

A criança concebida por técnicas de reprodução assistida: aspectos pré- e perinatais

The child conceived by assisted reproduction techniques: pre- and perinatal aspects

Taciana Fontes Rolindo ¹, Bruno Ramalho de Carvalho ¹, David Barreira Gomes Sobrinho ¹, Juliana Fabrícia Cuzzi ², Adelino Amaral Silva ¹, Hitomi Miura Nakagava ¹

¹ GENESIS - Centro de Assistência em Reprodução Humana, Brasília, Distrito Federal, Brasil

² Genesis Genetics Brasil, São Paulo, São Paulo, Brasil

RESUMO

Estima-se que aproximadamente 5 milhões de crianças concebidas por técnicas de reprodução assistida tenham nascido desde 1978. Embora a infertilidade seja considerada fator de risco independente para a saúde do conceito, suspeita-se que possa existir maior chance de alterações pré- e perinatais em crianças concebidas em ciclos terapêuticos. Este artigo pretende condensar as informações disponíveis acerca de alterações epigenéticas, anomalias cromossômicas numéricas e estruturais, resultados perinatais e anomalias congênitas dessas crianças.

Palavras-chave: Fertilização In Vitro, Anormalidades Congênitas, Padrões de Herança, Desenvolvimento Infantil

ABSTRACT

It is estimated that approximately 5 million children conceived by assisted reproduction techniques have been born since 1978. Although infertility is considered an independent risk factor for health problems, an increased chance of pre- and perinatal problems in those children has been attributed to therapeutic cycles. This article aims to condense the information available about altered epigenetic inheritance, numerical and structural chromosomal anomalies, perinatal results and birth defects for those children.

Keywords: Fertilization In Vitro, Congenital Abnormalities, Inheritance Patterns, Child Development

INTRODUÇÃO

Estima-se que aproximadamente 5 milhões de crianças concebidas a partir de técnicas de reprodução assistida (TRA) tenham nascido desde 1978. De acordo com a European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE), realizam-se cerca de 1,5 milhão de ciclos terapêuticos por ano em todo o mundo, que resultam em mais de 300.000 nascimentos. Hoje, em países como Bélgica, Dinamarca, Holanda e Suécia, mais de 3,0% dos nascimentos são resultantes de TRA e os últimos anos apresentaram crescimento de até 10% na quantidade de ciclos terapêuticos em muitos outros países desenvolvidos. A injeção intracitoplasmática de espermatozoides (ICSI) responde por dois terços dos ciclos realizados no mundo e a fertilização in vitro convencional (FIV), por um terço (ESHRE, 2012). Embora a infertilidade seja considerada fator de risco independente para a saúde fetal (Joffe & Li, 1994; Gray & Wu, 2000), atribui-se risco aumentado de problemas genéticos e defeitos congênitos a crianças concebidas por TRA, em consequência de múltiplos fatores, como indução artificial da ovulação, mudanças do meio folicular e intracelular oocitário, manipulação extracorpórea de gametas e embriões, processos de congelamento e descongelamento, e biópsias embrionárias (Terada et al., 2000; Ertzeid & Storeng, 2001;

Hansen et al., 2005). A literatura sugere, ainda, que as TRA estejam associadas a prognóstico perinatal adverso, o que incluiria aumento dos riscos de parto pré-termo (PPT), baixo peso ao nascimento (BPN) e mortalidade perinatal (Helmerhorst et al., 2004; Jackson et al., 2004; McDonald et al., 2005).

Este artigo de revisão pretende condensar informações disponíveis sobre alterações epigenéticas, anomalias cromossômicas numéricas e estruturais, resultados perinatais e anomalias congênitas de crianças concebidas por TRA.

ALTERAÇÕES EPIGENÉTICAS

A herança epigenética é classicamente associada com a regulação da expressão de alguns genes resultando em um fenótipo único. Atualmente, assume-se um conceito mais amplo, no qual a herança epigenética está associada a todos os mecanismos envolvidos na transferência hereditária de informação não-genética, interferindo na função gênica, mas sem modificar a sequência de DNA (Wu & Morris, 2001; Dupont et al., 2009). Os mecanismos de herança epigenética melhor conhecidos envolvem: metilação do DNA, principalmente no quinto carbono de citosinas que são seguidas por uma guanina (ativação e desativação de genes); modificações de histonas, que incluem metilação, acetilação, ubiquitinação e sumoilação da lisina, fosforilação de serina e treonina, e metilação da arginina; complexos de remodelação da cromatina e outras proteínas reguladoras; impressão genômica, através da qual a expressão de um gene está limitada a um dos alelos parentais; modificações de cromatina mediadas pelo RNA, incluindo microRNAs que podem se ligar e regular RNAs mensageiros múltiplos; e mecanismos de alterações físicas no posicionamento e remodelamento nucleossomal (Kim et al., 2009; Sharma et al., 2010; van Montfort et al., 2012).

A relevância clínica do assunto quando se trata de TRA é baseada na ideia de que qualquer perturbação do ambiente durante os processos de folículo-gênese, gametogênese e/ou embriogênese poderia gerar alterações indesejáveis da herança epigenética (Dupont et al., 2009). Assim, entre as causas possíveis para distúrbios epigenéticos naquelas crianças incluir-se-iam fatores parentais, uso de drogas para estimulação ovariana, características dos meios de cultivo utilizados no tratamento, manipulação extracorpórea de gametas e embriões. Contudo, constatamos apenas a sugestão mas não está claro na literatura se mudanças sutis na metilação do DNA podem levar a mudanças significativas no fenótipo de crianças concebidas por TRA quando comparadas às concebidas naturalmente (Savage et al., 2011). Apesar de serem mais evidentes em ratos do que em seres humanos (van Montfort et al., 2012; De Waal et al., 2012), modificações epigenéticas têm sido descritas em crianças concebidas in vitro (Katari et al., 2009). Dentre elas destacam-se as alterações responsáveis pelas síndromes de

Beckwith-Wiedemann (BWS) (Amor & Halliday, 2008; Ceelen et al., 2008b; Manipalviratn et al., 2009; Lim et al., 2009) e Angelmann (AS) (Lawrence & Moley, 2008). Em crianças com BWS concebidas por TRA, observou-se prevalência considerável de hipometilação KCNQ1OT1, SNRPN, PEG1, PLAGL1 e IGF2R, o que sugere que os defeitos de impressão genômica nessa população podem ser múltiplos (Rossignol et al., 2006; Lim et al., 2009). Contudo, pela raridade de tais defeitos na população geral, não se pode determinar sua verdadeira incidência em crianças concebidas por FIV/ICSI e a literatura é controversa; enquanto Lidegaard e colaboradores não identificaram qualquer alteração de impressão genômica entre 1680 crianças concebidas por FIV e 4372 geradas por ICSI (Lidegaard et al., 2005), o estudo de 1524 indivíduos concebidos por FIV/ICSI identificou características fenotípicas compatíveis com distúrbio de impressão em 174 crianças e, entre as 47 crianças avaliadas clinicamente, um caso de BWS, três casos com sintomas compatíveis com BWS sem hipometilação KCNQ1OT1 e um caso com sintomas condizentes com AS sem hipometilação SNRPN (Bowdin et al., 2007).

De acordo com Sato e colaboradores, a estimulação ovariana com gonadotrofinas pode ser responsável por metilação do DNA e perturbações na expressão de alguns genes impressos em oócitos (Sato et al., 2007). O estudo de Ibala-Romdhane e colaboradores analisou oócitos humanos maturados in vivo e encontrou distúrbios de metilação mais frequentes do que BWS após FIV. Os autores observaram hipometilação significativa de alelos paternos, que foi atribuída à impressão instável nos primeiros estádios do desenvolvimento embrionário, e metilação anormal de alelos maternos em embriões de desenvolvimento arrastado, equivalentes para FIV e ICSI (Ibala-Romdhane et al., 2011).

Também há na literatura sugestão de que alterações epigenéticas podem impor a crianças concebidas por FIV maior risco de desenvolverem problemas de saúde na vida adulta, como diabetes, obesidade (Katari et al., 2009), câncer, doença coronariana e acidente vascular cerebral (Dupont et al., 2009). Por fim, interferências ambientais foram associadas a alterações de segregação e integridade dos cromossomos durante a embriogênese de mamíferos, estabelecendo-se, assim, um elo hipotético entre mecanismos genéticos e epigenéticos como fatores causais para aneuploidias (Herrera et al., 2008).

ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS

A associação entre TRA e anomalias cromossômicas ainda é controversa. Diferentes estudos referem aumento de 1,5% a 3,3% na incidência de alterações cromossômicas em crianças concebidas por TRA, especialmente as não herdadas (de novo) (Loft et al., 1999; Bonduelle et al., 2002; Jozwiak et al., 2004). Bonduelle e colaboradores avaliaram 5884 crianças concebidas por TRA nas décadas de 1980 e 1990, e encontraram cariótipos fetais alterados em aproximadamente 3,0% delas (Bonduelle et al., 2002), percentual este elevado em relação a 0,5% previsto para a população geral (Jacobs et al., 1992).

Estudo recente de Al-Asmar e colaboradores associou maior ocorrência de anomalias cromossômicas em embriões de casais com abortos aneuplóides prévios em gestações espontâneas ou por TRA, principalmente quando as perdas relacionaram-se a aneuploidias autossômicas; não houve diferenças, contudo, entre aneuploidias advindas de gestação espontânea ou TRA (Al-Asmar et al., 2012).

Embora se tenha demonstrado maior frequência de monossomia do X (Martinez et al., 2010) e de poliploidias após TRA (Bettio et al., 2008), os mesmos estudos e outros falharam em estabelecer com poder suficiente diferenças estatísticas entre as frequências de anomalias cromossômicas de crianças concebidas naturalmente e por TRA (Ma et al., 2006; Bettio et al., 2008; Martinez et al., 2010; Kim et al., 2010). Ma e colaboradores avaliaram 80 abortos espontâneos, por métodos citogenéticos convencionais ou hibridização genômica comparativa, dentre os quais 46 derivados de ICSI e 34, de FIV; a incidência de aberrações em cromossomos sexuais, principalmente a monossomia do cromossomo X, foi de 11% no grupo de ICSI, mas não houve casos entre os conceitos oriundos de FIV. Quando a ICSI foi comparada à concepção espontânea,

contudo, a incidência de monossomia do cromossomo X foi significativamente superior (Ma et al., 2006).

Kim realizou análise cromossômica de 382 espécimes de restos ovulares obtidos por esvaziamento uterino após abortamento clínico. Utilizou-se métodos citogenéticos convencionais para tal análise. Destes abortos, 114 foram obtidas a partir de FIV convencional, 140 a partir de ICSI, e 128 foram obtidos a partir de um grupo controle. Os autores não encontraram aumento do risco de anomalias cromossômicas, em mulheres submetidas a TRA com a exceção de um maior número de anormalidades dos cromossomos sexuais no grupo submetido a ICSI com fator de infertilidade masculina severa. Portanto, estas alterações podem ser correlacionadas com o risco de anomalias herdadas do pai e não com o procedimento de ICSI em si (Kim et al., 2010).

A monossomia do cromossomo X geralmente ocorre como um resultado da perda cromossomo sexual paterno e acredita-se ser principalmente devida a evento pós-zigótico; essa anomalia é a predominante em gestações clínicas e está altamente associada à perda gestacional (Tang et al., 2004). No entanto, a taxa elevada de monossomia do cromossomo X no grupo ICSI pode indicar que esta técnica facilita a transmissão da anormalidade do cromossomo sexual do espermatozoide para o conceito e, por isso, é encontrada taxa elevada de aneuploidia do cromossomo sexual em homens subfêrteis (Ma et al., 2006).

Woldringh e colaboradores, em recente revisão sistemática, estudaram a ocorrência de alterações nos cariótipos de crianças concebidas por FIV em ciclos utilizando espermatozoides obtidos por aspiração percutânea (PESA), aspiração epididimal microcirúrgica (MESA) ou extração testicular (TESE), e não encontraram diferenças significativas entre as frequências de cariótipos anormais quando comparados aos exames de crianças concebidas por TRA com espermatozoides a fresco (Woldringh et al., 2009).

Para Martinez e colaboradores, a incidência de cromossomopatias é significativamente menor quando o clínico decide por FIV ao invés de ICSI (Martinez et al., 2010). Entretanto, no estudo de Ma e colaboradores as incidências de aberrações cromossômicas não foram significativamente diferentes entre as duas técnicas — 59% versus 71%, respectivamente. (Ma et al., 2006).

A idade materna elevada, por fim, é a causa de infertilidade mais comumente associada ao aumento de aneuploidias na prole (Donoso & Devroey, 2007), em concepção espontânea ou medicamente assistida. Além de estar correlacionada com um aumento do risco de perda gestacional — geralmente envolvendo ganho ou perda dos cromossomos 15, 16, 22 e X — e de gerar descendentes portadores de cromossomopatias — que envolvem predominantemente os cromossomos 13, 18, 21, X e Y, também está associada com a diminuição das taxas de implantação, provavelmente devido à letalidade de muitas aberrações cromossômicas.

RESULTADOS PERINATAIS

Dados da *Red Latinoamericana de Reproducción Asistida* apontam a ocorrência de gestações duplas em até 23% dos ciclos em que se transferem dois a quatro embriões e em 5% daqueles em que se transferem três (Zegers-Hochschild et al., 2008). De acordo com Chung e colaboradores, gestações duplas estariam associadas a aumento de 12 vezes no risco de BPN e PPT quando comparadas às gestações únicas, e pode-se esperar ao menos uma das evoluções adversas mencionadas em praticamente todas as gestações triplas (Chung et al., 2006).

Recente meta-análise demonstrou riscos reduzidos de mortalidade perinatal, baixo peso ao nascimento (< 2.500 g), recém-nascidos pequenos para a idade gestacional e parto pré-termo (< 37 semanas) em crianças concebidas por TRA provenientes de embriões criopreservados e transferidos para a cavidade uterina após descongelamento, quando comparadas às oriundas de transferências a fresco (Maheshwari et al., 2012). Embora as conclusões sejam válidas apenas para gestações únicas e tenham sido baseadas em estudos observacionais, é o primeiro estudo de maior impacto comparando essas duas populações de crianças concebidas por TRA e sugere a estratégia da criopreservação embrionária para melhoria de resultados perinatais.

Por fim, é possível que o momento escolhido para a transferência embrionária possa interferir nos resultados perinatais; segundo o estudo de Finnström e colaboradores, crianças nascidas após transferência em fase de blastocisto apresentaram risco aumentado, embora discreto, para parto pré-termo em relação às oriundas de embriões transferidos em fase de clivagem (Finnström et al., 2011).

ANOMALIAS CONGÊNITAS

A possibilidade de aumento da incidência de anomalias congênitas em crianças concebidas por TRA é uma das grandes discussões da medicina reprodutiva, objeto de vários estudos que realçam a necessidade de contínuo monitoramento daquelas ao longo de seu crescimento e desenvolvimento.

Trabalhos iniciais não indicaram aumento da prevalência de defeitos congênitos em crianças concebidas por TRA em comparação às concebidas naturalmente (Loft et al., 1999; Bonduelle et al., 2002). Na mesma linha, um grande estudo multicêntrico sobre a prevalência de defeitos congênitos em 15.405 crianças chinesas concebidas por TRA apontou números comparáveis aos da população geral (1,23% e 1,35%, respectivamente); observou-se no estudo tendência maior de defeitos congênitos após ICSI (OR = 1,42, 95% IC 0,99-2,03, $p = 0,052$). Como ocorre na população geral chinesa, cardiopatias congênitas (0,29%), defeitos do sistema nervoso central (0,2%), polidactilia ou sindactilia (0,13%), fendas lábio-palatais (0,11%) e defeitos do trato gastrointestinal (0,09%) foram mais frequentes (Yan et al., 2011).

Questionamentos ao exposto são objetos de estudos mais recentes. Um estudo iraniano recém-publicado demonstrou a ocorrência de ao menos uma das seguintes malformações maiores em 7% das crianças concebidas por FIV com ICSI ou não: hipospádia, hérnia inguinal, ducto arterial patente com defeito de septo ventricular, displasia de desenvolvimento do quadril, estenose de ducto lacrimal, hidronefrose e refluxo urinário significativo, criptorquia, estenose de junção uretero-pélvica e torcicolo (Mozafari Kermani et al., 2012).

Fedder e colaboradores demonstraram em publicação recente que a incidência de criptorquidia em crianças nascidas depois da ICSI parece estar diretamente relacionada à gravidade da infertilidade do pai (Fedder et al., 2012). Embora esses autores não tenham encontrado associação com defeitos de fechamento uretral, há na literatura a documentação do compartilhamento de genes relacionados à disfunção reprodutiva entre pais com a qualidade reduzida do sêmen e seus filhos com criptorquidia e/ou hipospádia (Askund et al., 2007).

Há pouco menos de uma década, uma metanálise de 19 estudos sugeriu aumento do risco de anomalias congênitas maiores, com razão de chances (OR) de 1,29 (95% IC 1,01-1,67) para crianças concebidas por FIV ou ICSI, sem separar gestações únicas ou múltiplas; quando separadas, demonstraram curiosamente OR menores para gestações múltiplas em relação às únicas, em ambas as técnicas (Rimm et al., 2004). No ano seguinte, Hansen et al. realizaram nova meta-análise de sete estudos (selecionados de 25) e apontaram OR = 1,4 (95% IC 1,28-1,53) para anomalias congênitas em geral e OR = 2,01 (95% IC 1,49-2,69) para anomalias maiores (Hansen et al., 2005). Em 2012, Wen e colaboradores demonstraram novamente risco significativamente aumentado para ocorrência de anomalias congênitas entre crianças concebidas por TRA quando comparadas às concebidas naturalmente em 46 estudos selecionados, com OR = 1,37 (95% IC 1,26-1,48), sem diferenças aparentes entre FIV e ICSI (Wen et al., 2012). Os autores, contudo, frisam que a heterogeneidade dos estudos e os potenciais fatores de confusão devem ser considerados para análise dos resultados, mesmo quando devidamente ajustados.

O número de nascimentos de crianças concebidas por TRA para que nasça mais uma criança portadora de anomalia congênita (NNTH, do inglês number needed to harm) diminui à medida que aumenta a prevalência de defeitos congênitos na população de referência. Assim, para OR = 1,4 demonstrada por Hansen e colaboradores, o NNTH varia de 250, quando há prevalência de defeitos congênitos em geral de

1% na população de referência, a 62, quando tal prevalência é de 4%. Separados apenas os estudos com anomalias maiores, os NNTH seriam de 100 e 25 para as respectivas prevalências na população de referência (Hansen et al., 2005).

Por fim, é possível que o momento escolhido para a transferência embrionária possa interferir na incidência de anomalias congênitas. De acordo com recente estudo sueco, crianças nascidas após transferência em fase de blastocisto apresentaram risco aumentado, embora discreto, para malformações congênitas em relação àquelas oriundas de embriões transferidos em estádios mais precoces de evolução *in vitro* (Finnström et al., 2011).

CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos um número crescente de estudos bem desenhados têm melhorado nossa compreensão do bem-estar das crianças nascidas após técnicas de reprodução assistida. De maneira geral, a literatura existente sobre o tema é tranquilizadora. Vários fatores contribuem para a saúde dos conceitos, incluindo a infertilidade dos pais, fatores processuais e maior idade materna, mas os principais riscos são decorrentes de gestações múltiplas e baixo peso ao nascer, o que deve ser explicado no aconselhamento de casais candidatos a tratamento.

A transferência eletiva de embrião único é uma estratégia moderna e amplamente aceita na redução de gestações múltiplas, especialmente em estágio de blastocisto (Mullin et al., 2012) e, principalmente, em países onde os governos cobrem as despesas do tratamento. Além disso, os avanços das técnicas de criopreservação já oferecem segurança suficiente para preservar embriões restantes para transferência posterior. Exemplo recente de sucesso foi demonstrado na Finlândia, onde a transferência eletiva de embrião único com criopreservação dos demais foi associada à redução de nascimentos múltiplos à metade, demonstrando ser mais eficaz e menos onerosa do que a transferência de dois ou mais embriões (Veleva et al., 2009). O benefício em longo prazo, certamente, terá reflexo no bem estar das crianças concebidas por FIV/ICSI.

Dessa forma, casais inférteis submetidos a TRA bem sucedidas devem ser tranquilizados quanto à saúde da prole, principalmente quando houver gestação única e nascimento a termo. Estudos adicionais, contudo, devem continuar a investigar outros aspectos de indivíduos gerados por concepção assistida, interessando, também, a infância, a puberdade e a idade adulta.

Correspondência

Bruno Ramalho de Carvalho. GENESIS – Centro de Assistência em Reprodução Humana. SHLS 716, Conjunto L, Centro Clínico Sul, Ala Leste, Salas L 328/331. Asa Sul, Brasília, Distrito Federal, Brasil. Telefone: (61) 3345-8030. E-mail: bruno@genesis.med.br.

REFERÊNCIAS

- Al-Asmar N, Peinado V, Vera M, Remohí J, Pellicer A, Simón C, Hassold T, Rubio C. Chromosomal abnormalities in embryos from couples with a previous aneuploid miscarriage. *Fertil Steril*. 2012;98:145-50.
- Andersen AN, Gianaroli L, Felberbaum R, de Mouzon J, Nygren KG. Assisted reproductive technology in Europe, 2002. Results generated from European registers by ESHRE. *Hum Reprod*. 2006;21:1680-97.
- Askund C, Jørgensen N, Skakkebaek NE, Jensen TK. Increased frequency of reproductive health problems among fathers of boys with hypospadias. *Hum Reprod*. 2007;22:2639-46.
- Bettio D, Venci A, Levi Setti PE. Chromosomal abnormalities in miscarriages after different assisted reproduction procedures. *Placenta*. 2008;29(Suppl B):126-8.
- 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). *Hum Reprod*. 2002;17:671-94.
- Bonduelle M, Ponjaert I, Steirteghem AV, Derde MP, Devroey P, Liebaers I. Developmental outcome at 2 years of age for chil-

- dren born after ICSI compared with children born after IVF. *Hum Reprod.* 2003;18:342-50.
- Bowdin S, Allen C, Kirby G, Brueton L, Afnan M, Barratt C, Kirkman-Brown J, Harrison R, Maher ER, Reardon W. A survey of assisted reproductive technology births and imprinting disorders. *Hum Reprod.* 2007; 22:3237-40.
- Donoso P, Devroey P. PGD for aneuploidy screening: an expensive hoax? *Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol.* 2007; 21:157-68.
- ESHRE European Society of Human Reproduction and Embryology. ART fact sheet. Disponível em: <http://www.eshre.eu/ESHRE/English/Guidelines-Legal/ART-fact-sheet/page.aspx/1061>. Acessado: 09/12/2012.
- Fedder J, Loft A, Parner ET, Rasmussen S, Pinborg A. Neonatal outcome and congenital malformations in children born after ICSI with testicular or epididymal sperm: a controlled national cohort study. *Hum Reprod.* 2012 [Epub ahead of print].
- Finnström O, Källén B, Lindam A, Nilsson E, Nygren KG, Olausson PO. Maternal and child outcome after in vitro fertilization--a review of 25 years of population-based data from Sweden. *Acta Obstet Gynecol Scand.* 2011;90:494-500.
- Gekas J, Thepot F, Turleou C, Sittroi JP, Dadoune JP, Briault S, Rio M, Bourouillou G, Carré-Pigeon F, Wasels R, Benzacken B; Association des Cytogeneticiens de Langue Francaise. Chromosomal factors of infertility in candidate couples for ICSI: an equal risk of constitutional aberrations in women and men. *Hum Reprod.* 2001;16:82-90.
- Hansen M, Bower C, Milne E, de Klerk N, Kurinczuk JJ. Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects—a systematic review. *Hum Reprod.* 2005;20:328-38.
- Hansen M, Bower C, Milne E, de Klerk N, Kurinczuk JJ. Assisted reproductive technologies and the risk of birth defects - a systematic review. *Hum Reprod.* 2005;20:328-38.
- Herrera LA, Prada D, Andonegui MA, Dueñas-González A. The Epigenetic Origin of Aneuploidy. *Curr Genomics.* 2008;9:43-50.
- Jacobs PA, Browne C, Gregson N, Joyce C, White H. Estimates of the frequency of chromosome abnormalities detectable in unselected newborns using moderate levels of banding. *J Med Genet.* 1992;29:103-8.
- Joffe M, Li Z. Association of time to pregnancy and the outcome of pregnancy. *Fertil Steril.* 1994;62:71-5.
- Jozwiak EA, Ulug U, Mesut A, Erden HF, Bahceci M. Prenatal karyotypes of fetuses conceived by intracytoplasmic sperm injection. *Fertil Steril.* 2004;82:628-33.
- Kim JK, Samaranayake M, Pradhan S. Epigenetic mechanisms in mammals. *Cell Mol Life Sci.* 2009;66: 596-612.
- Kim JW, Lee WS, Yoon TK, Seok HH, Cho JH, Kim YS, Lyu SW, Shim SH. Chromosomal abnormalities in spontaneous abortion after assisted reproductive treatment. *BMC Med Genet.* 2010;11:153.
- Lidegaard Ø, Pinborg A, Andersen AN. Imprinting diseases and IVF: Danish National IVF cohort study. *Hum Reprod.* 2005;20:950-4.
- Lim D, Bowdin SC, Tee L, Kirby GA, Blair E, Fryer A, Lam W, Oley C, Cole T, Brueton LA, Reik W, Macdonald F, Maher ER. Clinical and molecular genetic features of Beckwith-Wiedemann syndrome associated with assisted reproductive technologies. *Hum Reprod.* 2009;24:741-7.
- Loft A, Petersen K, Erb K, Mikkelsen AL, Grinsted J, Hald F, Hindkjaer J, Nielsen KM, Lundstrom P, Gabrielsen A, Lenz S, Hornnes P, Ziebe S, Ejdrup HB, Lindhard A, Zhou Y, Nyboe Andersen A. A Danish national cohort of 730 infants born after intracytoplasmic sperm injection (ICSI) 1994-1997. *Hum Reprod.* 1999;14:2143-8.
- Ma S, Philipp T, Zhao Y, Stetten G, Robinson WP, Kalousek D. Frequency of chromosomal abnormalities in spontaneous abortions derived from intracytoplasmic sperm injection compared with those from in vitro fertilization. *Fertil Steril.* 2006;85:236-9.
- Maheshwari A, Pandey S, Shetty A, Hamilton M, Bhattacharya S. Obstetric and perinatal outcomes in singleton pregnancies resulting from the transfer of frozen thawed versus fresh embryos generated through in vitro fertilization treatment: a systematic review and meta-analysis. *Fertil Steril.* 2012;98:368-77.
- Martinez MC, Mendez C, Ferro J, Nicolas M, Serra V, Landeras J. Cytogenetic analysis of early nonviable pregnancies after assisted reproduction treatment. *Fertil Steril.* 2010;93:289-92.
- Mozafari Kermani R, Nedaeifard L, Nateghi MR, Shahzadeh Fazeli A, Ahmadi E, Osia MA, Jafarzadehpour E, Nouri S. Congenital anomalies in infants conceived by assisted reproductive techniques. *Arch Iran Med.* 2012;15:228-31.
- Mullin C, Berkeley AS, Grifo JA. Supernumerary Blastocyst Cryopreservation: A key Prognostic Indicator for Patients Opting for an Elective Single Blastocyst Transfer (eSBT). *J Assist Reprod Genet.* 2012;29:783-8.
- Nelson SM, Lawlor DA. Predicting Live Birth, Preterm Delivery, and Low Birth Weight in Infants Born from In Vitro Fertilisation: A Prospective Study of 144,018 Treatment Cycles. *PLoS Med.* 2011; 8(1): e1000386. doi:10.1371/journal.pmed.1000386.
- Rimm AA, Katayama AC, Diaz M, Katayama KP. A meta-analysis of controlled studies comparing major malformation rates in IVF and ICSI infants with naturally conceived children. *J Assist Reprod Genet.* 2004;21:437-43.
- Sharma S, Kelly TK, Jones PA. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis* 2010;31:27-36.
- Tang SS, Gao H, Robinson WP, Ho Yuen B, Ma S. An association between sex chromosomal aneuploidy in sperm and abortus with 45 XY of paternal origin: possible transmission of chromosomal abnormalities through ICSI. *Hum Reprod.* 2004;19:147-51.
- van Balen F. Development of IVF children. *Dev Rev.* 1998;18:30-46.
- Veleva Z, Karinen P, Tomas C, Tapanainen JS, Martikainen H. Elective single embryo transfer with cryopreservation improves the outcome and diminishes the costs of IVF/ICSI. *Hum Reprod.* 2009;24:1632-9.
- Wen J, Jiang J, Ding C, Dai J, Liu Y, Xia Y, Liu J, Hu Z. Birth defects in children conceived by in vitro fertilization and intracytoplasmic sperm injection: a meta-analysis. *Fertil Steril.* 2012;97:1331-7.
- Yan J, Huang G, Sun Y, Zhao X, Chen S, Zou S, Hao C, Quan S, Chen ZJ. Birth defects after assisted reproductive technologies in China: analysis of 15,405 offspring in seven centers (2004 to 2008). *Fertil Steril.* 2011;95:458-60.
- Zegers-Hochschild F, Schwarze JE, Galdames V (Eds). *Red Latinoamericana de Reproducción Asistida. Registro Latinoamericano de Reproducción Asistida.* 2008. Disponível em: http://www.redlara.com/imagenes/arq/2008_registro%202008.pdf. Acessado: 23/07/2012.