

LUIZ MAURO OLIVEIRA GOMES¹

APARECIDA DOS SANTOS CANHA²

ARTUR DZIK³

NEIL FERREIRA NOVO⁴

YARA JULIANO⁴

SANDRA IRENE SPROGIS DOS SANTOS⁵

MARIO CAVAGNA⁶

A idade como fator prognóstico nos ciclos de fertilização *in vitro*

The age as a predictive factor in in vitro fertilization cycles

Artigo original

Palavras-chave

Fertilização *in vitro*
Fertilização *in vitro*/estatística & dados numéricos
Fatores etários
Transferência embrionária
Taxa de gravidez
Prognóstico

Keywords

Fertilization *in vitro*
Fertilization *in vitro*/statistics & numerical data
Age factors
Embryo transfer
Pregnancy rate
Prognosis

Resumo

OBJETIVO: avaliar a idade da paciente como fator indicador de resultados em um programa de fertilização *in vitro*.

MÉTODOS: estudo transversal que incluiu 302 mulheres, com idade variando entre 24 e 46 anos, submetidas ao tratamento com fertilização *in vitro* (FIV), no período de Maio de 2005 a Julho de 2007. As pacientes foram divididas em três grupos, de acordo com a faixa etária: G \leq 35 (n=161), G36-39 (n=89) e G \geq 40 (n=52). Foram avaliados: número de oócitos aspirados, taxas de fertilização, número de embriões transferidos, qualidade embrionária e taxas de gravidez. A análise estatística foi realizada pela análise de variância de Kruskal-Wallis e pelo teste do χ^2 .

RESULTADOS: no Grupo G \leq 35, obteve-se a média de 8,8 oócitos por paciente; no Grupo G36-39, a média foi de 7,4 oócitos por paciente; e no Grupo G \geq 40, 1,6 oócitos por paciente. O número de oócitos obtidos no Grupo G \geq 40 foi significativamente menor que nos Grupos G \leq 35 e G36-39 (p<0,001). As taxas de fertilização nos três grupos foram semelhantes: 61,4%, 65,8% e 64,6%, respectivamente (p=0,2288). O percentual de embriões de boa qualidade também não foi estatisticamente diferente entre os grupos estudados, encontrando-se, respectivamente, taxas de 57,4%, 63,2% e 56,0% (p=0,2254). O número médio de embriões transferidos em cada grupo foi de 3,1 (G \leq 35), 2,8 (G36-39) e 1,5 (G \geq 40), havendo redução estatisticamente significativa no Grupo G \geq 40 (p<0,001). Com relação às taxas de gravidez, o Grupo G \geq 40 apresentou taxa de 9,6%, resultado significativamente inferior (p=0,0339) aos Grupos G \leq 35 e G36-39 (26,1 e 27,0%, respectivamente), que não apresentaram diferenças significantes entre si.

CONCLUSÕES: embora a qualidade embrionária, do ponto de vista morfológico, não seja diferente entre mulheres de diferentes faixas etárias, o número de oócitos coletados, o número de embriões transferidos e as taxas de gravidez confirmam que a idade da mulher é um importante fator preditivo das taxas de sucesso das técnicas de reprodução assistida e deve ser levada em consideração no momento da proposta desse tipo de tratamento para mulheres com mais de 40 anos.

Abstract

PURPOSE: to evaluate the patient's age as an outcome predictor in an *in vitro* fertilization (IVF) program. **METHODS:** transversal study, which has included 302 women with ages varying from 24 to 46 years old, submitted to IVF, from May 2005 to July 2007. The patients were divided in three groups, according to their age: G \leq 35 (n=161), G 36-39 (n=89) e G \geq 40 (n=52). The number of collected oocytes, the fertilization rates, the number of transferred embryos, the embryony quality and the pregnancy rate were evaluated. Statistical analysis was realized through Kruskal-Wallis variance analysis and χ^2 test. **RESULTS:** in the G \leq 35 group, an average of 8.8 oocytes by patient was obtained; in the G 36-49 group, 7.4; and in the G \geq 40 group, 1.6. The number of oocytes obtained in G \geq 40 group was significantly lower than in the other two groups (p<0.001). The fertilization rate was similar in the three groups, 61.4, 65.8 e 64.6% (p=0.2288), respectively. The percentage of good quality embryos was not statistically different among the three groups either, with rates of 57.4 and 56.0% (p=0.2254), respectively. The average number of transferred embryos in each group was 3.1 (G \leq 35), 2.8 (G 36-39) and 1.5 (G \geq 40), respectively, with statistically significant decrease in the G \geq 40 group (p<0.001). Concerning pregnancy rates, the G \geq 40 group has presented a rate of 9.6%, a result which is significantly lower (p=0.0330) than the one presented by the G \leq 35 and G 36-39

Correspondência:

Luiz Mauro Oliveira Gomes
Rua Carlos Stoppa, 55 – Central Parque
CEP 12080-150 – Taubaté (SP), Brasil
Fone/Fax: (12) 3413-4912/(12) 8129-7477
E-mail: maurogomes@reproferty.com.br

Recebido

4/12/08

Aceito com modificações

18/5/09

Divisão de Reprodução Humana do Centro de Referência da Saúde da Mulher do Hospital Pérola Byington – São Paulo (SP), Brasil.

¹ Diretor do Laboratório de Embriologia da Clínica Reproferty – São José dos Campos (SP), Brasil.

² Embriologista da Divisão de Reprodução Humana do Centro de Referência da Saúde da Mulher – São Paulo (SP), Brasil.

³ Diretor Técnico de Núcleo de Saúde (Esterilidade Conjugal) da Divisão de Reprodução Humana do Centro de Referência da Saúde da Mulher – São Paulo (SP), Brasil.

⁴ Professor Titular da Faculdade de Medicina de Santo Amaro – São Paulo (SP), Brasil.

⁵ Pesquisadora Científica do Instituto Adolfo-Lutz – IAL – São Paulo (SP), Brasil.

⁶ Diretor da Divisão de Reprodução Humana do Centro de Referência da Saúde da Mulher – São Paulo (SP), Brasil; Coordenador do Programa de Pós-graduação em Reprodução Humana Assistida do Instituto Sapiientiae – São Paulo (SP), Brasil.

groups (26.1 e 27.0%, respectively), with no significant difference between themselves. **CONCLUSIONS:** though the embryonary quality is not different among women from different age groups, the number of collected oocytes, the number of transferred embryos and the pregnancy rate indicate that the women's age is an important predictive factor of success for the techniques of assisted reproduction and should be taken into consideration when this kind of treatment is proposed to women over 40.

Introdução

Existe uma tendência mundial entre as mulheres de retardar a maternidade. Isso é demonstrado pelo fato de que o número de gestações entre as mulheres de 40 e 44 anos quase duplicou entre 1990 e 2002¹. O avanço da idade é considerado um fator determinante da fertilidade nas fêmeas de mamíferos, havendo diminuição na reserva ovariana e prejuízo na qualidade oocitária acompanhada de alterações cromossômicas². Os resultados menos satisfatórios observados nas técnicas de reprodução assistida (TRA) em mulheres com mais de 40 anos se devem à redução nas taxas de implantação, aumentos nos índices de abortos espontâneos, baixa resposta ao processo de estimulação ovariana e má qualidade dos oócitos coletados; saliente-se que o folículo ovariano é o principal alvo do envelhecimento reprodutivo na mulher, não havendo problemas uterinos relacionados à idade^{3,4}. O número de folículos ovarianos em uma mulher é de seis a sete milhões entre 18 e 20 semanas da vida fetal, decaindo para um a dois milhões ao nascimento. No momento da menarca, a mulher apresenta 300.000 a 400.000 folículos, que diminuem para o número crítico de 25.000 folículos aos 38 anos de idade; aos 50 anos de idade, a mulher atinge o número aproximado de 1.000 folículos⁵.

A diminuição da fertilidade feminina ocorre à medida que a idade aumenta, observando-se uma piora a partir dos 35 anos, que se acentua a partir dos 40 anos de idade⁶. Investigação realizada em nosso meio demonstra que, em tratamentos com TRA, as taxas de gestação apresentam significativa redução a partir de 30 anos de idade⁷. A influência da idade é muito mais significativa nas mulheres do que nos homens, nos quais a idade superior a 40 anos não parece ter influência significativa na qualidade embrionária e nas taxas de implantação⁸.

Na literatura, há discussões a respeito de qualidade embrionária e capacidade de implantação de embriões das mulheres com idade avançada. Postula-se que níveis de FSH poderiam ser mais importantes do que a idade⁹, enquanto há estudos que referem que a porcentagem de embriões aneuploides aumenta com a idade, mas não com os níveis de FSH¹⁰. Há, igualmente, registros mostrando que a idade é o principal fator prognóstico para a obtenção de gravidez, e que embriões de mulheres com mais de 40 anos apresentam maior incidência de aneuploidias, mesmo que se apresentem normais do ponto de vista morfológico¹¹⁻¹³.

A presente investigação teve como objetivo colaborar com o estudo dos resultados das TRA de acordo com a idade das pacientes, verificando-se as taxas de fertilização, qualidade dos embriões do ponto de vista morfológico e correlacionando-os com as taxas de gravidez em diferentes faixas etárias.

Métodos

Foi realizado um estudo transversal retrospectivo, analisando-se os resultados de TRA em 302 mulheres, com idade variando entre 24 e 46 anos. O estudo foi desenvolvido no período de Maio de 2005 a Julho de 2007. Nesse período, foram estudados todos os ciclos de fertilização *in vitro*, consecutivos, excluindo-se apenas as eventuais repetições. Todas as pacientes tinham indicação para TRA de alta complexidade, com a seguinte distribuição: fator tubo-peritoneal (39,7%); fator masculino (32,4%); endometriose (19,2%); outras causas (8,6%).

As pacientes foram divididas em grupos: G \leq 35 (n=161): até 35 anos de idade; G36-39 (n=89): de 36 a 39 anos de idade; e G \geq 40 (n=52): 40 anos de idade ou mais.

Nos três grupos, os seguintes parâmetros foram avaliados: número total de pacientes que obtiveram embriões para transferência e que foram submetidas a teste de gravidez positivo (dosagem sérica de β -hCG); taxa de fertilização (número total de oócitos fertilizados/número total de oócitos inseminados); número médio de oócitos aspirados (número total de oócitos aspirados/número total de pacientes por idade); número médio de embriões transferidos (número total de embriões transferidos/número total de pacientes por idade); número de embriões considerados de boa qualidade (classe I e classe II); taxa de gravidez (β -hCG positivo/número total de pacientes por idade).

Para classificar a qualidade dos embriões, foram adotados os critérios de Veeck¹⁴, quais sejam: classe I: blastômeros regulares, sem fragmentação; classe II: blastômeros regulares, (<10% de fragmentação); classe III: blastômeros regulares ou irregulares, (>20 e <40% de fragmentação); classe IV: blastômeros regulares ou irregulares, (40% de fragmentação); e classe V: blastômeros irregulares (>50 % de fragmentação).

Todas as pacientes foram submetidas a protocolo de estimulação ovariana controlada com bloqueio longo do eixo hipotálamo-hipofisário mediante a administração de análogo agonista do GnRH na forma de depósito (acetato

de leuprolide 3,75 mg) entre o 18º e o 22º dia do ciclo menstrual. Após 14 a 20 dias do bloqueio, iniciou-se a estimulação ovariana, com o emprego de administração diária de 150 UI de gonadotropinas urinárias ou recombinantes (Gonal F® Serono, Brasil; Puregon®, Organon, Brasil; Merional®, Meizler, Brasil) em pacientes com menos de 35 anos, e 225 ou 250 UI de gonadotropinas urinárias ou recombinantes em pacientes com 35 anos ou mais. O desencadeamento da maturação folicular final foi realizado com 10.000 UI de gonadotropina coriônica humana (hCG), na presença de folículos com diâmetro máximo ≥ 17 mm. A aspiração folicular foi realizada por via ultra-sonográfica, sob sedação, 35-36 horas após o hCG.

Para a análise estatística, foi aplicada a análise de variância de Kruskal-Wallis¹⁵, com o objetivo de comparar os três grupos ≤ 35 (A); 36 a 39 (B) e ≥ 40 (C) em relação a um número médio de oócitos e de embriões transferidos. Também foi utilizado o teste do χ^2 ¹⁰ com a finalidade de comparar os grupos A, B e C em relação às porcentagens de fertilização, gravidez positiva e classificação embrionária. Em todos os testes, fixou-se em 0,05 o nível de significância.

Este trabalho foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Pérola Byington (Centro de Referência da Saúde da Mulher) e obteve parecer favorável.

Resultados

No Grupo $G \leq 35$, foram obtidos 1.423 oócitos (média: 8,8 por paciente); no Grupo $G 36-39$, foram coletados 658 oócitos (média: 7,4 por paciente) e no Grupo $G \geq 40$, 81 oócitos (média: 1,6 por paciente). O número de oócitos obtidos no Grupo $G \geq 40$ foi significativamente menor do que nos Grupos $G \leq 35$ e $G 36-39$, que não diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,001$), conforme Tabela 1.

O número médio de embriões transferidos por grupo foi: $G \leq 35$ (3,1), $G 36-39$ (2,8) e $G \geq 40$ (1,5). No $G \leq 35$ houve maior número médio de embriões transferidos do que nos Grupos $G 36-39$ e $G \geq 40$, os quais não diferiram estatisticamente entre si ($p < 0,001$) (Tabela 1).

As taxas de fertilização, nos três grupos, foram, respectivamente, 61,4%, 65,8% e 64,6% e não houve

diferenças significantes entre os grupos ($p=0,2$), de acordo com a Tabela 2. As taxas de embriões classes I e II foram, no $G \leq 35$, 57,4% (334 embriões); no $G 36-39$, 63,2% (180 embriões); e no $G \geq 40$, 56% (47 embriões). Neste caso, também não houve diferenças significantes entre os grupos ($p=0,2$) (Tabela 2).

Quando avaliamos o número de casos com teste de gravidez positivo, encontramos, no $G \leq 35$, 42 em 161 casos (26,1%) e, no $G 36-39$, 24 em 89 casos (27%). Já no $G \geq 40$, houve cinco testes positivos em 52 casos (9,6%). Os Grupos $G \leq 35$ e $G 36-39$ não diferiram entre si, enquanto que o número de testes positivos no $G \geq 40$ foi significativamente menor do que nos demais grupos ($p=0,03$) (Tabela 2).

Discussão

Com o aumento da idade, a fecundidade natural e as taxas de gestação declinam, fato observado também em procedimentos de reprodução assistida⁷. Assim, nas mulheres com mais de 40 anos, as aneuploidias são mais frequentes, a taxa de aborto aumenta de duas a três vezes e as taxas de implantação após fertilização *in vitro* apresentam significativa redução^{9,16,17}.

A pior qualidade oocitária parece ser o fator preponderante para a redução da fertilidade observada com o avançar da idade, contrapondo-se a outros fatores, como a receptividade endometrial¹⁸. Esta afirmativa é reforçada por estudos em reprodução assistida, usando programas de doação de oócitos, os quais mostram que mulheres com mais de 40 anos que receberam oócitos de mulheres jovens apresentam a mesma taxa de gestação clínica e de parto que as doadoras de oócitos^{18,19}. A maioria dos estudos enfatiza a importância das anomalias cromossômicas, uma vez que é bem estabelecido o aumento da incidência de aneuploidias com o avanço da idade materna²⁰. As aneuploidias são mais frequentes com a diminuição da reserva ovariana, que pode ser determinada, entre outros métodos, pela idade avançada e pelos níveis basais de FSH elevados, implicando um número reduzido de oócitos coletados, fertilizados e, conseqüentemente, de embriões transferidos¹¹.

Nossa investigação mostrou que, embora no grupo das pacientes com 40 ou mais anos de idade o número de

Tabela 1 - Pacientes segundo os grupos etários em anos ≤ 35 (A); 36 a 39 (B) e ≥ 40 (C) e os números médios de oócitos e de embriões transferidos com os respectivos tamanhos da amostra (N). Resultados da análise de variância de Kruskal-Wallis (H)

Variável	A n=161	B n=89	C n=52	AxBxC
Número médio de oócitos aspirados	8,8	7,4	1,6	($p < 0,001$) A e B>C
Número médio de embriões transferidos	3,1	2,8	1,6	($p < 0,001$) A e B>C

Tabela 2 - Pacientes segundo os grupos etários em anos ≤ 35 (A); 36 a 39 (B) e ≥ 40 (C) e as porcentagens de fertilização, de embriões classe I e II e gravidez positiva. Resultado do teste do χ^2 e valores de p

Percentual de	A n=161	B n=89	C n=52	AxBxC
Fertilização	61,4	65,8	64,6	$\chi^2=2,9$ ($p=0,2288$)
Embriões classe I e II	57,4	63,2	56,0	$\chi^2=2,9$ ($p=0,2254$)
Gravidez positiva	26,1	27,0	9,6	$\chi^2=6,7$ ($p=0,0339$)

oócitos aspirados e de embriões transferidos seja significativamente inferior aos demais grupos, a qualidade dos embriões, determinada morfológicamente, foi semelhante aos dos demais grupos. Em relação às taxas de gravidez, observaram-se resultados significativamente piores no grupo das pacientes com 40 anos ou mais. O fato de as pacientes com idade mais avançada apresentarem embriões considerados de boa qualidade, com classificação semelhante às dos grupos mais jovens, mas com uma menor taxa de gravidez, é explicado pelo fato de os embriões terem sido avaliados apenas quanto à sua morfologia, de acordo com a classificação de Veck¹⁴. A idade materna influencia o processo da meiose, tendo sido demonstrado que o fuso meiótico em mulheres com 40 anos ou mais é frequentemente anormal, tanto em relação ao alinhamento cromossômico quanto à matriz de microtúbulos, que inclui o fuso meiótico; dessa forma, observa-se uma alta incidência de aneuploidias nessas mulheres²¹. O encurtamento dos telômeros, que ocorre com a duplicação do DNA, pode exercer papel importante. Embora os oócitos não sofram divisão nos mamíferos adultos, seus precursores replicam durante a oogênese fetal. Os oócitos de mulheres mais velhas entraram no processo de meiose mais tarde na vida fetal, tendo, portanto, passado por maior número de ciclos mitóticos durante a oogênese fetal do que oócitos de mulheres jovens^{22,23}.

Salienta-se que a avaliação embrionária morfológica não é capaz de detectar anomalias cromossômicas. Isso somente seria possível com a utilização de diagnóstico genético pré-implantacional (PGD), cujo emprego requer recursos técnicos e financeiros nem sempre disponíveis, e apresenta relação custo/benefício questionável^{24,25}. O rastreamento genético pré-implantacional (PGS), utilizando-se análise pelo método de hibridização fluorescente *in situ* (FISH) dos cromossomos X, Y, 13, 16, 18, 21 e 22 mostrou-se ineficiente, levando, inclusive, a taxas de gravidez significativamente menores²⁶.

Há estudos que sugerem que pacientes com mais de 40 anos submetidas à transferência de embriões próprios, ou seja, que não utilizaram programas de doação de oócitos,

necessitam de pelo menos quatro oócitos aspirados e dois embriões formados para aumentar as chances de gravidez²⁷. Assim, outro fator que poderia explicar a redução nas taxas de gravidez observada no presente estudo é o fato de que as pacientes com 40 anos ou mais obtiveram um número de oócitos aspirados e o número de embriões transferidos significativamente menores do que os demais grupos. Nosso estudo mostra que, embora a estimulação ovariana tenha sido realizada com dosagens de gonadotropinas mais elevada no grupo de mulheres com idade mais avançada, as pacientes com idade igual ou superior a 40 anos apresentam uma resposta significativamente menor em termos de oócitos obtidos. Tal fato denota, claramente, que a idade é um importante fator preditivo da reserva ovariana.

Além do fator embrionário, o fator uterino também poderia ser responsável pelos resultados piores em mulheres mais velhas. O envelhecimento poderia afetar a função uterina, uma vez que o endométrio perderia sua capacidade de garantir a implantação e o crescimento embrionário. Tal redução da função uterina poderia ser decorrente de mudanças na vascularização uterina ou no desenvolvimento endometrial hormônio-dependente²⁸. Entretanto, clinicamente, o fator endometrial parece não influenciar de modo significativo as taxas de implantação, conforme demonstrado por investigações com doação de oócitos, que não mostram menores taxas de implantação e de gravidez em evolução em pacientes com idade mais avançada que recebem oócitos de mulheres jovens^{29,30}.

A idade materna foi confirmada como bom fator preditivo dos resultados das TRA. Com relação às hipóteses levantadas para identificar as causas da acentuada queda nas taxas de gravidez após os 40 anos, mesmo transferindo-se embriões de boa qualidade morfológica, muito há ainda a ser esclarecido; porém, as anomalias cromossômicas, em particular as aneuploidias, têm papel preponderante³¹ e devem ser levadas em consideração no momento de se propor uma TRA para pacientes nessa faixa de idade.

Referências

- Klipstein S, Regan M, Ryley DA, Goldman MB, Alper MM, Reindollar RH. One last chance for pregnancy: a review of 2,705 in vitro fertilization cycles initiated in women age 40 years and above. *Fertil Steril*. 2005;84(2):435-45.
- Mitsui A, Yoshizawa M, Matsumoto H, Fukui E. Improvement of embryonic development and production of offspring by transferring meiosis-II chromosomes of senescent mouse oocytes into cytoplasts of young mouse oocytes. *J Assist Reprod Genet*. 2009;26(1):35-9.
- Shulman A, Ben-Nun I, Ghetler Y, Kaneti H, Shilon M, Beyth Y. Relationship between embryo morphology and implantation rate after in vitro fertilization treatment in conception cycles. *Fertil Steril*. 1993;60(1):123-6.
- Franco Junior JG, Baruffi RLR, Mauri AL, Alcantra JBO, Peterson C, Campos MS. Influência da idade da paciente nos resultados de um programa de fertilização in vitro. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 1993;15(1):29-31.
- Faddy MJ, Gosden RG, Gougeon A, Richardson SJ, Nelson JF. Accelerated disappearance of ovarian follicles in mid-life: implications for forecasting menopause. *Hum Reprod*. 1992;7(10):1342-6.
- Committee on Gynecologic Practice of American College of Obstetricians and Gynecologists; Practice Committee of American

- Society for Reproductive Medicine. Age-related fertility decline: a committee opinion. *Fertil Steril*. 2008;90(3):486-7.
7. Abreu LG, Santana LF, Navarro PAAS, Reis RM, Ferriani RA, Moura MD. A taxa de gestação em mulheres submetidas a técnicas de reprodução assistida é menor a partir dos 30 anos. *Rev Bras Ginecol Obstet*. 2006;28(1):32-7.
 8. Bellver J, Garrido N, Remohí J, Pellicer A, Meseguer M. Influence of paternal age on assisted reproduction outcome. *Reprod Biomed Online*. 2008;17(5):595-604.
 9. van Rooij IA, Bancsi LF, Broekmans FJ, Looman CW, Habbema JD, te Velde ER. Women older than 40 years of age and those with elevated follicle-stimulating hormone levels differ in poor response rate and embryo quality in in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2003;79(3):482-8.
 10. Thum MY, Abdalla HI, Taylor D. Relationship between women's age and basal follicle-stimulating hormone levels with aneuploidy risk in in vitro fertilization treatment. *Fertil Steril*. 2008;90(2):315-21.
 11. Chuang CC, Chen CD, Chao KH, Chen SU, Ho HN, Yang YS. Age is a better predictor of pregnancy potential than basal follicle-stimulating hormone levels in women undergoing in vitro fertilization. *Fertil Steril*. 2003;79(1):63-8.
 12. Lintsen AM, Eijkemans MJ, Hunault CC, Bouwmans CA, Hakkaart L, Habbema JD, et al. Predicting ongoing pregnancy chances after IVF and ICSI: a national prospective study. *Hum Reprod*. 2007;22(9):2455-62.
 13. Elizur SE, Lerner-Geva L, Levron J, Shulman A, Bider D, Dor J. Factors predicting IVF treatment outcome: a multivariate analysis of 5310 cycles. *Reprod Biomed Online*. 2005;10(5):645-9.
 14. Veeck LL. Preembryo grading and degree of cytoplasmic fragmentation. In: Veeck LL, editor. *An atlas of human gametes and conceptuses*. New York: Parthenon; 1999. p. 46-51.
 15. Siegel S, Castellan NJ Jr. *Estatística não paramétrica para ciências do comportamento*. 2a ed. Porto Alegre: Artmed; 2006.
 16. Toner JP, Flood JT. Fertility after the age of 40. *Obstet Gynecol Clin North Am*. 1993;20(2):261-72.
 17. Baird DT, Collins J, Egozcue J, Evers LH, Gianaroli L, Leridon H, Sunde A, Templeton A, Van Steirteghem A, Cohen J, Crosignani PG, Devroey P, Diedrich K, Fauser BC, Fraser L, Glasier A, Liebaers I, Mautone G, Penney G, Tarlatzis B; ESHRE Capri Workshop Group. Fertility and ageing. *Hum Reprod Update*. 2005;11(3):261-76.
 18. Navot D, Bergh PA, Williams MA, Garrisi GJ, Guzman I, Sandler B, et al. Poor oocyte quality rather than implantation failure as a cause of age-related decline in female fertility. *Lancet*. 1991;337(8754):1375-7.
 19. Navot D, Drews MR, Bergh PA, Guzman I, Karstaedt A, Scott RT Jr, et al. Age-related decline in female fertility is not due to diminished capacity of the uterus to sustain embryo implantation. *Fertil Steril*. 1994;61(1):97-101.
 20. Armstrong DT. Effects of maternal age on oocyte developmental competence. *Theriogenology*. 2001;55(6):1303-22.
 21. Battaglia DE, Goodwin P, Klein NA, Soules MR. Influence of maternal age on meiotic spindle assembly in oocytes from naturally cycling women. *Hum Reprod*. 1996;11(10):2217-22.
 22. Keefe DL, Liu L, Marquard K. Telomeres and aging-related meiotic dysfunction in women. *Cell Mol Life Sci*. 2007;64(2):139-43.
 23. Keefe DL, Liu L. Telomeres and reproductive aging. *Reprod Fertil Dev*. 2009;21(1):10-4.
 24. Blockeel C, Schutyser V, De Vos A, Verpoest W, De Vos M, Staessen C, et al. Prospectively randomized controlled trial of PGS in IVF/ICSI patients with poor implantation. *Reprod Biomed Online*. 2008;17(6):848-54.
 25. Goossens V, Harton G, Moutou C, Scriven PN, Traeger-Synodinos J, Sermon K, et al. ESHRE PGD Consortium data collection VIII: cycles from January to December 2005 with pregnancy follow-up to October 2006. *Hum Reprod*. 2008;23(12):2629-45.
 26. Hardarson T, Hanson C, Lundin K, Hillensjö T, Nilsson L, Stevic J, et al. Preimplantation genetic screening in women of advanced maternal age caused a decrease in clinical pregnancy rate: a randomized controlled trial. *Hum Reprod*. 2008;23(12):2806-12.
 27. Souza MCB, Mancebo ACA, Henriques CA, Pritsivelis C, Cardoso FFO, Souza MM. ICSI em mulheres acima de 40 anos: importância do número de óocitos obtidos. *J Bras Reprod Assist*. 2008;12 Ed Esp:33.
 28. Yaron Y, Botchan A, Amit A, Kogosowski A, Yovel I, Lesing JB. Endometrial receptivity: the age-related decline in pregnancy rates and the effect of ovarian function. *Fertil Steril*. 1993;60(2):314-8.
 29. Vernaev V, Reis Soares S, Budak E, Bellver J, Remohí J, Pellicer A. [Clinical factors associated with the outcome of oocyte donation]. *Gynecol Obstet Fertil*. 2007;35(10):1015-23. French.
 30. Soares SR, Velasco JA, Fernandez M, Bosch E, Remohí J, Pellicer A, et al. Clinical factors affecting endometrial receptiveness in oocyte donation cycles. *Fertil Steril*. 2008;89(3):491-501.
 31. Harper J, Sermon K, Geraedts J, Vesela K, Harton G, Thornhill A, et al. What next for preimplantation genetic screening? *Hum Reprod*. 2008;23(3):478-80.