocations through a specific combination of telomeric and centromeric probes that permits to identify the embryos generated from unbalanced gametes.

**Key words:** *aneuploidy, pre-implantation diagnosis, genetic disease, traslocation*

## RIASSUNTO

L'introduzione della genetica molecolare nei laboratori di medicina della riproduzione ha rivoluzionato il trattamento delle pazienti ad alto rischio riproduttivo. Il numero di patologie cui la diagnosi genetica pre-impianto (PGD) può essere applicata è in continuo aumento e gli sviluppi futuri tendono verso una sempre più ampia applicazione della metodica.

I dati ottenuti dall'utilizzo della PGD per la diagnosi delle aneuploidie hanno confermato un miglioramento dell'outcome di gravidanza, conducendo così ad una maggior diffusione della tecnica. Il metodo di scelta è rappresentato ancora oggi dalla FISH eseguita su blastomeri prelevati mediante biopsia da embrioni al terzo giorno di coltura. L'analisi delle principali aneuploidie su singola cellula, quali quelle dei cromosomi 13, 15, 16, 18, 21, 22, X ed Y, può essere condotta mediante l'esecuzione di cicli multipli di ibridazione. Questo approccio è utilizzabile anche per la valutazione di traslocazioni cromosomiche attraverso una specifica combinazione di sonde telomeriche e centromeriche e permette di identificare gli embrioni generati da gameti con mutazioni non bilanciate.

**Parole chiave:** *Aneuploidie, diagnosi preimpianto, malattie genetiche, traslocazioni*

## INTRODUZIONE

La medicina della riproduzione ha raggiunto negli ultimi anni progressi scientifici e clinici tali da poter offrire reali possibilità di gravidanza a coppie prima destinate ad una condizione permanente di infertilità. Una delle innovazioni più recenti è rappresentata dalla diagnosi genetica preimpianto (PGD), una metodologia mirata allo screening di malattie a trasmissione genetica o di alterazioni cromosomiche negli embrioni generati in vitro da coppie esposte ad un rischio riproduttivo elevato. La PGD prevede la rimozione di un blastomero da un embrione allo stadio di 6-8 cellule su cui viene effettuata la diagnosi genetica richiesta (Fig. 1). Tale manovra non condiziona la potenzialità di sviluppo dell'embrione e consente di identificare, tra gli embrioni prodotti dalla

coppia, quelli apparentemente esenti dalle patologie geniche o cromosomiche ricercate.

Allo stato attuale, l'applicazione della PGD trova riscontro nella diagnosi di una serie di patologie autosomiche dominanti o recessive, oltre a quelle associate al cromosoma X, anche nel caso di coppie fertili ma a rischio di trasmissione di malattie genetiche (Tabella I). La lista delle patologie in oggetto è in costante aumento in seguito dall'identificazione di nuove sequenze geniche (1).

Un'applicazione particolare della PGD riguarda la diagnosi delle aneuploidie. Lo studio dell'assetto cromosomico dell'embrione ha il duplice scopo di aumentare le possibilità di impianto a termine in gruppi di pazienti con una bassa performance riproduttiva e di ridurre l'insorgenza di gravidanze trisomiche (2, 3). Ciò è dovuto all'incompatibilità con l'impianto o con una gravidanza a termine

**Tabella I. Malattie genetiche diagnosticate mediante PGD**

Acondroplasia	Malattia del core centrale
Agammaglobulinemia	Malattia di Gaucer
Anemia falciforme	Malattia di Charcot-Marie-Tooth 1° e 2A
Anemia di Fanconi	Malattia di Huntington
Atrofia muscolare spinale / bulbare	Malattia di Potter I
ATRX	Malattia di Tay-Sachs
Deficienza di antitripsina a1	MELAS
Deficienza della catena lunga dell'enzima idrossiacil CoA deidrogenasi	Miopia miotubolare legata al cromosoma X
Deficienza dell'enzima ornitina-transcarbamilasi	Neurofibromatosi I e II
Deficienza della proteina trifunzionale mitocondriale	Neoplasia endocrina multipla tipo II
Displasia epifisale multipla	Osteogenesi imperfetta I e IV
Distonia primaria	Poliposi coli adenomatoso familiare
Distrofia miotonica	Retinite pigmentosa
Distrofia muscolare di Becker	Retinoblastoma
Distrofia muscolare di Duchenne	Rhesus (Rh D)
Emofilia A e B	Sclerosi tuberosa
Epidermolisi bullosa	Sindrome di Cruzon
Esclusione HD	Sindrome di Di George
FAP-Gardner	Sindrome di Hunter MPS II
Fenilchetonuria	Sindrome di Lesch-Nyhan
Fibrosi cistica	Sindrome di Marfan
Iidrocefalo legato al cromosoma X	Sindrome oro-facciale-digitale tipo 1
Incontinentia pigmenti	Sindrome di Stickler
Insorgenza precoce malattia di Alzheimer	Sindrome dell' X fragile
Ipertermia maligna	Sindrome di Von Hippel-Lindau
Ipoglicemia iperinsulinemica PHH1	Sindrome di Wiskott-Aldrich
Malattia di Alport	Talassemia

della maggior parte delle aneuploidie (4, 5). Si è così formulata l'ipotesi che il trasferimento di embrioni euploidi, vale a dire portatori di un assetto cromosomico normale, potesse aumentare le possibilità di "bambino in braccio" in coppie predisposte, più di altre, a sviluppare embrioni aneuploidi (6).

## BIOPSIA DELL'EMBRIONE

Embrioni al terzo giorno di coltura e con sviluppo regolare sono selezionati per essere sottoposti a biopsia. Gli embrioni vengono biopsizzati individualmente. Durante il procedimento è necessario porre estrema attenzione a non danneggiare la membrana della cellula rimossa, né quella dei blastomeri circostanti. A biopsia avvenuta, l'embrione viene riposto in coltura mentre le cellule rimosse sono sottoposte all'analisi genetica.

Il trasferimento in utero degli embrioni selezionati viene normalmente effettuato in giorno + 4 o +5, in modo tale da consentire il completamento della diagnosi genica o cromosomica (7).

## PGD PER MALATTIE MONOGENICHE

Il ciclo di trattamento con PGD per malattie monogeniche prevede un'importante fase di preparazione mirata al settaggio del sistema che sarà applicato all'analisi dei blastomeri (8). In questa fase

si procede non solo all'identificazione dei primers necessari ad evidenziare le mutazioni in oggetto, ma anche allo studio di marcatori polimorfici associati al gene, caratteristici di ogni individuo, che consentano di determinare l'avvenuta amplificazione di ogni allele. Si tratta di brevi sequenze oligonucleotidiche ripetute (tra le 2 e le 5 paia di basi per unità) che, in genere, si trovano in regioni non codificanti in prossimità del gene in oggetto, con il quale co-amplificano nel corso di una reazione che si definisce una multiplex PCR. In questo modo è possibile rilevare l'ADO, o allele drop-out, fenomeno che, determinando la mancata amplificazione di uno dei due alleli, potrebbe condurre a una distorsione totale della diagnosi genetica. Qualora almeno due marcatori polimorfici siano disponibili, eventuali episodi di ADO vengono rilevati nel 97% dei casi (9).

Tra le malattie monogeniche analizzate con PGD le più comuni sono la fibrosi cistica, la talassemia, la distrofia muscolare e la sindrome dell'X-fragile. Presso S.I.S.M.E.R., tra l'ottobre 1997 e il dicembre 2003, 23 coppie hanno effettuato 39 cicli di PGD per analizzare mutazioni a carico dei geni

responsabili della fibrosi cistica (15 cicli), talassemia (7 cicli), emofilia (6 cicli), distrofia muscolare di Duchenne (5 cicli), ATRX (1 ciclo), miotonia di Steinert (1 ciclo), retinoblastoma (1 ciclo), distrofia miotonica (1 ciclo), distrofia primaria (1 ciclo) e sindrome di Lesch-Nyhan (1 ciclo).

Come descritto nella Tabella II, una diagnosi è stata prodotta nell'87% degli embrioni analizzati. In accordo alle previsioni basate sull'ereditarietà mendeliana, il 37% degli embrioni è stato classificato come normale mentre il 29% è risultato affetto per la patologia ricercata. Il trasferimento di embrioni è stato effettuato in 32 cicli generando 9 gravidanze cliniche di cui 7 a termine, con 7 bambini nati aventi un genotipo corrispondente a quello previsto in base ai risultati della PGD. La diagnosi prenatale convenzionale è stata sistematicamente raccomandata in caso di gravidanza e in tutti i casi ne è derivata conferma dei risultati ottenuti mediante PGD.

## PGD DELLE ANEUPLOIDIE

L'età della donna è un fattore cruciale nel determinarne la capacità riproduttiva. Con l'aumentare degli anni errori mitotici durante il processo di oogenesi avvengono più frequentemente, esponendo la paziente ad un rischio riproduttivo in aumento proporzionale. Ne conseguono una ridotta potenzialità d'impianto e una

**Tabella II. Risultati in portatori di malattie monogeniche (ottobre 1997 – dicembre 2003).**

N. pazienti	23
N. cicli	39
N. embrioni analizzati	223
N. risultati ottenuti (%)	195 (87)
N. embrioni normali (%)	72 (37)
N. embrioni affetti per la patologia ricercata (%)	57 (29)
N. trasferimenti (%)	32 (82)
N. gravidanze cliniche	9*
(%) per paziente	(39)
(%) per trasferimento	(28)
N. bambini nati	7

\* Tutte le diagnosi effettuate dopo biopsia dell'embrione sono state verificate e confermate mediante successiva diagnosi prenatale.

maggiore incidenza di aborti spontanei associati ad anomalie cromosomiche.

Nel 1996 è iniziato presso S.I.S.ME.R. il programma clinico di PGD per le aneuploidie. Questo approccio terapeutico è stato proposto a coppie la cui partner aveva un'età superiore o uguale a 36 anni: è a questo punto, infatti, che inizia la progressiva riduzione della fertilità. In questo modo la selezione degli embrioni da trasferire nell'utero della paziente si basa non solo sull'aspetto morfologico degli stessi ma anche sul loro assetto cromosomico che riflette, come già accennato, la loro possibilità di dare origine ad una gravidanza a termine.

In seguito sono state individuate ulteriori categorie per le quali si poteva supporre un eventuale beneficio derivato dall'analisi cromosomica pre-impianto, mentre altre sono ancora in via di studio (2, 4).

Di seguito vengono presentati i dati derivati dall'applicazione clinica della PGD delle aneuploidie nel trattamento di pazienti infertili, in riferimento alle diverse categorie studiate.

Pazienti. Tra il settembre 1996 e il dicembre 2003 sono stati eseguiti presso S.I.S.ME.R. 1027 cicli di procreazione medicalmente assistita con PGD delle aneuploidie per le seguenti indicazioni: età materna maggiore o uguale a 36 anni (534 cicli), casi con almeno 3 precedenti cicli di concepimento assistito portati a termine con trasferimento di embrioni ma senza gravidanza (121 cicli), mappe cromosomiche alterate in uno o in entrambi i partners della coppia per la presenza di traslocazioni (84 cicli) o mosaicismi dei cromosomi sessuali (66 cicli), fattore maschile con spermatozoi prelevati dalle vie seminali (87 cicli). I restanti cicli riuniscono una serie di altre indicazioni quali poliabortività, condizione di poor responder, embrioni ottenuti da ovociti crioconservati.

Analisi cromosomica. Il fattore che impone i limiti maggiori alla tecnica, sia in termini di affidabilità che per quanto riguarda il numero di cromosomi da analizzare, è rappresentato dalla disponibilità di una sola cellula per l'analisi cromosomica. Occorre quindi selezionare i cromosomi da studiare. Tale selezione viene effettuata in base alla maggior frequenza di eventi aneuploidi riportati dall'analisi dei materiali abortivi e dei nati con malformazioni. Per questa ragione le cellule prelevate dagli embrioni vengono sottoposte all'indagine per i cromosomi XY, 13, 15, 16, 18, 21 e 22, utilizzando la tecnica di ibridizzazione in situ con sonde fluorescenti (FISH) (Fig. 2). A questo pannello di cromosomi sono state

alternativamente aggiunte, in un secondo ciclo di ibridizzazione, le sonde specifiche per i cromosomi 1, 14 e 17, allo scopo di identificare altri cromosomi le cui alterazioni numeriche, seppur non riportate negli aborti spontanei, possano essere incompatibili con lo sviluppo embrionale.

Risultati. Come riportato nella Tabella III si è ottenuta una

**Tabella III. PGD delle aneuploidie: risultati clinici e di laboratorio.**

	Dati totali
N° cicli	1027
Età (M ± DS)	37.3 ± 3.7
N° embrioni sottoposti a FISH	5139
N° risultati ottenuti (%)	5102 (99)
N° embrioni normali dopo FISH(%)	1676 (33)
N° embrioni anormali dopo FISH(%)	3426 (67)
N° cicli trasferiti (%)	697 (68)
N° embrioni trasferiti (M ± DS)	1.7 ± 0.7
N° gravidanze cliniche (%)	203 (29)
Aborti	35*
Indice d'impianto (%)	20.7

\* Tutte le diagnosi effettuate dopo biopsia dell'embrione sono state verificate e confermate mediante successiva diagnosi prenatale.

diagnosi dopo PGD per 5102 embrioni, con un'efficienza della metodica del 99%. In accordo con i risultati della FISH, il 67% erano portatori di un corredo cromosomico aneuploide. Questa percentuale così elevata ha fatto sì che in 330 casi (32%) il trasferimento di embrioni fosse cancellato per l'assenza di embrioni normali nelle coorti generate. I restanti 697 cicli si sono conclusi con il trasferimento di uno o più embrioni euploidi (1.7 di media), da cui si sono originate 203 gravidanze cliniche (29% per trasferimento) con un indice d'impianto del 20.7%.

La Tabella IV riporta i risultati divisi per indicazione alla PGD: età materna superiore o uguale ai 36 anni, cicli precedenti di concepimento assistito (almeno 3) senza gravidanza, cariotipo alterato dovuto a mosaicismi dei gonosomi, pazienti MESA-TESE con almeno un fallimento precedente. Da questa tabella sono esclusi i dati relativi a quelle indicazioni che sono ancora in via di studio. Nel caso di coppie con età materna superiore o uguale ai 36 anni, solamente il 31% degli embrioni diagnosticati sono risultati portatori di un assetto cromosomico normale per i cromosomi studiati. Almeno un embrione euploide è stato trasferito in 352 cicli, mentre per gli altri 182 cicli sottoposti a PGD (34% dei cicli iniziati) il trasferimento di embrioni non è avvenuto, dal momento che nessun embrione era cromosomicamente normale. Ne sono risultate 91 gravidanze cliniche (26% per trasferimento) con un indice d'impianto del 17.9%. L'analisi dei risultati per classi di età ha messo in evidenza come l'incidenza degli embrioni cromosomicamente anormali aumenti progressivamente in relazione all'età della donna, in modo particolare a partire dal 40° anno di età, fino a valori superiori all'85% dai 43 anni in poi. La percentuale dei cicli in cui è possibile effettuare un trasferimento di embrioni euploidi diminuisce in maniera proporzionale. Tuttavia, almeno fino ai 42 anni compiuti, né il tasso di gravidanze cliniche (calcolato sia per ciclo iniziato che per ciclo trasferito) né l'indice d'impianto accennano a diminuire. Per età più elevate, invece, la performance clinica si abbassa notevolmente (12% di gravidanze cliniche, 7.8% di indice d'impianto).

Tabella IV. PGD delle aneuploidie: risultati suddivisi per indicazione.

	≥ 36 anni	≥ 3 cicli IVF	Mosaicismo gonosomi	MESA-TESE
N° cicli	534	121	66	87
Età (M ± DS)	39.9±2.6	32.7±2.1	34.4±3.9	34.6±4.5
N° embrioni sottoposti a FISH	2693	643	353	383
N° risultati ottenuti (%)	2675 (99)	633	350	381
N° embrioni normali dopo FISH (%)	820 (31)	263 (41)	128 (36)	127 (33)
N° embrioni anormali dopo FISH (%)	1855 (69)	370 (59)	222 (64)	254 (67)
N° cicli trasferiti (%)	352 (66)	97 (80)	49 (74)	57 (65)
N° embrioni trasferiti (M ± DS)	1.7±0.6	2.0±0.9	2.0±0.8	1.5±0.6
N° gravidanze cliniche (%)	91 (26)	37 (38)	25 (51)	14 (25)
Aborti	17*	3**	2	3
Indice d'impianto (%)	17.9	26.3	36.1	18.7

\*2 gravidanze ectopiche - \*\* 1 gravidanza ectopica

Pazienti con almeno 3 cicli precedenti di concepimento assistito esitati nel trasferimento di embrioni che non hanno condotto a gravidanza hanno rivelato un'alta incidenza di anomalie cromosomiche negli embrioni analizzati (59%). Il trasferimento di embrioni diagnosticati normali in seguito a FISH, effettuato in 97 dei 121 cicli iniziati, ha generato 37 gravidanze cliniche (38%), con un indice d'impianto del 26.3%.

La presenza di un cariotipo alterato dovuto a mosaicismo dei cromosomi sessuali espone ad un rischio riproduttivo più elevato della norma. Questa condizione è confermata dall'elevata frequenza di embrioni cromosomicamente anormali, che si attesta su valori del 64%. Dal trasferimento di 49 cicli sono state ottenute 25 gravidanze cliniche (74% dei cicli con prelievo di ovociti), con una percentuale di gravidanza corrispondente al 51% e un indice d'impianto del 36.1%.

Il gruppo designato come MESA-TESE riunisce due condizioni che predispongono queste coppie a scarse probabilità di successo: si tratta di pazienti azoospermici per i quali si è ricorsi al recupero degli spermatozoi dalle vie seminali e che non hanno ottenuto una

Tabella V. PGD in portatori di traslocazioni robertsoniane e reciproche

	Robertsoniane	Reciproche
N. cicli	43	41
Età (M ± SD)	35.6±3.8	37.0±5.2
N. embrioni sottoposti a FISH (%)	214	201
N. embrioni normali o bilanciati dopo FISH (%)	51 (24)a	26 (13)a
N. embrioni anormali dopo FISH (%)	163 (76)b	175 (87)b
N. cicli trasferiti (%)	29 (67)	12 (29)
N. embrioni trasferiti (M ± SD)	1.5±0.7	1.3±0.5
N. gravidanze cliniche (%)	14 (48)	4 (33)
Aborti	5*	2
Indice d'impianto (%)	38.6	25.0

<sup>ab</sup>P<0.01

\*1 aborto dopo amniocentesi (cariotipo fetale normale) e due aborti per trisomia 21 e 22 in due casi analizzati per traslocazione 13;14.

gravidanza dopo almeno un ciclo di concepimento assistito. I risultati dell'analisi FISH indicano anomalie cromosomiche nel 67% degli embrioni analizzati. Il trasferimento è stato effettuato in 57 cicli (65% dei cicli con prelievo di ovociti) generando 14 gravidanze con un indice d'impianto del 18.5%.

I risultati relativi alla PGD in portatori di traslocazioni sono riportati nella Tabella V. L'elevata percentuale di embrioni anormali, particolarmente accentuata nelle traslocazioni reciproche, conferma il rischio riproduttivo a cui sono sottoposti i portatori di tali anomalie strutturali. Nel caso di traslocazioni robertsoniane il 24% degli embrioni analizzati sono cromosomicamente normali o bilan-

ciati. Il 67% dei 43 cicli trattati sono giunti al trasferimento generando 14 gravidanze cliniche di cui 9 regolarmente a termine e 5 esitate in aborto. L'87% degli embrioni generati da portatori di traslocazioni reciproche è cromosomicamente sbilanciato e quindi non trasferibile. Ciò ha fatto sì che il trasferimento di embrioni potesse essere effettuato solo in 12 dei 41 cicli trattati (29%) ottenendo 4 gravidanze. E' pertanto importante sottolineare come, particolarmente in questo gruppo di pazienti, la qualità della risposta alla stimolazione ormonale per induzione della crescita follicolare multipla sia cruciale ai fini di ottenere un numero di embrioni relativamente elevato da sottoporre all'analisi cromosomica.

## CONCLUSIONI

L'analisi dei dati ottenuti su base molecolare conferma come la naturale riduzione della fertilità femminile legata all'avanzare dell'età sia in gran parte dovuta alla presenza di anomalie cromosomiche numeriche. L'effetto "età" è, infatti, drasticamente ridotto dalla applicazione della PGD per le aneuploidie, con percentuali di gravidanze cliniche che, fino ai 42 anni, non si discostano da quelle ottenute in donne giovani (4). Altri fattori che probabilmente intervengono in età più avanzate contribuiscono ad una consistente diminuzione degli indici di successo. Tra questi una recettività uterina alterata o il coinvolgimento di altri cromosomi rispetto a quelli comunemente studiati potrebbero rivestire un ruolo preponderante.

La performance clinica ottenuta nei casi con ripetuti fallimenti in cicli precedenti mette in evidenza l'importanza rivestita da una condizione di disordine cromosomico ai fini della capacità di sviluppo dell'embrione. Tale situazione è ancora più

accentuata nei portatori di un cariotipo alterato per i quali le aneuploidie, totali o parziali, sono di gran lunga più probabili rispetto alla popolazione generale.

Il contributo maschile all'assetto cromosomico dell'embrione è di rilievo nel caso di spermatozoi prelevati direttamente dalle vie seminali ed è possibile che il fattore maschile severo sia associato ad un rischio riproduttivo aumentato dovuto all'insorgere di anomalie cromosomiche generate ex novo. Va, inoltre, tenuto presente che alcune anomalie cromosomiche strutturali e alcune alterazioni geniche, quali mutazioni a carico del gene della fibrosi cistica e microdelezioni del cromosoma Y, hanno una stretta associazione con la condizione d'infertilità maschile. Il ricorso alla PGD per lo screening delle aneuploidie o di malattie monogeniche

potrebbe rappresentare, anche in questo caso, un passo ulteriore nel settore della medicina preventiva. L'elevata percentuale di embrioni non compatibili con un impianto sano nel caso di pazienti ad elevato rischio riproduttivo fa sì che la risposta alla stimolazione ormonale sia di particolare rilievo ai fini di ottenere un numero congruo di embrioni da sottoporre ad analisi genetica. L'importanza dei risultati ottenuti con la diagnosi pre-impianto non deve comunque far dimenticare che la PGD si basa sull'analisi di una o due cellule. Di conseguenza, l'attuale margine di affidabilità obbliga gli operatori del settore ad informare i pazienti sull'efficienza della metodica che attualmente rende la diagnosi prenatale convenzionale necessaria per confermare e completare i risultati ottenuti sull'embrione (10).

## BIBLIOGRAFIA

1. Kuliev A, Verlinsky Y. Thirteen years' experience of preimplantation diagnosis: report of the fifth International Symposium on Preimplantation Genetics. *Reprod BioMed Online* 2004; 8:229-35.
2. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, et al. Preimplantation genetic diagnosis increases the implantation rate in human in vitro fertilization by avoiding the transfer of chromosomally abnormal embryos. *Fertil Steril* 1997; 68:1128-31.
3. Munné S, Magli MC, Bahçe M, et al. Preimplantation diagnosis of the aneuploidies most commonly found in spontaneous abortions and live births: X, Y, 13, 14, 15, 16, 18, 21, 22. *Prenat Diagn* 1998; 18:1459-66.
4. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP, et al. Preimplantation diagnosis for aneuploidies in patients undergoing in vitro fertilization with a poor prognosis: identification of the categories for which it should be proposed. *Fertil Steril* 1999; 72:837-44.
5. Munné S, Magli MC, Cohen J, et al. Positive outcome after preimplantation diagnosis of aneuploidy in human embryos. *Hum Reprod* 1999; 14:2191-9.
6. Gianaroli L, Magli MC, Fiorentino F, et al. Clinical value of preimplantation genetic diagnosis. *Placenta* 2003; 24:77-83.
7. Gianaroli L, Magli MC, Munné S, et al. Advantages of day 4 embryo transfer in patients undergoing preimplantation genetic diagnosis of aneuploidy. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16:170-5.
8. Fiorentino F, Magli MC, Podini D, et al. The minisequencing method: an alternative strategy for preimplantation genetic diagnosis of single gene disorders. *Mol Hum Reprod* 2003; 9:399-410.
9. Rechitsky S, Strom C, Verlinsky Y. Accuracy of preimplantation diagnosis of single-gene disorders by polar body analysis of oocytes. *J Assist Reprod Genet* 1999; 16:192-8.
10. Gianaroli L, Magli MC, Ferraretti AP. The in vivo and in vitro efficiency and efficacy of PGD for aneuploidy. *Mol Cell Endocrinol* 2001; 183:13-8.