

## Anomalías congénitas tras técnicas de reproducción asistida y su correlación con la calidad embrionaria

### Congenital anomalies after assisted reproduction techniques and their correlation with embryonic quality

Francisco Sellers López<sup>1</sup>, Belén Moliner Renau, Jorge Ten Morro, Jaime Guerrero Villena, Ana Palacios Marqués, Rafael Bernabeu Pérez<sup>1</sup>

Instituto Bernabeu de Fertilidad y Ginecología, Alicante

<sup>1</sup>Cátedra de Medicina Comunitaria y Salud Reproductiva. Universidad Miguel Hernández Elche.

*La transferencia de embriones de mala calidad, se asocia a un mayor número de anomalías congénitas, tanto cromosómicas como malformaciones anatómicas.*

#### RESUMEN

**Objetivo:** Conocer la posible relación entre la calidad de los embriones transferidos en ciclos de Fecundación In Vitro (FIV) y Microinyección Intracitoplásmica de Espermatozoides (ICSI) con la presencia de anomalías fetales.

**Material y métodos:** Análisis retrospectivo incluyendo casos de anomalías congénitas (n=76), comparándolos con un grupo control (n=240) de nacimientos tras técnicas de reproducción asistida (TRA). Según los tipos de embriones obtenidos, se dividieron los casos en transferencia de calidad alta, media y baja.

**Resultados:** La aparición de defectos es similar con embriones de calidad alta (22,5 %) y media (21,8 %) pero se incrementa cuando se emplean los de baja calidad (40,0 %). Es similar en cuanto a la técnica empleada (FIV o ICSI), gestación única o múltiple, cultivo corto o largo. Sí hay influencia según la edad materna.

**Conclusión:** La transferencia de embriones de baja calidad, se asocia a la aparición de un mayor número de defectos congénitos.

( Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2016; 33; 28-35 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

**Palabras clave:** *Malformaciones congénitas, calidad embrionaria, fecundación in vitro, microinyección intracitoplasmática de embriones.*

Aceptado: Noviembre 2016

Correspondencia: Francisco Sellers López

C/José María Pemán, 7 1ºB

03600 Elda (Alicante)

608462492

fsellers@institutobernabeu.com

SOLICITUD REIMPRESIÓN: Email: editorialmedica@editorialmedica.com

---

## SUMMARY

**Objective:** To find out the possible correlation between the quality of embryos transferred in In Vitro Fertilization (IVF) and Intracytoplasmic Sperm Injection (ICSI) cycles and fetal anomalies.

**Materials and Methods:** Retrospective study including cases of congenital anomalies (n=76), compared to the control group (n=240) in births after assisted reproductive techniques (ART). Depending on the type of embryos obtained, the cases were divided into cases of high, medium and low quality transfer.

**Results:** The appearance of defects is similar between high (22.5 %) and medium (21.8 %) quality embryos, but increase when low quality embryos are used (40.0 %). This is similar in both techniques (IVF or ICSI), single or multiple pregnancies, long and short cultures. Maternal age does have an influence.

**Conclusion:** Transferring low quality embryos is related to the appearance of a higher number of congenital defects.

(Rev. Iberoam. Fert Rep Hum, 2016; 33; 28-35 © Revista Iberoamericana de Fertilidad y Reproducción Humana)

**Key words:** *Congenital malformations, quality embryos, IVF, ICSI*

## INTRODUCCIÓN

Desde el año 1978 en que las técnicas de reproducción asistida (TRA) se usaron por primera vez, se ha planteado si dichos tratamientos podrían tener un efecto adverso en el desarrollo del feto. Esta preocupación aumentó cuando, a mediados de los años noventa, se comenzó a utilizar la Inyección Intracitoplasmática de Espermatozoides (ICSI), que implica una manipulación de los gametos más compleja.

Se acepta que la mayor parte de la morbilidad neonatal observada en gestaciones conseguidas con TRA, se debe a las consecuencias derivadas de los embarazos múltiples y la prematuridad asociada (1-4). De hecho, un estudio reciente (5) concreta sus resultados en un 33 % de parto prematuro en niños nacidos por TRA, frente al 12 % de la población general; un 6,1 % de partos muy prematuros, frente al 2 % de la población fértil; y hasta un 47 % de probabilidad de gestación múltiple, frente al 3 % de la general.

Pero también se ha comprobado en amplias revisiones (6, 7), que los embarazos simples presentan igualmente un mayor riesgo de resultados adversos: prematuridad, bajo peso, anomalías congénitas y cualquier tipo de complicación perinatal. Queda por demostrar, si el hecho de presentar infertilidad previa, hace que estas parejas estén expuestas a mayores riesgos gestacionales. Y además, dado el gran número de factores que intervienen en los diversos tratamientos, es difícil establecer una relación causa-efecto directa bien con la estimulación ovárica, manipulación de gametos y embriones, condiciones de cultivo embrionario y entorno hormonal alterado en la implantación.

Otro tema controvertido es la posible asociación con anomalías en el neurodesarrollo y capacidad intelectual del recién nacido. Se ha llegado a analizar la relación de las TRA con la parálisis cerebral, el autismo y problemas sensoriales

(8), e igualmente con fallos en la impronta génica, aunque en esta situación, con una tasa de aparición escasa como para poder ser analizada de manera estadística (9).

La mayoría de publicaciones hacen referencia a la asociación de las TRA con aneuploidías, antes o ya después de la transferencia, pero en menor número tanto a la aparición de anomalías morfológicas, como del controvertido desarrollo intelectual a largo plazo. Algunos autores encuentran una relación significativa entre la aparición de dichas anomalías y el uso de TRA como el ICSI o la FIV (7, 10-16). Existen, no obstante, estudios que no sólo no encuentran diferencias entre el uso de uno u otro tratamiento y la aparición de anomalías congénitas sino que incluso los hay que no asocian las TRA con la prevalencia de malformaciones (17-20).

El objetivo último de la medicina de la reproducción ha sido siempre conseguir llevar un bebé a casa de la pareja paciente. Sin embargo dicho objetivo puede ser ampliado, afirmando que éste debería ser conseguir llevar a casa un bebé sano. Es por eso que se debe hacer todo lo que esté en la mano de los facultativos para asegurar que el embrión que se transfiere tras las TRA es el que más probabilidades tiene de implantar y posteriormente de desarrollarse de manera normal.

La calidad de los embriones transferidos ha sido identificada desde hace mucho como un potente predictor de la probabilidad de implantación, gestación clínica y nacido vivo, pero la relación entre esta variable y el riesgo malformativo, no ha sido objeto de una valoración tan extensa. El presente estudio pretende comparar la aparición de defectos congénitos en TRA con la calidad de los embriones que se transfieren, con la hipótesis inicial de que los embriones de mejor calidad serán los que menos tasa de aparición de defectos presente, tanto estructurales como cromosómicos.

Se incide igualmente, el escaso número de publicaciones al respecto, lo que permite destacar la pertinencia de la pregunta de investigación y en definitiva el trabajo en sí.

## MATERIAL Y MÉTODOS

Los casos analizados para este estudio retrospectivo son la totalidad de casos detectados de anomalías congénitas tras los diversos tratamientos de reproducción asistida: fecundación in vitro convencional, ICSI y ovodonación, con transferencia de embriones frescos o tras congelación de los mismos, en el Instituto Bernabeu entre los años 1999 y 2012 (n=76). Sólo se han incluido en el estudio los defectos que han contado con un diagnóstico preciso: en los casos de malformaciones estructurales mediante ecografía prenatal, siempre contrastada en los casos con terminación voluntaria del embarazo. En los casos con nacimiento, tras verificar el diagnóstico por parte del equipo pediátrico correspondiente. Y las cromosomopatías, tras la correspondiente prueba invasiva, biopsia corial o amniocentesis. Se han incluido igualmente, aquellas anomalías que dieron lugar a muerte fetal anteparto pero siempre contando con el diagnóstico patológico concreto.

Se comparan con un grupo control (n=240) de parejas tratadas también en el Instituto Bernabeu, con un similar tipo de TRA que cursaron con gestaciones sin ninguna complicación y con recién nacidos completamente sanos, con comprobación pediátrica tras el primer mes de vida, entre los años 2009 a 2012.

No se han incluido en ninguno de los grupos, las parejas ya conocidas portadoras de algún defecto cromosómico o en el contexto familiar de cualquiera de las enfermedades monogénicas. E igualmente se han excluido las parejas con antecedente anterior de feto con anomalía congénita de cualquier tipo.

La clasificación de calidad embrionaria de ASEBIR se basa en la observación de determinados parámetros morfológicos en los embriones fecundados tras TRA según el día de desarrollo en el que se encuentren. Para los días 2 y 3 se observan indicadores como, principalmente, el número de células y el grado de fragmentación del citoplasma, así como la presencia de vacuolas, células multinucleadas o asimetría celular, entre otros. En el caso de día 5 (fase de blastocisto) se observa la presencia y condición del trofoectodermo, la masa celular interna, y el grado de expansión del blastocelo. La calidad embrionaria se refleja con las letras A, B, C y D, de mayor a menor grado.

A la hora de clasificar la calidad embrionaria de cada tratamiento, se observan casos con transferencias de embriones no homogéneos. Esto es, en los casos en los que se transfirió

más de un embrión, éstos por lo general presentaban distintas calidades. Para solucionar esta dificultad, se decidió clasificar cada caso en Calidad embrionaria Alta, Media o Baja, donde Alta serían transferencias con embriones de calidades A y B, Calidad Media serían combinaciones A-C, B-C, A-D o B-D; y Calidad Baja serían embriones C y D.

De manera adicional, se comparó la aparición de defectos con otros factores, para profundizar en su estudio. Estos factores son la edad de la madre, el tipo de TRA usado, el tipo de anomalías, el uso de cultivo embrionario largo y la aparición de gestación múltiple.

En cuanto al análisis estadístico, las variables cuantitativas son descritas como medias y desviaciones estándar y las categóricas se muestran como porcentajes. Para el análisis univariante entre las características basales de los grupos de interés se ha realizado una prueba  $\chi^2$  con el análisis exacto de Fisher para variables categóricas. Las variables cuantitativas han sido estudiadas mediante la prueba T de Student para grupos independientes. Tras ello se ha realizado una regresión logística multivariante ajustada por aquellas potenciales variables de confusión. Se ha descrito como asociación estadísticamente significativa aquellas cuya *p* era menor de 0,05. Para el análisis estadístico se ha empleado el sistema IBM SPSS 19.0.

## RESULTADOS

El grupo de estudio se compone de 316 casos de parejas que recurrieron a TRA, 240 de las cuales (el 75,9 %) forma parte del grupo control, mientras que los 76 restantes (24,1 %) presentan alguna anomalía congénita. Se detalla en la Tabla 1 su tipo.

TABLA 1	
TIPO DE ANOMALÍA	CASOS
Cromosomopatías	15
Urológicas	14
Sistema nervioso central	13
Cardiovasculares	12
Orofaciales	7
Músculoesqueléticas	6
Gastrointestinales	5
Polimalformados	3
Respiratorias	1
TOTAL	76

En la Tabla 2 se exponen todos los casos clasificados según el tipo embrionario transferido, en Alta calidad (231), Media calidad (55) y Baja calidad embrionaria (30), asignándose a cada grupo los casos de anomalías fetales. La figura 1 resulta más descriptiva para comprender el alto número de anomalías aparecidas con la transferencia de embriones de mala calidad, en el 40 % de casos.

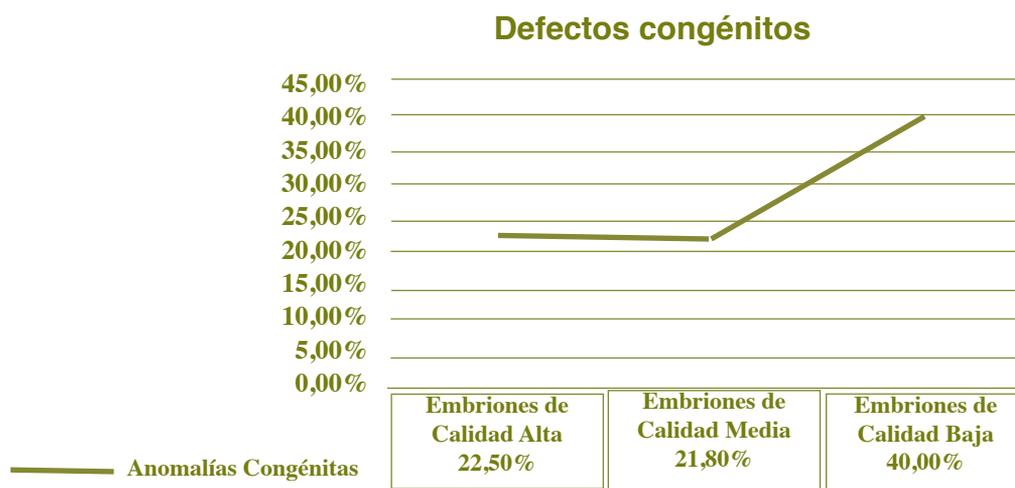
La Tabla 3 refleja la relación de anomalías con la duración del cultivo embrionario, el tipo de tratamiento empleado, gestación resultante y edad materna. En primer lugar, se relacionó embriones transferidos en estadio celular (días dos y tres de desarrollo) o tras cultivo largo (días 4 y 5) y la aparición de defectos y se observó que las proporciones eran muy similares al ver una frecuencia total de 203 transferen-

<b>Calidad de embriones transferidos en todos los casos</b>			
CALIDAD DE EMBRIONES TRANSFERIDOS	Total	Con anomalía congénita	Sin anomalía congénita
Alta	231 (73,1%)	52(22,5%)	179(77,5%)
Media	55(17,4%)	12(21,8%)	43(78,2%)
Baja	30(9,5%)	12 (40,0%)	18 (60,0%)

<b>Relación de anomalías congénitas según variables de laboratorio, gestaciones múltiples y edad materna</b>			
	<b>Malformaciones congénitas</b>		<b>p</b>
	<b>No (N=240)</b>	<b>Si (N=76)</b>	
<b>Día de la Transferencia</b>			
Cultivo Largo	34,6%(83)	39,5%(30)	0,493
Estadio celular	65,4%(157)	60,5%(46)	
<b>Técnica de Fertilización</b>			
FIV	25,0%(60)	34,2%(26)	0,139
ICSI	75,0%(180)	65,8%(50)	
<b>Tipo de gestación</b>			
Única	61,7%(148)	65,8%(50)	0,587
Gemelar	38,3%(92)	34,2%(26)	
<b>Edad Materna</b>	33,94(4,2)*	35,54(4,1)*	0,004

\*Media (Desviación Estandar)

**FIGURA 1**  
**Porcentaje de anomalías congénitas aparecidas en los diferentes grupos de calidad embrionaria**



cias antes del día 5 de desarrollo embrionario (46 con anomalías y 157 sin ellas) y un total de 113 ciclos largos (83 con desarrollo normal y 30 anómalos). La técnica FIV se usó en 86 casos y se manifestó un desarrollo anómalo en 26 de ellos, mientras que 60 presentaron un desarrollo normal. En el caso de la ICSI, usada un total de 230 veces, 180 de las cuales no manifestaron defectos congénitos. Resultó un total de 198 embarazos únicos, 148 de los cuales fueron normales y 50 anómalos; y 118 embarazos gemelares, 92 normales y 26 con defectos.

No existen diferencias estadísticamente significativas en relación a todos estos datos, sin embargo, sí existen en cuanto a la edad materna asociada a la aparición de anomalías ( $p=0,004$ ). Y por ello se ha creído conveniente realizar un ajuste estadístico para neutralizar esta variable, en concreto una regresión logística multivariante ajustada a la edad materna para valorar la asociación entre calidad embrionaria y la aparición de anomalías congénitas. En este procedimiento, se ha usado como referencia la buena calidad embrionaria. No se ha observado ninguna asociación en lo referente a calidad embrionaria media en comparación con la buena calidad, siendo ambas situaciones equiparables. En la Tabla 4 podemos observar los resultados del estudio estadístico ajustado a la edad, observando como el riesgo de anomalías congénitas se incrementa hasta 2,32 veces más en el caso de transferencias con embriones de mala calidad con respecto a aquellas pacientes que van a tener una transferencia de buena o media calidad

## DISCUSIÓN

En el presente trabajo, la calidad de los embriones transferidos, según los criterios de ASEBIR, se correlacionó con una mayor incidencia de defectos congénitos en el desarrollo fetal cuando se transfieren embriones de baja calidad (Figura 1). Y aunque es una tendencia sin significado estadístico, la baja calidad unida a la transferencia en estadio celular es la que más riesgo presenta de aparición de defecto, situación lógica pues se comprende que si éstos sobreviven hasta el estadio de blastocisto en el laboratorio, es en definitiva un embrión mejor en todos los sentidos (Figura 2).

Muchos estudios relacionados con anomalías congénitas advierten de la dificultad de realizar un estudio adecuado a este respecto. Por lo general se plantean las complicaciones a la hora de detectar las malformaciones en estudios longitudinales (21) y son varios los trabajos que recomiendan que el grupo control para estudios de malformaciones no deberían ser embarazos espontáneos, ni embarazos tras TRA sin anomalías fetales, sino parejas subfértiles que conciben de manera espontánea antes de someterse a un TRA, de manera que se pueda descartar la propia subfertilidad como posible causante de defectos (22). Este estudio no pudo tener en cuenta dicho grupo debido a que se trabajó con la calidad de los embriones transferidos durante un procedimiento de TRA. Asimismo, no se pudo relacionar la calidad con el tipo de malformación debido a la baja incidencia de cada grupo de malformaciones en la población estudiada.

Además, hay estudios relacionados con síndromes implicados en fallos de impronta génica que coinciden en la dificultad de establecer relaciones entre dichas enfermedades y las TRA. Esto es así ya que algunas de estas enfermedades (como por ejemplo el síndrome de Angelman o el de Beckwith-Wiedemann) solo se pueden relacionar con los tratamientos si son causadas en la mayoría de los casos por fallos epigenéticos de metilación del ADN (o epimutaciones). Para síndromes con epimutaciones infrecuentes su relación con los TRA es prácticamente imposible de detectar (9, 21). Sería necesario, tal vez, un estudio multicéntrico para obtener una población lo suficientemente grande como para permitir establecer correlaciones.

El análisis realizado en el presente trabajo sobre la relación entre el tipo de TRA usado contradice la postura general de la bibliografía consultada, que afirma que sí existe una correlación entre el uso de la ICSI y la aparición de defectos. No obstante, existen estudios que no establecen dicha relación (11, 17).

En el presente estudio, tan solo se tuvo en cuenta, como TRA, la FIV y la ICSI, sin observar otras variantes, especialmente si la transferencia fue de embriones congelados, pues algunos trabajos confirman diferentes resultados, es-

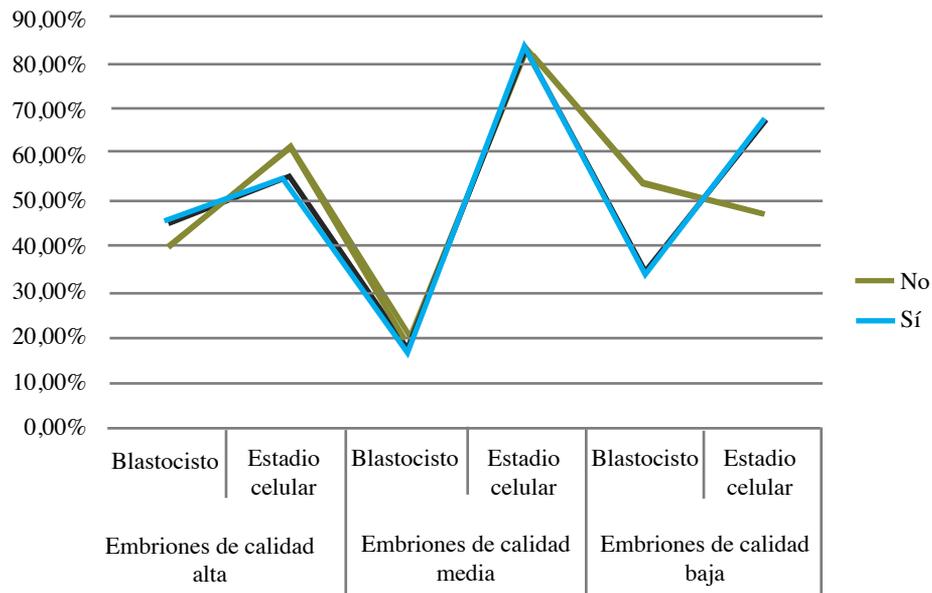
**TABLA 4**

**Odds Ratio ajustado por edad materna para el cálculo de riesgo de anomalías en relación a la calidad embrionaria.**

	Malformaciones Congénitas		OR (IC 95%)	p
	No (N=240)	Sí(N=76)		
Calidad Embrionaria Alta	74,6%(179)	68,4%(52)		
<b>Media</b>	<b>17,9%(43)</b>	<b>15,8%(12)</b>	<b>0,91 (0,4 a 1,9)</b>	<b>0,795</b>
Baja	7,5%(18)	15,8%(12)	2,4 (1,1 a 5,2)	0,04

FIGURA 2

Porcentaje de anomalías según el tipo de embrión y el día de su transferencia



pecialmente en el peso fetal, según el tipo de transferencia (23). Si bien no está clara la razón, podría deberse al proceso de selección cualitativo al que se ve sometido un embrión a la hora de ser congelado. Es evidente, pues, que hay múltiples factores de confusión a tener en cuenta a la hora de determinar si la causa de aparición de anomalías congénitas viene determinada por el propio tratamiento.

No se consiguió realizar una correlación significativa entre la frecuencia de embarazo simple o múltiple y la incidencia de defectos congénitos. No obstante, sólo se tuvieron en cuenta como múltiples aquellas gestaciones llevadas a término con el nacimiento de dos o más bebés vivos, sin tener en cuenta aquellas gestaciones en las que existió más de un feto, pero uno o más de éstos fallecieron a causa de la anomalía.

Y además, dada la escasez de casos, y sabiendo que gran número de transferencias son de dos embriones, nos vimos en la necesidad de estratificar en los tres grupos ya comentados, aun sabiendo que lo ideal hubiera sido el estudio de casos con transferencia de embrión único. Creemos que este hecho podría haber sesgado nuestros resultados.

Dada la evidencia bibliográfica de la relación entre el uso de cultivo embrionario largo y la incidencia de defectos con-

génitos, se analizaron los datos recabados en este estudio dando como resultado que no existe correlación (de hecho, al observar la tabla de contingencia se puede observar a simple vista que las proporciones son prácticamente idénticas). Algunos estudios argumentan que existe una mayor probabilidad de aparición de malformaciones si se realiza una transferencia embrionaria en día 5 (fase de blastocisto) que si se transfería en día 2, o fase de división. Cabe mencionarse que dichos estudios no tienen en cuenta si se trata de una transferencia en fresco o de embrión congelado (4). Sin embargo otros trabajos concluyen como menos probable el desarrollo fetal anómalo en embriones transferidos tras cultivo largo, argumentando que se da un proceso de selección más preciso (23).

Nuestro estudio ha determinado que existe una relación entre la edad materna y la incidencia de desarrollo fetal anómalo. Este hecho se ve confirmado, aunque con matices, por el estudio de *Munné et al.*, que relacionaba la edad materna con el desarrollo morfológico del feto y las anomalías cromosómicas. Dicho estudio se dividió en dos grupos: embriones de buena y mala morfología. Los embriones de buena morfología dieron lugar a fetos euploides en el 41 % de los casos en madres de edad inferior a 35 años, reduciéndose hasta un 21 % en madres de más de 41 años. Para el

grupo de mala morfología el porcentaje de fetos euploides en madres de menos de 35 años fue de 30 %, mientras que en las de más de 41 años se redujo a un 12 %. Según este estudio, sólo las aneuploidías se relacionaron significativamente con la edad materna (24).

Algunos trabajos citan una serie de variables que se deberían medir como posibles factores de confusión pero que habitualmente no se consideran, como la situación socioeconómica de la pareja, los factores de infertilidad del padre y de la madre y, los TRA previos (5, 8). También podría ser otro factor de confusión, el no haber valorado en dos diferentes subgrupos la aparición de anomalía cromosómica y el defecto puramente anatómico, aún sabiendo que las causas pudieran ser distintas. Es pues una situación que podría restar validez al estudio, pero se ha optado por incluirlos en un mismo grupo, dada la escasez de casos.

Igualmente los embarazos tras TRA suelen considerarse de alto riesgo, por lo que precisan de un control más exhaustivo, siendo por tanto más probable que se detecten con más facilidad anomalías. Y además, considerando el embarazo múltiple como un efecto adverso de las TRA, se sabe que los gemelos tienen una mayor probabilidad de desarrollar anomalías (los monocoriales más que los dicoriales) provengan o no de TRA. Y por último, procedimientos como el diagnóstico genético preimplantacional y la embrioreducción selectiva se consideran factores de riesgo añadidos, aunque no hay evidencia conclusiva.

Por tanto, y como conclusión, la situación ideal es conseguir embriones de calidad y cultivarlos hasta blastocistos para proceder a su transferencia. En caso contrario, debemos prestar especial atención en los casos de TRA con transferencias de embriones de baja calidad que finalmente implantan y se desarrollan: se trataría de gestaciones con especial seguimiento para tratar de descartar anomalías o conseguir un diagnóstico temprano de cualquiera de las habituales complicaciones obstétricas. Y haciendo hincapié de que esta situación es independiente del factor edad materna.

Es de esperar la progresiva implantación en los TRA de protocolos que incluyan la transferencia de embrión único con biopsia previa para el estudio de toda la dotación cromosómica mediante array-CGH. Sería pues recurrir al CCS (Screening Cromosómico Completo), técnica ya validada como la más segura para conocer la salud cromosómica del embrión y conseguir altas tasas de gestaciones únicas y menor número de abortos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. **Buitendijk SE.** Children after in vitro fertilization. An overview of the literature. *Int J Technol Assess Hlth Carewint.* 1999;15:52–65.

2. **Olivennes F.** Avoiding multiple pregnancies in ART Double trouble: yes a twin pregnancy is an adverse outcome. *Human Reproduction.* 2000;15:1663–5.
3. **Koudstaal J, Bruinse HW, Helmerhorst FM, Vermeiden JP, Willemsen WN, Visser GH.** Obstetric outcome of twin pregnancies after in-vitro fertilization: a matched control study in four Dutch university hospitals. *Hum Reprod.* 2000;15:935–40.
4. **Pinborg A, Loft A, Rasmussen S, Schmidt L, Langhoff-Roos J, Greisen G, et al.** Neonatal outcome in a Danish national cohort of 3438 IVF/ICSI and 10,362 non-IVF/ICSI twins born between 1995 and 2000. *Hum Reprod.* 2004;19:435–41.
5. **Barnhart KT.** Assisted reproductive technologies and perinatal morbidity: interrogating the association. *Fertil Steril.* 2013;99:299–302.
6. **Wen J, Jiang J, Ding C, Dai J, Liu Y, Xia Y, et al.** Birth defects in children conceived by in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2012;97:1331–1337.
7. **Hansen M, Bower C, Milne E, de Klerk N, Kurinczuk J.** Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects – a systematic review. *Hum Reprod.* 2004;20:328–388.
8. **Hediger ML, Bell EM, Druschell C, Louis CMB.** Assisted reproductive technologies and children's neurodevelopmental outcomes. *Fertil Steril.* 2013;99:311–317.
9. **Amor DJ, Halliday J.** A review of known imprinting syndromes and their association with assisted reproductive technologies. *Hum Reprod Vol* 2008;23:2826–2834.
10. **Pinborg A, Henningsen AKA, Malchau SS, Loft A.** Congenital anomalies after assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2013;99:327–332.
11. **Wen J, Jiang J, Ding C, Dai J, Liu Y, Xia Y, et al.** Birth defects in children conceived by in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. *Fertil Steril* 2012;97:1331–1337.
12. **Buckett WM, Chian RC, Holzer H, Dean N, Usher R, Tan SL.** Obstetric outcomes and congenital abnormalities after in vitro maturation, in vitro fertilization, and intracytoplasmic sperm injection. *Obstet Gynecol* 2007;110:885–91.
13. **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.
14. **McDonald SD, Murphy K, Beyene J, Ohlsson A.** Perinatal outcomes of singleton pregnancies achieved by in vitro fertilization: a systematic review and meta-analysis. *J Obstet Gynaecol Can* 2005;27:449–59.
15. **Ludwing M, Katalinic A.** Malformation rate fetuses and children conceived after ICSI: result of a prospective cohort study. *Reprod Biomed Online* 2002;5:171–8.
16. **Mau C, Juul A, Main KM, Loft A.** Children conceived after intracytoplasmic sperm injection (ICSI): is there a role for paediatrician? *Acta Paediatr* 2004;93:1238–44.
17. **Beukers F, Heide M, Middelburg KJ, Cobben JM, Mastenbroek S, Breur R, Lee JH, Hadders-Algra M, Bos AF, Kok JH.** Morphologic abnormalities in 2-year-old children born after IVF/ICSI with preimplantation genetic screening: follow-up of a randomized controlled trial. *Fertil Steril* 2013;99: 408–413.
18. **De Mouzon J, Lancaster P.** International working group for registers on assisted reproduction. *J Assist Reprod Gen* 1997;14:2515–55.
19. **Bonduelle M, Liebaers I, Deketelaere V, Derde MP, Camus M, Devroey P, 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.
20. **Pinborg A, Loft A, Nyboe Andersen A.** Neonatal outcome in a Danish national cohort of 8602 children born after in vitro fertilization or intracytoplasmic sperm injection: the role of twin pregnancy. *Acta Obstet Gynecol Scand* 2004;83: 1071–8.
21. **Yeung EH, Druschell C.** Cardiometabolic health of children concei-

---

ved by assisted reproductive technologies. *Fertil Steril* 2013;99:318-326.

**22. Kondapalli LA, Perales-Puchalt A.** Low birth weight: is it related to assisted reproductive technologies or underlying infertility? *Fertil Steril* 2013;99:303-310.

**23. Nakashima A, Araki R, Tani H, Ishihara O, Kuwahara A, Irahara M, Yoshimura Y, Kuramoto T, Saito H, Nakaza A.** Implications of

assisted reproductive technologies on term singleton birth weight: an analysis of 25777 children in the national assisted reproduction registry of Japan. *Fertil Steril* 2013; 99: 450-455.

**24. Munné S, Chen S, Colls P, Garrisi J, Zheng X, Cekleniak N, Lenzi M, Hughes P, Fischer J, Garrisi M, Tomkin G, Cohen J.** Maternal age, morphology development and chromosome abnormalities in over 6000 cleavage-state embryos. *Reprod Biomed Online* 2007;14: 628-34.