

Estudio de las anomalías congénitas en 1424 ciclos de inyección intracitoplasmática de espermatozoides

Study of congenital anomalies in 1424 cycles of intracytoplasmic sperm injection

Sellers F, Ariza N, Ibérico G, Llácer J, Roca M, LozanoJM, Bernabeu R

Instituto Bernabeu de Fertilidad y Ginecología de Alicante.

Resumen

Fundamento: *Con el uso de la Microinyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), no existe un aumento significativo de las malformaciones mayores, resultando siempre inferior al 3%. Sin embargo, sí parece apreciarse un incremento de las anomalías cromosómicas, especialmente en los cromosomas sexuales, posiblemente debida a las características de la población infértil.*

Material y métodos: *Hemos analizado nuestros propios resultados desde el año 1995, en que comenzamos nuestro programa de ICSI. Han sido un total de 1424 ciclos hasta Marzo de 2001.*

Resultados: *Hemos conseguido el nacimiento de 487 niños sin anomalías morfológicas conocidas. Se han practicado cariotipo mediante amniocentesis a un total de 39 siendo todos ellos normales.*

Mediante ecografía, se han encontrado un total de 8 anomalías estructurales. Resulta pues una incidencia de 1,64 % de anomalías.

Conclusiones: *La ICSI, no aumenta la incidencia de anomalías morfológicas, no estando indicada pruebas invasivas de diagnóstico prenatal, pero sí un correcto estudio previo a la pareja subsidiaria de este procedimiento y un detallado examen ecográfico prenatal.*

Palabras clave: Microinyección intracitoplasmática de espermatozoides. Malformaciones. Diagnóstico prenatal. Cromosopatías.

Summary

Introduction: *The employment of intracytoplasmic sperm injection (ICSI) does not produce any significant increase of major neonatal malformations, always being less than 3%. There seems to be, however, a slight increase in the rate of chromosomyc anomalies, mostly of sex chromosomes, possibly due to infertility group characteristics.*

Correspondencia: Francisco Sellers López
Avda. de la Albufereta, 31
03016 Alicante

Materials and methods: We did a retrospective data analysis of 1424 ICSI cycles performed at our centre from 1995 (when these assisted reproductive technologies were introduced) to March 2001.

Results: 487 ICSI born children with no morphological birth defects were registered. Amniocentesis for prenatal karyotyping were performed in 39 pregnancies, all of which were normal. Eight structural anomalies were detected by means of ultrasound, giving rise to an anomaly rate of 1,64%.

Conclusions: ICSI doesn't significantly increase the morphological anomaly rate, and therefore, prenatal invasive diagnostics are not usually indicated. However, exhaustive previous couple evaluation as well as a rigorous prenatal ultrasound test are considered necessary.

Key words: Intracytoplasmic sperm injection; Malformations; Prenatal diagnosis; Chromosomopatías

INTRODUCCIÓN

La Microinyección Intracitoplasmática de Espermatozoides aumenta ligeramente el número de anomalías cromosómicas, a expensas de las que afectan a los cromosomas sexuales. Sin embargo, no se aprecia un incremento en la incidencia de anomalías morfológicas.

Desde el año 1992, en que Palermo y cols. (1) publican los primeros embarazos obtenidos tras ICSI, este procedimiento se ha convertido en una técnica rutinaria en los laboratorios de Fecundación In Vitro (FIV) de todo el mundo.

Si en un principio, la práctica del ICSI se limitó a casos de infertilidad masculina severa, con el paso del tiempo, las indicaciones se ampliaron a otras muchas, como parejas con fallos repetidos de FIV convencional, fallos de inseminación artificial, baja respuesta ovárica y mala calidad ovocitaria.

Es una técnica no precedida de experimentación con otros mamíferos. Lógicamente, la ICSI soslaya muchas fases de lo que podríamos llamar "fecundación normal", pues se prescinde de la selección del espermatozoide más apto y todavía se desconocen los mecanismos de selección espermática en la especie humana. Además, no se sabe si la utilización de espermatozoides inmaduros de epidídimo o testículo sin la suficiente impronta genómica, tendría repercusiones a largo plazo.

Se ha comprobado que el cariotipo de varones con azoospermia y oligoastenozoospermia severa es anómalo en un 5,8% (siendo un 4,2% en los cromosomas sexuales y un 1,5% en los autosomas). Estas tasas contrastan con las de los recién nacidos fenotípicamente normales, en los que se detectan alteraciones tan sólo en el 0,38% del total (0,14% en los gonosomas y un 0,25% en los autosomas). En los niños nacidos tras ICSI, como era de esperar, se ha comprobado

un aumento de aneuploidías de los cromosomas sexuales en cifras que oscilan en torno al 1% (2).

Los estudios realizados directamente en los espermatozoides mediante hibridación in situ con fluorescencia (FISH), revelan que los varones infértiles, aun con cariotipo normal, presentan una tasa mayor de anomalías citogenéticas en sus espermatozoides (3). Estas anomalías se ha comprobado que se asocian con fallos de implantación y abortos durante el primer trimestre.

Igualmente es conocida la existencia en un 3-15% de estos varones, de microdeleciones en el cromosoma Y, concretamente en las regiones AZFb y AZFc de su brazo largo (4). Estos varones estériles, portadores de microdeleciones, transmitirán la mutación a todos sus hijos varones.

También es conocida la existencia de mutaciones relacionadas con la fibrosis quística en los varones con agenesia de conductos deferentes. Esta condición, hace necesario el cribaje a la pareja que va a iniciar el ciclo ICSI de las mutaciones más frecuentes en nuestra población

Por todo ello, en un principio se creó cierta inquietud sobre el resultado de los niños nacidos con este novedoso tratamiento ante la posibilidad de transmitir alteraciones genéticas a la descendencia. Llegado este punto, sería conveniente repasar la actual definición de la OMS respecto a lo que se entiende por defecto congénito: "Toda anomalía en el desarrollo morfológico, estructural, funcional o molecular presente en el nacimiento (aunque puede manifestarse posteriormente), ya sea de carácter interno o externo, familiar o esporádico, hereditario o no, único o múltiple". Por tanto, este concepto debe englobar los defectos dismórficos, los cromosómicos, las enfermedades mendelianas monogénicas y las endocrinopatías prenatales. Sin embargo, en la mayoría de trabajos referentes al tema que nos ocupa, se emplea con más asiduidad el término "malformaciones congénitas mayores", definidas como aquellas malformaciones que

causan alteraciones funcionales o precisan corrección quirúrgica.

La mayoría de estudios epidemiológicos están de acuerdo en atribuir a los defectos congénitos una frecuencia en torno al 2,5% (5) (6). Igualmente similar es el 2,22% que señala el extenso trabajo español perteneciente al Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (7). Estas frecuencias, conviene resaltar que corresponde a la prevalencia de defectos en el recién nacido (número total de recién nacidos afectados por uno o más defectos congénitos, observados en el nacimiento y durante los primeros años de vida, en la población total de recién nacidos investigados), pero no refleja en absoluto su incidencia real. Además, las cifras de prevalencia de los defectos congénitos en una población concreta sólo poseen significado si se acompañan de las circunstancias específicas de la investigación y se incluye una definición clara de la patología evaluada con una perfecta metodología. Esta es la razón por la que las tasas disponibles pueden variar de manera importante y de que su comparación pueda conducir a errores, como posiblemente puede ocurrir en este capítulo concreto.

Además, hemos de tener en cuenta, el impacto que ha supuesto la posibilidad de interrumpir el embarazo tras la detección intraútero de gran número de patologías y defectos en el embrión y el feto. Ello conlleva un descenso en la prevalencia de defectos congénitos al nacimiento, con los problemas a la hora de analizar la frecuencia de cada defecto.

Parece que los resultados de los niños nacidos en todo el mundo tras tratamiento de ICSI, eran en principio alentadores, pues la mayoría de los trabajos publicados confirmaban que no existe un aumento significativo del número de defectos congénitos, siempre inferiores al esperado 3%. Si bien, se trataba de publicaciones iniciales, referidas a grupos reducidos de casos (8) (9) (10). En los últimos años, existen datos procedentes de registros con amplia casuística que confirman una frecuencia muy similar siempre en torno al 2,5%, como el estudio en Bélgica de Bonduelle y cols. (11) y el de Lancaster y cols. (12) en Australia.

No obstante, hay trabajos que discrepan totalmente. Kurinczuk y cols. (13) encuentran que los niños nacidos tras ICSI tenían el doble de probabilidad de tener defectos mayores de nacimiento que niños de la población general. Y este mismo año se acaban de publicar dos estudios con resultados divergentes. El publicado en el "The New England Journal of Medicine" por un grupo australiano (14), concluye que la ICSI se asocia a un riesgo de un 9% de padecer un defecto congénito importante, frente a un 4,2% de

los niños concebidos de manera natural. En cambio, el publicado en el "Human Reproduction" que recoge una más amplia casuística en Bélgica de nuevo por Bonduelle y cols. (15) concluye que las posibilidades de malformaciones importantes en niños tras ICSI es de un 3,4% y tras FIV es de un 3,8%, cifras más en consonancia con las revisiones comentadas anteriormente.

Por otra parte, hemos de resaltar la difícil evaluación que pueda ocasionar en el desarrollo mental el bajo peso o muy bajo peso de algunos niños nacidos con ICSI, por la mayor frecuencia de gestaciones múltiples. Efectivamente, se han publicado casos de retraso en el desarrollo leves o significativos (memoria, resolución de problemas, habilidades de lenguaje). Por el contrario, otros trabajos hablan de bajas tasas de problemas neurológicos o de desarrollo a los 2 meses de edad, y de desarrollo mental normal a los 2 años de edad (16, 17).

Igualmente, la valoración estadística puede complicarse aún más por unos efectos que de momento deberíamos catalogar de hipotéticos y llamados por algunos "efectos a largo plazo" de las técnicas de reproducción asistida, como retrasos en el crecimiento físico, alteraciones en las funciones endocrinas, cáncer, problemas reproductivos ó alteraciones del comportamiento. Incluso existen otros posibles riesgos del ICSI, sin incidencia conocida, derivados de la herencia mitocondrial y citoplasmática, la impresión genética, la oxidación y degradación del DNA espermático y el uso de espermatozoides envejecidos.

En definitiva, la experiencia humana es la única disponible. Ello plantea la importante necesidad de una correcta evaluación de la pareja, y especialmente del varón infértil. Y completarse con un estrecho seguimiento de los resultados postnatales.

MATERIAL Y MÉTODOS

En el presente trabajo, hemos tratado de analizar nuestros propios resultados. Desde que iniciamos el programa de ICSI en Enero de 1995 hasta Marzo de 2001, hemos practicado 1424 ciclos completos, incluyendo en esta cifra los ciclos de donación de ovocitos con ICSI y los de posteriores criotransferencias tras ICSI.

Se recogen igualmente los abortos clínicos y los ectópicos.

En las pacientes gestantes que prosiguen el control de su embarazo, revisiones postparto y sucesivas visitas en nuestro centro, sus resultados perinatales son obviamente recogidos puntualmente y de forma más precisa. Las pacientes que tras confirmar su gestación, prosiguen sus controles posteriores desde su

lugar de origen, son requeridas telefónicamente o por carta, entre 2 a 4 meses posteriores a la fecha probable de parto, para que nos aporte a nuestro banco de datos, el día y forma de parto, sexo, peso y expresamente preguntadas sobre la salud de los recién nacidos.

Por la diferente procedencia de nuestras parejas y por su diversidad geográfica, nos es imposible realizar seguimientos a largo plazo, así como datos sobre el posterior desarrollo psíquico de estos niños.

No hemos considerado como anomalías congénitas, la morbilidad derivada intrínsecamente del bajo peso al nacer, consecuencia de los embarazos múltiples.

RESULTADOS

Hemos logrado en estos 1424 ciclos de ICSI, un total de 487 niños nacidos sin anomalías morfológicas conocidas en el momento de su nacimiento. En esta cifra se incluyen 47 niños nacidos tras ciclo de donación de ovocitos con ICSI y otros 9 tras criotransferencia.

Igualmente, hemos contabilizado con estas técnicas, un total de 65 abortos clínicos (11,5%) y 13 gestaciones ectópicas (2,3%), porcentajes que consideramos más que aceptables para este procedimiento.

En las gestaciones evolutivas, se han practicado estudio cromosómico mediante amniocentesis a un total de 39, siendo cariotipos normales en todas ellas.

Se han encontrado un total de 8 malformaciones estructurales, siendo diagnosticadas todas excepto una de ellas, mediante ecografía prenatal. Resulta pues una incidencia del 1,64%, cifra ligeramente inferior a las comentadas previamente.

Nuevamente hemos de hacer constar la dificultad de saber la frecuencia real del problema por las interrupciones de las gestaciones habidas también en nuestra casuística. Hemos optado por sumar los embarazos interrumpidos por defecto congénito, al total de recién nacidos, aún a sabiendas de estar incluso sobrevalorando las cifras, pues algunos defectos hubieran finalizado en aborto espontáneo o muerte intraútero de no haberlos detectado prenatalmente.

Describimos a continuación los 8 defectos encontrados, la semana del primer diagnóstico y forma de terminación:

-Caso 1: En semana 14, gran higroma quístico bilateral y septado, con posterior hidrops a nivel torácico. Rechazó amniocentesis. Parto inmaduro en semana 25 con muerte fetal intraparto. Sin datos biopsicos ni cariotipo.

-Caso 2: En semana 19, extenso mielomeningocele,

a nivel dorsal y lumbar con evidente hidrocefalia bilateral. Interrupción voluntaria.

-Caso 3: En semana 12, feto polimalformado, con ausencia de pared abdominal anterior, ausencia de parte de columna y de miembros inferiores. Interrupción voluntaria.

-Caso 4: Gestación gemelar, con diagnóstico tardío, en el último trimestre, de uno de los fetos con onfalocelo que requirió intervención inmediata y buena evolución de los dos recién nacidos.

-Caso 5: En semana 21, oligoamnios severo con riñón único y poliquistico. Interrupción voluntaria.

-Caso 6: En semana 15, visualización de megavejiga que evolucionó en las tres semanas siguientes a típico Síndrome de Prune-Belly. Interrupción voluntaria.

-Caso 7: En semana 20, cardiopatía catalogada de hipoplasia de cavidades izquierdas. Interrupción voluntaria.

-Caso 8: El único feto no diagnosticado prenatalmente. Se trató de una atresia de esófago, intervenido tras nacimiento sin complicaciones posteriores.

DISCUSIÓN

Se ha comprobado que el cariotipo de varones con azoospermia y oligoastenozoospermia severa es anómalo en un 5,8% (siendo un 4,2% en los cromosomas sexuales y un 1,5% en los autosomas). Estas tasas contrastan con las de los recién nacidos fenotípicamente normales, en los que se detectan alteraciones tan sólo en el 0,38% del total (0,14% en los gonosomas y un 0,25% en los autosomas). En los niños nacidos tras ICSI, como era de esperar, se ha comprobado un aumento de aneuploidías de los cromosomas sexuales en cifras que oscilan en torno al 1% (2).

Los estudios realizados directamente en los espermatozoides mediante hibridación in situ con fluorescencia (FISH), revelan que los varones infértiles, aun con cariotipo normal, presentan una tasa mayor de anomalías citogenéticas en sus espermatozoides (3). Estas anomalías se ha comprobado que se asocian con fallos de implantación y abortos durante el primer trimestre.

Igualmente es conocida la existencia en un 3-15% de estos varones, de microdeleciones en el cromosoma Y, concretamente en las regiones AZFb y AZFc de su brazo largo (4). Estos varones estériles, portadores de microdeleciones, transmitirán la mutación a todos sus hijos varones.

También es conocida la existencia de mutaciones relacionadas con la fibrosis quística en los varones con agenesia de conductos deferentes. Esta condi-

ción, hace necesario el cribaje a la pareja que va a iniciar el ciclo ICSI de las mutaciones más frecuentes en nuestra población

Por todo ello, en un principio se creó cierta inquietud sobre el resultado de los niños nacidos con este novedoso tratamiento ante la posibilidad de transmitir alteraciones genéticas a la descendencia. Llegado este punto, sería conveniente repasar la actual definición de la OMS respecto a lo que se entiende por defecto congénito: "Toda anomalía en el desarrollo morfológico, estructural, funcional o molecular presente en el nacimiento (aunque puede manifestarse posteriormente), ya sea de carácter interno o externo, familiar o esporádico, hereditario o no, único o múltiple". Por tanto, este concepto debe englobar los defectos dismórficos, los cromosómicos, las enfermedades mendelianas monogénicas y las endocrinopatías prenatales. Sin embargo, en la mayoría de trabajos referentes al tema que nos ocupa, se emplea con más asiduidad el término "malformaciones congénitas mayores", definidas como aquellas malformaciones que causan alteraciones funcionales o precisan corrección quirúrgica.

La mayoría de estudios epidemiológicos están de acuerdo en atribuir a los defectos congénitos una frecuencia en torno al 2,5% (5, 6). Igualmente similar es el 2,22% que señala el extenso trabajo español perteneciente al Estudio Colaborativo Español de Malformaciones Congénitas (7). Estas frecuencias, conviene resaltar que corresponde a la prevalencia de defectos en el recién nacido (número total de recién nacidos afectados por uno o más defectos congénitos, observados en el nacimiento y durante los primeros años de vida, en la población total de recién nacidos investigados), pero no refleja en absoluto su incidencia real. Además, las cifras de prevalencia de los defectos congénitos en una población concreta sólo poseen significado si se acompañan de las circunstancias específicas de la investigación y se incluye una definición clara de la patología evaluada con una perfecta metodología. Esta es la razón por la que las tasas disponibles pueden variar de manera importante y de que su comparación pueda conducir a errores, como posiblemente puede ocurrir en este capítulo concreto.

Además, hemos de tener en cuenta, el impacto que ha supuesto la posibilidad de interrumpir el embarazo tras la detección intraútero de gran número de patologías y defectos en el embrión y el feto. Ello conlleva un descenso en la prevalencia de defectos congénitos al nacimiento, con los problemas a la hora de analizar la frecuencia de cada defecto.

Parece que los resultados de los niños nacidos en

todo el mundo tras tratamiento de ICSI, eran en principio alentadores, pues la mayoría de los trabajos publicados confirmaban que no existe un aumento significativo del número de defectos congénitos, siempre inferiores al esperado 3%. Si bien, se trataba de publicaciones iniciales, referidas a grupos reducidos de casos (8-10). En los últimos años, existen datos procedentes de registros con amplia casuística que confirman una frecuencia muy similar siempre en torno al 2,5%, como el estudio en Bélgica de Bonduelle y cols. (11) y el de Lancaster y cols. (12) en Australia.

No obstante, hay trabajos que discrepan totalmente. Kurinczuk y cols. (13) encuentran que los niños nacidos tras ICSI tenían el doble de probabilidad de tener defectos mayores de nacimiento que niños de la población general. Y este mismo año se acaban de publicar dos estudios con resultados divergentes. El publicado en el "The New England Journal of Medicine" por un grupo australiano (14), concluye que la ICSI se asocia a un riesgo de un 9% de padecer un defecto congénito importante, frente a un 4,2% de los niños concebidos de manera natural. En cambio, el publicado en el "Human Reproduction" que recoge una más amplia casuística en Bélgica de nuevo por Bonduelle y cols. (15) concluye que las posibilidades de malformaciones importantes en niños tras ICSI es de un 3,4% y tras FIV es de un 3,8%, cifras más en consonancia con las revisiones comentadas anteriormente.

Por otra parte, hemos de resaltar la difícil evaluación que pueda ocasionar en el desarrollo mental el bajo peso o muy bajo peso de algunos niños nacidos con ICSI, por la mayor frecuencia de gestaciones múltiples. Efectivamente, se han publicado casos de retraso en el desarrollo leves o significativos (memoria, resolución de problemas, habilidades de lenguaje). Por el contrario, otros trabajos hablan de bajas tasas de problemas neurológicos o de desarrollo a los 2 meses de edad, y de desarrollo mental normal a los 2 años de edad (16, 17).

Igualmente, la valoración estadística puede complicarse aún más por unos efectos que de momento deberíamos catalogar de hipotéticos y llamados por algunos "efectos a largo plazo" de las técnicas de reproducción asistida, como retrasos en el crecimiento físico, alteraciones en las funciones endocrinas, cáncer, problemas reproductivos ó alteraciones del comportamiento. Incluso existen otros posibles riesgos del ICSI, sin incidencia conocida, derivados de la herencia mitocondrial y citoplasmática, la impresión genética, la oxidación y degradación del DNA espermático y el uso de espermatozoides envejecidos.

En definitiva, la experiencia humana es la única disponible. Ello plantea la importante necesidad de una correcta evaluación de la pareja, y especialmente del varón infértil. Y completarse con un estrecho seguimiento de los resultados postnatales.

CONCLUSIONES

1. A la vista de nuestros resultados, podríamos deducir que la ICSI, no aumenta la incidencia de anomalías morfológicas congénitas, como también confirman los numerosos trabajos publicados hasta la fecha. No obstante, hacemos constancia de la enorme dificultad de una perfecta recogida de datos perinatales y la diferencia de metodología en los diferentes estudios al respecto.

2. Aunque en un principio, como en la mayoría de centros, sí ofrecíamos la posibilidad de prueba invasiva de diagnóstico prenatal, en todos los casos de gestación por ICSI, desde hace varios años, sólo la ofrecemos en caso de indicación materna, antecedentes o expreso deseo de la pareja. En cambio prestamos progresivamente más importancia al correcto estudio previo a la pareja candidata de ICSI, incluyendo cariotipo, FISH de espermatozoides en determinados casos y cribaje de mutaciones frecuentes de fibrosis quística. Por último, y en casos muy puntuales, sí que habría que comentar la posibilidad del diagnóstico preimplantatorio.

3. Hacemos hincapié en el imprescindible estudio anatómico mediante ecografía comenzando ya en época embrionaria, en todos pero muy especialmente en los conseguidos mediante reproducción asistida, por sus especiales condiciones: esterilidades de larga duración, edad materna avanzada, habitual rechazo a pruebas invasivas y gestaciones múltiples. Por todo ello, la seguridad del diagnóstico ha de ser absoluta antes de tomar una conducta que conlleve una eventual interrupción del embarazo.

4. Necesidad de especial seguimiento pediátrico, y a la vista de las últimas publicaciones, estudio a largo plazo de estos niños. No obstante, sería necesario estandarizar los distintos índices de desarrollo mental y de desarrollo psicomotor existentes, así como tener en cuenta las diferencias demográficas, sociales y familiares para que los resultados pudieran ser comparables en las distintas series.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Palermo G, Joris H, Devroey P, Van Steirteghem A.:** Pregnancies after injection of single spermatozoa into an oocyte. *Lancet* 1992; 340: 17-18.

2. **Bonduelle M, Wilikens A, Buysse A, Van Assche E, Wisanto A, Devroey P.:** Prospective follow-up study of 877 children born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI). *Hum Reprod* 1996; Suppl 4: 131-155.
3. **Vegetti W, Van Assche E, Frias A, Verheyen G, Bianchi, Bonduelle M, Liebaers I, Van Steirteghem AC.:** Correlation between semen parameters and sperm aneuploidy rates investigated by fluorescence in-situ hybridization in fertile men. *Hum Reprod* 2000; 15: 351-365.
4. **Pryor J, Kent-First MG, Muallem A, Van Bergen AH, Nolten We, Meisner L, Roberts KP.:** Microdeletions in the Y chromosome of infertile men. *N Engl J Med* 1997; 336: 334-339.
5. **Lie RT, Wilcox AJ, Skjaerven R.:** A population-based study of the risk of recurrence of birth defects. *N Engl J Med* 1994; 331: 1-4.
6. **Winter RM.:** Analysing human developmental abnormalities. *BioEssays* 1996; 18(12), 965-971.
7. **Bermejo E, Martínez-Frías ML.:** Vigilancia epidemiológica de anomalías congénitas en España en los últimos años (período 1980-2000). *Boletín del ECEMC: Rev Dismor Epidemiol Serie IV(5)*, 2000: 27-126.
8. **Lancaster PAL.:** Congenital malformations after in-vitro fertilization. *Lancet* 1987; 18: 1392-3.
9. **Morin NC.:** Congenital malformations and psychosocial development in children conceived by in vitro fertilization. *J Pediatr* 1989; 115: 222-227.
10. **Bonduelle M.:** Comparative follow-up study of 130 children born after intracytoplasmic sperm injection and 130 children born after in vitro fertilization. *Human Reprod* 1995; 10: 3327-31.
11. **Bonduelle M.:** Seven years of intracytoplasmic sperm injection and follow-up of 1987 subsequent children. *Hum Reprod* 1999; 14 (Suppl) 243-264.
12. **Lancaster PAL.:** Congenital malformations and other pregnancy outcome after microinsemination. *Reprod Toxicol* 2000; 14: 74.
13. **Kurinczuk JJ, Bower C.:** Birth defects in infants conceived by intracytoplasmic sperm injection: an alternative interpretation. *BMJ*, 1997, 315: 1260-6.
14. **Hansen M, Kurinczuk JJ, Bower C, Webbs.:** The risk of major birth defects after intracytoplasmic sperm injection and in vitro fertilization. *N Engl J Med* 2002; 346 (10): 725-30.
15. **Bonduelle M, Liebaers I, Deketelaere V, Derde MP, Camus M, Devroey P, Van Steirteghem A.:** Neonatal data on a cohort of 2889 infants born after ICSI (1991-1999) and of 2995 infants born after IVF (1983-1999) *Human Reprod* 2002, 17: 671-694.
16. **Bonduelle M, Legein J, Buysse A, Van Assche E, Wisanto A, Devroey P, Van Steirteghem A, Liebaers I.:** Prospective followup study of 423 children after intracytoplasmic sperm injection. *Human Reprod* 1996, 11:1558.
17. **Bonduelle M, Joris H, Hofmans K, Liebaers J, Van Steirteghem A.:** Mental development of 201 children at 2 years of age. *Lancet* 1998, 351: 1553.