

Malformações Congênicas e a Fertilização *in vitro*

Congenital Malformations and *in vitro* Fertilization

Edilberto de Araújo Filho*

Sonia Ventura Carillo**

Patricia Gomes Silva**

Ciro Dresch Martinhago**

Ricardo Luiz Razera Baruffi/******

João Batista Alcantara Oliveira/******

José Gonçalves Franco Jr./****/******

*Departamento de Ginecologia, Obstetrícia e Mastologia - Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) - SP

**NADI - Núcleo de Acompanhamento do Desenvolvimento Infantil - Ribeirão Preto - SP

***Departamento de Ginecologia e Obstetrícia - Faculdade de Medicina de Botucatu (UNESP) - SP

****Centro de Reprodução Humana Sinhá Junqueira - Ribeirão Preto - SP

Resumo

Nas últimas décadas a fertilização *in vitro* (FIV) tornou-se uma alternativa eficaz e largamente difundida para tratamento de casais inférteis. Contudo, nesses anos de aplicação clínica tem havido preocupação com a saúde das crianças concebidas através da técnica, em particular quanto à possibilidade de malformação congênita. Diferentes trabalhos foram publicados para avaliar as crianças de FIV. Contudo, de modo geral o resultado foi considerado satisfatório, não tendo sido conclusivos os estudos sobre o aumento na incidência de malformações congênicas. Por outro lado, o advento da inseminação intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI), dando possibilidade de ter filhos a indivíduos com diminuição acentuada na contagem de espermatozoides, ou mesmo com azoospermia, exacerbou os questionamentos sobre a segurança. Os primeiros trabalhos visando avaliar malformações congênicas nas crianças nascidas por ICSI não conseguiram mostrar incidência maior. No entanto, estudos mais recentes, com casuística maior, têm apontado um risco superior na ocorrência de malformação, porém sem conclusão definitiva. Até o momento, na literatura não há dados suficientes que contra-indiquem a aplicação das técnicas de reprodução assistida, embora persistam preocupações quanto ao bem-estar das crianças concebidas por ICSI e por FIV.

PALAVRAS-CHAVE: Malformação congênita. FIV. ICSI.

Introdução

As malformações congênicas intrigam curandeiros, médicos e pesquisadores há muito tempo. Com a evolução da ciência, aumentou o interesse da medicina pelas alterações físicas encontradas nos seres humanos, bem como a procura por explicações para tais eventos. De acordo com os dados do U.S. Center for Disease Control, 2004, a principal causa para morte de crianças brancas são os defeitos congênicos (mais de 20% das mortes nos EUA). Em cerca de 3% dos recém-nascidos observam-se grandes anomalias estruturais (p.ex., espinha bífida). Entretanto, outras anomalias podem ser detectadas posteriormente e assim a incidência pode chegar a 6% em crianças com idade até 2 anos e 8% em crianças com até 5 anos.

Neste contexto, as modernas técnicas de reprodução assistida (TRA) se incluem como mais um ponto de discussão. Se, por um lado, nesses mais de 27 anos de desenvolvimento tornaram-se ferramentas indispensáveis no tratamento do casal infértil, revolucionando o arsenal terapêutico, por outro persistem preocupações quanto à repercussão nas crianças concebidas com estas técnicas. A possibilidade de aumento na incidência de malfor-

mações congênicas é uma das grandes discussões, objeto de vários estudos que realçam a necessidade de contínuo monitoramento das crianças concebidas com TRA.

A Fertilização *in vitro*

A produção de embriões em laboratório, que culminou com o nascimento da primeira criança de fertilização *in vitro* (FIV) em 1978, foi um dos grandes marcos na medicina moderna. De fato, a FIV expandiu-se rapidamente no mundo devido a sua eficiência, tornando-se um importante recurso no arsenal terapêutico do casal infértil. Contudo, juntamente com essa evolução surgiu a preocupação entre os pesquisadores quanto ao bem-estar das crianças geradas por TRA, especialmente a possibilidade de ocorrer uma incidência maior de alterações (distúrbios de desenvolvimento, malformações e outras) em relação à população geral.

Nessa ponderação considera-se a idade mais avançada das mulheres inférteis que engravidaram e a possibilidade de fatores causadores da infertilidade (conhecidos ou não) terem influenciado negativamente na prole. Além disso, durante o processo de FIV o embrião é exposto a alterações mecânicas, térmicas e químicas que teoricamente podem aumentar o risco para malformações congênicas. Os primeiros trabalhos considerando a saúde e o bem-estar de crianças nascidas por FIV tinham pequeno número de casos e as estimativas do risco para malformações eram freqüentemente incertas ou comparavam populações muito diversas. A maioria dos trabalhos tratava apenas de pacientes com fator tubário, principal indicação de FIV na época.

Lancaster, 1987, foi o primeiro a relatar uma incidência maior de defeitos no tubo neural e transposição nos grandes vasos em pacientes de FIV. Bergh *et al.*, 1999, compararam 5.856 crianças nascidas entre 1982 e 1995 e concebidas por FIV, com 1.505.724 crianças da população geral (controle). Foi encontrada uma taxa de malformação de 5,4% para FIV, com prevalência de defeitos no tubo neural e atresia de esôfago. Para este período a expectativa calculada era de 3,9% de malformações, o que leva a um risco relativo de 1,4 (intervalo de confiança de 95%, $IC_{95\%} = 1,3-1,5$) em relação à população geral. Koivurova *et al.*, 2002, avaliaram as complicações neonatais e a prevalência de malformações em crianças nascidas por FIV na Finlândia entre 1990 e 1995, comparando com grupo controle de crianças

da população geral, separadas por idade materna, classe social, paridade, sexo, ano de nascimento e gemelaridade. A incidência de parto prematuro, morbidade neonatal e hospitalização foram estatisticamente maiores nas crianças nascidas por FIV em comparação com o controle. A taxa de malformações maiores para o grupo de FIV foi 6,6%, superior àquela para o grupo controle que foi de 4,4%, com prevalência de anomalias cardíacas (especificamente defeitos de septo) quatro vezes maior que nas crianças de FIV (principalmente observada nos nascidos únicos).

Entretanto, muitos outros trabalhos não conseguiram mostrar uma incidência maior de malformações em FIV. Rizk *et al.*, 1991, avaliaram 1.360 crianças nascidas por FIV e não encontraram aumento na incidência de malformações congênicas. O Registro francês (FIVNAT, 1990) acompanhou 6.879 crianças nascidas por FIV e mostrou uma taxa de malformação congênita de 2,8%, similar àquela para a população geral. O mesmo foi observado no Registro britânico onde, após avaliarem 1.581 crianças de FIV e de transferência intratubária de gametas (GIFT), relataram uma incidência de 2,2 e 2,9% de malformações, respectivamente (MRC, 1990). O Registro dinamarquês (Westergaard *et al.*, 1999) comparou os nascimentos de FIV com um controle pareado de crianças concebidas naturalmente e encontrou 4,8% de malformações para FIV e 4,6% para o grupo controle. Assim, de modo geral as análises reforçam o conceito de segurança relativa da FIV, em termos teratogênicos.

A Injeção Intracitoplasmática de Espermatozóide

A primeira publicação sobre crianças nascidas por injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) foi a de Palermo *et al.* (1992). Devido à fácil reprodutibilidade e ao bom desempenho clínico, a ICSI (técnica de micromanipulação associada à FIV) rapidamente se difundiu pelo mundo, originando um dos grandes momentos da reprodução e vindo a solucionar grande parte dos fatores masculinos graves. De fato, a ICSI é hoje largamente difundida, pela ampliação em suas indicações. Além do fator masculino, também tem sido empregada nos casos de falha de fertilização anterior em ciclos de FIV, na endometriose severa, em pacientes com idade avançada e/ou pobre resposta ovariana, assim como na infertilidade sem causa aparente.

Porém, desde o princípio a ICSI foi considerada pelos pesquisadores uma técnica de risco por ser mais invasiva do que a FIV tradicional. Podemos relacionar como riscos teóricos da ICSI:

- 1) Uso de espermatozoides com potencial para transportar anormalidades genéticas (por exemplo: mutações da doença fibrocística, deleções do cromossomo Y, e outras).
- 2) Uso de espermatozoides com defeitos estruturais (por exemplo: falta de proteínas espermáticas - actina, tubulina, calicina; formas severas de teratozoospermia e nucleação microtubular; falta de isoformas e de certas fosfoquinases responsáveis pela descondensação, quebra do DNA; potencial para incorporar DNA mitocondrial de espermatozoides).
- 3) Danos químicos ou mecânicos (por exemplo: separação cromossômica do 2º fuso meiótico, ativação mecânica do oócito).
- 4) Introdução de materiais estranhos no oócito (contaminantes do meio de cultura, injeção de DNA estranho associado ao esperma, assimilação de partículas infecciosas).

Surgiram mais preocupações quando a ICSI foi empregada nos casos de espermatozoides não ejaculados (testiculares ou epididimários), pelo risco maior para aberração cromossômica em homens com azoospermia não-obstrutiva. Além disso, suspeitava-se que o *imprinting* genômico, ou seja, a dependência da expressão de certos genes de origem paterna poderia ser menos completa no momento da fertilização se fossem usados espermatozoides testiculares, pois não completaram a passagem pelas vias ejaculatórias. Se isso fosse verdade, seria pouco provável haver comprometimento nas taxas de fertilização e desenvolvimento embrionário precoce, embora anomalias pudessem se manifestar ao nascimento ou mesmo posteriormente na vida dessas crianças.

Sobre a associação entre a ICSI e anomalias congênicas, vários estudos foram publicados sem que se tenha chegado a uma conclusão definitiva. Vários trabalhos não encontraram um risco aumentado para malformações congênicas. Loft *et al.*, 1999, avaliaram 730 crianças nascidas por ICSI entre 1994 e 1997, observando que 2,2% dos nascidos vivos, apresentavam malformação, um valor próximo ao esperado para a população geral.

Bonduelle *et al.*, 1995, compararam os primeiros 130 casos de crianças nascidas por ICSI com um grupo controle de 130 crianças nascidas por FIV no mesmo período, com o mesmo protocolo de estimulação ovariana e condições laboratoriais semelhantes. Apesar do número pequeno

de casos, não houve diferença significativa entre os dois grupos quanto a taxas de malformação congênita, parâmetros de crescimento e desenvolvimento. Posteriormente, o mesmo grupo (Bonduelle *et al.*, 2002) comparou 2.889 crianças nascidas de FIV com 2.995 crianças de ICSI, quanto a intercorrências neonatais e malformações congênicas durante a gravidez e ao nascimento. A incidência de malformação congênita foi similar entre os grupos, com taxas de 4,2% para ICSI e 4,6% para FIV.

Lancaster *et al.*, 2000, com dados de neozelandeses e australianos, relataram 2,5% de incidência de malformações congênicas entre 4.260 infantes nascidos de ICSI e número similar para nascidos por FIV.

Na mesma linha de pensamento, grupos separados de crianças nascidas por ICSI com espermatozoides de origem testicular ou epididimários foram comparados com os dados obtidos das crianças de ICSI com espermatozoides ejaculados (Wennerholm *et al.*, 2000; Bonduelle *et al.*, 2002; Ludwig & Katalinic, 2003, novamente não se observou aumento na incidência de malformações maiores. Wennerholm *et al.*, 2000, observaram crianças durante um período de 5 anos e não identificaram influência da qualidade ou origem do sêmen sobre as malformações. Do mesmo modo, Ludwig & Katalinic (2003), em estudo multicêntrico e prospectivo na Alemanha, analisaram a evolução das gestações em ICSI de ejaculado, epidídimo e testículo de 2.545 gestações, verificando resultados semelhantes para os três grupos quanto ao tempo de gravidez, taxa de malformações maiores, nascidos mortos, nascidos vivos e aborto.

Por outro lado, diferentes publicações relatam um risco aumentado de aberrações cromossômicas na ICSI, geralmente aneuploidias (Tuerlings *et al.*, 1998; Bonduelle *et al.*, 2002; Devroey & Steriteghem, 2004).

Alguns autores acreditam que a população de casais inférteis tem risco maior para transmitir alterações genéticas. Diferentes trabalhos analisaram o cariótipo de casais que posteriormente foram submetidos a ICSI. Tuerlings *et al.*, 1998, estudaram 1.792 homens com oligozoospermia e azoospermia e mostraram que 72 deles (4,4%) tinham aberrações cromossômicas, predominantemente anormalidades nos cromossomos sexuais e translocações Robertsonianas. Peschka *et al.*, 1999, chegaram a conclusão semelhante após avaliarem 1.562 pacientes (781 casais) que seriam submetidos a ICSI, (1999). Uma alta porcentagem de anormalidades genéticas também foi relatada nas mulheres de casais que se submeteram a ICSI. Mau *et al.*, 1997,

e Scholtes *et al.*, 1998, encontraram 6% e 9,7% de alterações, respectivamente. Isso confirma a idéia de que os casais inférteis constituem uma população especial de pacientes.

Dois estudos realizados a partir do registro nacional sueco evidenciaram um risco aumentado de malformação congênita em crianças nascidas após ICSI. Wennerholm *et al.*, 2000, após análise dos dados de 1.139 crianças, encontrou taxa de malformações de 7,6%, dando um risco relativo de 1,75 em comparação com a população geral. Entretanto, este risco diminuía (1,19) após ajuste para gemelaridade, mostrando uma associação entre as anomalias e gravidez múltipla. Ericson & Kallen (2001) também referem uma incidência maior das malformações após ICSI em comparação à população geral, identificando associação com o tempo de infertilidade. Ambos os estudos relataram um risco aumentado de hipospádia em crianças de ICSI, que pode estar associado à infertilidade paterna.

Hansen *et al.*, 2002, analisando dados da Austrália e também comparando com a população geral, relataram uma taxa de malformação para ICSI de 8,6% contra uma taxa no controle de 4,2%, dando um risco relativo 2,5 vezes maior, idêntico ao obtido nas crianças oriundas de FIV.

Ludwig & Katalinic (2002) compararam uma coorte de 3.372 crianças de ICSI com uma de 30.940 crianças concebidas naturalmente. Considerando os nascidos vivos e mortos e os abortamentos, a taxa geral de malformações foi de 8,6% para ICSI e 6,9% para a população geral (risco relativo de 1,25). Nesse trabalho, o grupo controle restringe-se a uma região fixa na Alemanha, sendo os casos de ICSI de diferentes partes do país.

Em trabalho de meta-análise, Kurinczuk *et al.*, 2004, avaliaram a incidência de malformações congênicas em reprodução assistida (FIV e ICSI) comparando-a com a gravidez espontânea. Um total de 23 trabalhos foi analisado. Nos seis estudos com grande número de crianças, quatro observaram risco relativo de malformações congênicas maiores e menores significativamente elevados nos nascimentos de ICSI, porém dois deles contrariam essa afirmativa.

Um estudo multicêntrico, envolvendo clínicas que realizam TRA na Bélgica, Reino Unido, Dinamarca, Suécia e Grécia (Bonduelle *et al.*, 2005), avaliou (história clínica + exame físico) crianças nascidas de gestação única após ICSI e FIV aos 5 anos de idade. Crianças concebidas naturalmente na mesma faixa etária foram examinadas no grupo controle. Observou-se ao final, que tanto crianças de FIV quanto de ICSI apre-

sentavam mais intercorrências que necessitavam socorro médico (clínico ou cirúrgico) e que as crianças de ICSI apresentaram mais anomalias congênicas (risco relativo: 2,77, IC = 1,41-5,46), em parte devido ao aumento no número de defeitos urogenitais. Contudo, após correção de algumas variáveis como idade materna, nível educacional, classe sócio-econômica, fumo, bebida, gestações prévias, houve queda para 2,54 no risco relativo de malformações, sugerindo que elas poderiam estar associadas também com características parentais e não apenas com a técnica de ICSI.

Na verdade, os resultados dos vários estudos enfatizam a necessidade de monitoramento contínuo das crianças submetidas a ICSI.

Congelamento de Embriões

Outro fator levantado como de risco para malformações congênicas são as técnicas de criopreservação de embriões. O primeiro relato de gravidez após congelamento e descongelamento de embriões foi o de Trounson & Mohr (1983). Desde então, muitos serviços de FIV passaram a estabelecer programas para congelamento de embriões.

A criopreservação de embriões traz várias vantagens para o casal. A primeira é a possibilidade de gravidez adicional por um custo menor sem ter que se submeter novamente à punção ovariana. Além disso, um bom programa de congelamento proporciona segurança no sentido de transferir um número menor de embriões por ciclo, baixando significativamente a taxa de gravidez múltipla, principal responsável pelas intercorrências neonatais de crianças nascidas por TRA. Por último, a criopreservação de embriões tem papel importante na prevenção da síndrome do hiperestímulo severo dos ovários, permitindo congelar todos os embriões e protelar a transferência para um ciclo posterior, quando o risco da síndrome já passou.

Devido às agressões a que são submetidos os embriões ao passarem pelo processo de congelamento (desidratação) e descongelamento (reidratação), a preocupação da comunidade científica sempre foi grande. No entanto, vários estudos publicados na literatura mostraram que a criopreservação não só é clinicamente viável, com taxas de gravidez clínica que variam de 15 a 50% (Van Den Abbeel *et al.*, 2000; Schnorr *et al.*, 2001), como também as crianças nascidas de embriões descongelados não mostraram incidência aumentada nas malformações (Loft *et al.*, 1999; Westergaard *et al.*, 1999; Van Den Abbeel *et al.*,

2000; Bonduelle *et al.*, 2002; Van Steirteghem *et al.*, 2002). O monitoramento do congelamento de embriões durante 10 anos produziu uma média de 8% de nascimentos adicionais após o emprego de TRA, mostrando que essa tecnologia também é um recurso importante no arsenal terapêutico do casal infértil.

Considerações Finais

Até o momento não há dados suficientes na literatura que contra-indiquem a aplicação das TRA, embora persistam preocupações quanto ao bem-estar das crianças concebidas por ICSI e mesmo por FIV. Dessa forma, o acompanhamento das crianças nascidas de TRA encontra indicação, ainda que não seja sempre uma prática de fácil execução.

Van Steirteghem (2002) e Ludwig (2004) referem que aspectos importantes precisam ser avaliados quando fazemos um estudo populacional de malformações congênicas. Porém alguns são extremamente difíceis de serem controlados, produzindo *bias* importantes nesses estudos:

- A seleção do grupo controle e método de recrutamento das crianças: diferenças com o grupo de estudo prejudicam análise posterior dos resultados.
- Diferença no exame das crianças: as nascidas de TRA são mais rigorosamente examinadas e acompanhadas do que as nascidas naturalmente.
- As altas taxas de desistência em alguns estudos: principalmente por parte do grupo controle o que prejudica a análise comparativa.
- O desenho do estudo tem que analisar separadamente os tipos de TRA: muitos trabalhos não o fazem, impossibilitando a análise das técnicas individualmente, além de dificultar as meta-análises.
- O tamanho amostral: o número de pacientes no estudo deve ser suficientemente grande para se traçar conclusões e não apenas conjecturas. Poucos estudos na literatura têm amostra populacional maior que 400 casos.
- O tempo de *follow up*: varia muito de um estudo para outro, indo de 1 a 5 anos. Sabemos que, quanto mais tarde se examina as crianças, maior é o número de malformações encontradas, pois muitas se manifestam mais tardiamente, passando despercebidas em um primeiro momento. Além disso, grupo controle populacional não tem seguimento longo como o das crianças de TRA, somente colhendo seus dados ao nascimento, o que pode subestimar a incidência.
- A realização de exame físico nas crianças: tem

maior valor do que o questionário via telefone (ou qualquer outro meio indireto de observação). Sem exame físico, as omissões, voluntárias ou não, são maiores.

Todos acreditam serem necessários estudos multicêntricos colaborativos que espelhem com maior fidedignidade as variações populacionais e que acompanhem prospectivamente as crianças por um longo tempo (5 anos), com grupo controle populacional casado desde o início, controle das variáveis mais importantes e uma amostra populacional suficientemente grande. Essa seria a forma ideal para avaliar a incidência real de maiores malformações congênicas no mundo, em especial após TRA.

Abstract

In vitro fertilization (IVF) has become an effective and a widespread treatment for infertile couples in the last decades. Nevertheless, in these years of clinic application, concerns have arisen on the health of conceived children, mainly relative to congenital malformation. Distinct studies evaluating IVF children have been published. In general, IVF results are considered good, and most studies failed to demonstrate an increase in the incidence of congenital malformation. The development of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) technique gave a possibility to have children to men with a highly diminished sperm count or even azoospermia. On the other hand, it has exacerbated the amount of questions on security. The first studies evaluating congenital malformation in children born from ICSI have failed in showing an increase in malformation incidence. A recent study with a bigger casuistic have pointed to a higher risk, although without a definite conclusion. Until this moment, the available data are not sufficient to support a contraindication for the use of assisted reproduction technique, although concerns still persist on the well being of children conceived from ICSI and IVF.

KEYWORDS: *Congenital malformation. IVF. ICSI.*

Leituras Suplementares

1. Bergh T, Ericson A, Hillensjö T, *et al.* Deliveries and children born after in-vitro fertilization in Sweden 1982-95: a retrospective co-hort study. *Lancet* 1999; 354: 1579-85.
2. Bonduelle M, Legein J, Derde M P, *et al.* Com-

- parative follow up study of 130 children born after ICSI and 130 children born after IVF. *Hum Reprod* 1995; 10: 3327-31.
3. Bonduelle M, Liebaers I, Deketelaere V, *et al.* Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991- 1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999). *Hum Reprod* 2002; 17: 671-94.
 4. Bonduelle M, Wennerholm A, Tarlatzis BC, *et al.* A multi-centre cohort study of the physical health of 5-year-old children conceived after intracytoplasmic sperm injection, in vitro fertilization and natural conception; *Hum Reprod* 2005; 20: 413-9.
 5. Devroey P, Van Steirteghem A. A review of ten years experience of ICSI. *Hum Reprod Update* 2004; 10: 19-28.
 6. Ericson A, Kallén B. Congenital malformations in infants born after IVF: a population based study. *Hum Reprod* 2001; 16: 504-9.
 7. FIVNAT (French in vitro National). Pregnancies and births resulting from in-vitro fertilization: French National Registry, analysis of data 1986 to 1990. *Fertil Steril* 1990; 64: 746-56.
 8. Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webb S. The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med* 2002; 346: 725-30.
 9. Koivurova S, Hartikainen A-L, Gissler M, *et al.* Neonatal outcome and congenital malformations in children Born after in-vitro fertilization. *Hum Reprod* 2002; 17: 1391-8.
 10. Kurinczuk JJ, Hansen M, Bower C. The Risk of Birth Defects in Children Born after Assisted Reproductive Technologies. *Curr Opin Obstet Gynecol* 2004; 16: 201-9.
 11. Lancaster PAL, Hurst T, Shafir E. Congenital malformations and other pregnancy outcome after microinsemination. *Reprod Toxicol* 2000; 14: 74.
 12. Loft A, Petersen K, Erb K, *et al.* A Danish national cohort of 730 infants born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) 1994-1997. *Hum Reprod* 1999; 14: 2143-8.
 13. Ludwig M, Katalinic A. Malformation rate in fetuses and children conceived after ICSI: results of a prospective cohort study. *Reprod Biomed Online* 2002; 5: 171-8.
 14. Ludwig M, Katalinic A. Pregnancy course and health of children born after ICSI depending on parameters of male factor infertility. *Hum Reprod* 2003; 18: 351-57.
 15. MRC. Working Party on Children Conceived by in Vitro Fertilization: Births in Great Britain Resulting from assisted conception, 1978-87. *BMJ* 1990; 12:1229-33.
 16. Mau UA, Backert LT, Kaiser P, Kiesel L. Chromosomal findings in 150 couples referred for genetic counseling prior to intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1997; 12: 930-7.
 17. Peschka B, Leygraaf J, Van Der Ven K, *et al.* Type and frequency of chromosome aberrations in 781 couples undergoing intracytoplasmic sperm injection. *Hum Reprod* 1999; 14: 2257-63.
 18. Rizk B, Doyle P, Tan SL, *et al.* Perinatal outcome and congenital malformations in in-vitro fertilization babies from the Bourn-Hallam group. *Hum Reprod* 1991; 6: 1259-64.
 19. Schnorr JA, Doviak MJ, Muasher SJ, Jones Jr H. Impact of a cryopreservation program on the multiple pregnancy rate associated with assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2001; 75: 147-52.
 20. Scholtes MC, Behrend C, Dietzel-Dahman J, *et al.* Chromosomal aberrations in couples undergoing intracytoplasmic sperm injection: influence on implantation and ongoing pregnancy rates. *Fertil Steril* 1998; 70: 933-7.
 21. Tuerlings JH, De France HF, Hamers A, *et al.* Chromosome studies in 1792 males prior to intracytoplasmic sperm injection: The Dutch experience. *Eur J Hum Genet* 1998; 6: 194-200.
 22. Wennerholm U-B, Bergh C, Hamberger L, *et al.* Incidence of congenital malformations in children born after ICSI. *Hum Reprod* 2000; 15: 944-8.
 23. Westergaard HB, Johansen AM, Erb K, Andersen AN. Danish National In Vitro Fertilization registry 1994 and 1995: a controlled study of births, malformations and cytogenetic findings. *Hum Reprod* 1999; 14: 1896-902.
 24. Van Den Abbeel E, Camus M, Joris H, Van Steirteghem A. Embryo freezing after intracytoplasmic sperm injection. *Mol Cell Endocrinol* 2000; 169: 49-54.
 25. Van Steirteghem AC, Bonduelle M, Devroey P, Liebaers I. Follow up of children born after ICSI. *Hum Reprod Update* 2002; 8: 111-6.